

ÂNGELA CARDOSO DE ALVARENGA WU

**Caracterização biológica e molecular de
cepas de *Leishmania (Leishmania) major*-
like isoladas no Brasil e análise da
expressão diferencial de genes
possivelmente envolvidos com
infeciosidade**

ORIENTAÇÃO

Dra. Maria Norma Melo
Departamento de Parasitologia ICB/UFMG

CO-ORIENTAÇÃO

Dr. Jorge Luiz Pesquero
Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB/UFMG

Belo Horizonte
2007

ÂNGELA CARDOSO DE ALVARENGA WU

**Caracterização biológica e molecular de
cepas de *Leishmania (Leishmania) major*-
like isoladas no Brasil e análise da
expressão diferencial de genes
possivelmente envolvidos com
infeciosidade**

Tese 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 a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Protozoologia

ORIENTADORA
Dra. Maria Norma Melo

CO-ORIENTAÇÃO
Dr. Jorge Luiz Pesquero

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
2007

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Comunidade Econômica Européia (LeishEpiNetSA).

Dedico esse trabalho aos meus anjos de luz, que me fortalecem e me orientam, sempre, pai e mãe. Ao Lincohn, à Luiza e à Taynah que me acalentam e me enobrecem. Obrigada pelo apoio incondicional, confiança, alegria e carinho. A vocês, o meu muito obrigada e meu infinito, eterno e sublime amor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL



À Comunidade Econômica Européia (European Community), na pessoa do coordenador do projeto intitulado “Control strategies for visceral leishmaniasis (VL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) in South American applications of molecular epidemiology” – Project FP6 – 2003 – DEV – 2 – 01547, Dr. Michael A. Miles – London School of Hygiene and Tropical Medicine – London, UK, pelo suporte financeiro parcial na realização do presente estudo.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais na pessoa do seu atual coordenador, Prof. Pedro Marcos Linardi pela oportunidade de aprendizado e pela competência em conduzir, com seriedade e sabedoria, os destinos do Programa junto à UFMG e outros órgãos competentes.

À querida secretária do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Sumara A. G. Ferreira, pela eficiência e amabilidade com que acolhe todos os alunos da Pós-graduação do Departamento de Parasitologia. Obrigada pela disponibilidade, atenção e agradáveis momentos de convivência.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

À professora Norma, exemplo de sabedoria e competência, te agradeço profundamente por todos os ensinamentos, pela paciência, confiança, atenção e auxílio. Obrigada pelo apoio, entusiasmo e incentivo constantes. Obrigada pela oportunidade de aprendizado ao seu lado, não só em ciência, mas também pela experiência de vida compartilhada, tão nobre e rica, que você possui. O mundo seria bem melhor se existissem mais pessoas como você! A você toda minha admiração em reconhecimento aos seus méritos como educadora, cientista e humanista.

Ao professor Pesquero, pelos ensinamentos, conselhos e extrema competência na orientação deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de orientação, por abrir as portas do seu laboratório e por toda atenção dispensada. Obrigada pelo incentivo e apoio constantes.

Às professoras Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Celinha) e Dra. Élide Rabelo pela contribuição e valiosas sugestões.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

Ao professor Marcos Pezzi Guimarães por ter disponibilizado o laboratório para a realização das reações de PCR no primeiro momento deste trabalho.

À professora Maria Aparecida Gomes por ter disponibilizado o laboratório para a realização de algumas etapas da técnica de SSH. Obrigada pelas sugestões e pelos ricos momentos de convivência.

À professora Daniella Bartholomeu pela disponibilidade e esclarecimentos em alguns momentos deste trabalho.

Ao professor Evanguedes, do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG, pela disponibilidade e atenção dispensadas. Obrigada por permitir parte do trabalho em seu laboratório.

À minha irmã de coração e amiga do peito Jana. Por todo apoio, todo companheirismo, toda amizade, carinho, conselhos e não poderia deixar de dizer, toda “intuição”, que ainda continua bem em alta né?!. Você faz parte das minhas escolhas e dos meus caminhos. A riqueza que construímos nesses 13 anos de amizade inabalável é com certeza bem mais antiga do que pensamos...e é por isso, amiga, que dedico também a você, com todo carinho e gratidão, minhas conquistas! Você é especial e muito importante para mim! A você toda minha gratidão, carinho e admiração!

À minha amiga Michelle (Mi), companheira de SSH, pela amizade, apoio, cumplicidade e força. Obrigada pelos ricos momentos de discussão desde o início até hoje (rs!) sobre a técnica de SSH. Alguns dos momentos mais difíceis tornaram-se ultrapassados e transponíveis porque você estava por perto!!

À Cíntia, exemplo de simpatia e boa vontade, obrigada pela amizade, apoio e preocupação dispensados, obrigada pelas constantes discussões em torno do RNA, da clonagem, do sequenciamento, do BLAST... Obrigada pelos divertidos e prazerosos momentos de convivência.

À Soraia e a Rosângela pela disposição, apoio e amizade. Obrigada pelos preciosos conselhos durante a padronização das técnicas e solução dos problemas “insolucionáveis”. Obrigada por cuidarem com carinho do material para realização dos experimentos. E também, pelos agradáveis momentos de convivência.

Aos colegas do Departamento, Eliana, Raul, Helen, Belinha, Sidney, Larinha, Eloiza, Carina, pelo companheirismo, carinho, e pelos agradáveis momentos de convivência vividos ao longo desse trabalho.

Às grandes amigas Dri, Fê, Cris, Alê e Márcia pela amizade, alegria, descontração, apoio e inúmeras seções de terapia de grupo, às quais me fortaleceram para continuar sempre.

À amiga Janaina de Jesus (Jana), pela amizade, apoio e agradável convivência. Você foi uma companheira de “stress” do doutorado e principalmente da pergunta que não se calava “quando você defende?” e se tornou uma grande amiga.

À minha mãe, amada e querida, exemplo de perseverança e força, pelo apoio e amor incondicional, pelos preciosos conselhos, pela confiança e por compartilhar todos os momentos felizes e difíceis vividos ao longo de toda a vida. Obrigada por fazer da Luiza a sua preciosidade e por cuidar com tanto zelo e amor nos momentos em que eu não pude estar presente. Você é e sempre será a luz da minha vida. Não há palavra alguma que expresse a minha tamanha gratidão e amor por você. Eu te amo imensamente!

Ao meu caro e amado Pai, meu eterno ídolo, símbolo de sabedoria e paz e exemplo de bondade e candura, te agradeço imensamente por todo apoio, preocupação, interesse, carinho e eterna boa vontade. Queria poder parar o tempo, eternizar sua voz, seus conselhos e conversar com você sobre ciência e tudo mais, todos os segundos da minha vida. Você é inigualável. Obrigada pelos sábios conselhos. Eu amo muito você.

À pequena “grande” Luiza (Luli), minha vida, exemplo de simplicidade e pureza, e razão da minha verdadeira felicidade. Você alegre e colore todos os meus dias. Obrigada pelo esforço em compreender a minha ausência e muito obrigada por me esperar com tanta ansiedade, carinho e com seu abraço, fonte inesgotável de amor. Obrigada pela paz interior que me trouxe desde o dia que nasceu. A você todo o meu infinito amor!

Ao meu marido Lincoln (eterno Pitu!), minha paixão e meu amor sublime. Obrigada pela pureza de companheirismo que vivemos, pela luz que me alegria e me auxilia, pelo apoio que me acalma e fortalece, pela alegria que me conforta e me faz feliz, por fazer do meu tesouro o seu tesouro, pela preocupação, pelo carinho e pelo amor que me inspira, me aconchega e que enriquece e enobrece os nossos dias. Você me completa! Te amo muito, pra sempre...

À querida e especial Tatá, por fazer parte da minha vida, por enriquecer a minha vida de amor e alegria, pelo seu sorriso contagiante. Obrigada por todos os carinhos e por tornar os nossos dias mais alegres.

À minha amada irmã e amiga Dine, exemplo de força e alegria, obrigada pela amizade, companheirismo e atenção. Obrigada por seus conselhos e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo carinho de mãe com a Lulu...Que bom que você existe em minha vida! Amo você.

Ao meu querido e amado irmão Léo, exemplo de força e generosidade, pela amizade e carinho. Obrigada por todos ensinamentos e pelo apoio. Você alegria minha vida. Você é especial e preciso de você sempre, ao meu lado... Amo você!

Ao meu cunhado Arlan, pelo apoio, amizade, incentivo e agradáveis momentos de convivência. Obrigada pelo carinho e cuidados com a Lulu. Você é um grande amigo!

À minha querida e companheira sogra, D. Helena, pelo apoio, pelos ensinamentos, por acreditar e confiar em mim, por lutar ao meu lado no que for preciso, por fazer parte da minha família. Você é muito especial!!

Ao meu cunhado Saulo, por se tornar um amigo e companheiro. Obrigada pelos momentos de alegria em nossas vidas!

A DEUS e ao amado mestre Jesus, pela vida, pela oportunidade de caminhos, por minha maravilhosa família e amigos e por todos os momentos que, tristes ou alegres, contribuem para minha evolução.

“...A batalha mais difícil de ser travada ocorre no teu mundo íntimo. Ninguém a vê, a aplaude ou a censura. É tua. Vitória, ou derrota, pertencerá a ti em silêncio. Nenhuma ajuda exterior poderá contribuir para o teu sucesso, ou conjuntura alguma te levará ao fracasso...”

Lancellin

RESUMO

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que colocam em risco 350 milhões de pessoas em mais de 88 países em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo. A identificação e caracterização destes parasitos são de fundamental relevância para estudos eco-epidemiológicos, diagnóstico, tratamento, determinação de medidas profiláticas e de controle da doença. No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem se apresentado em franca expansão geográfica, determinada entre outros fatores, pelo acelerado processo de urbanização. Oito espécies de *Leishmania* já foram caracterizadas como causadoras da LTA no Brasil. Entre estas, uma espécie semelhante à *Leishmania major* do Velho Mundo, denominada de *Leishmania major-like*. Embora, ainda não completamente caracterizada, esta *Leishmania* tem sido comumente relatada em muitos estudos de investigação epidemiológica realizados no Novo Mundo. Este estudo teve como objetivo caracterizar amostras de *L. major-like*, isoladas no Brasil, através de técnicas biológicas e moleculares utilizando amostras de referência do Novo e Velho Mundo como padrão comparativo. O comportamento destas amostras, quando avaliado pelo crescimento “in vitro”, infecção em hamsters e análise de polimorfismo de DNA genômico, não revelou diferenças, com relação à *L. major* do Velho Mundo, cepa de referência FN (MHOM/IL/1980/FN), o que nos sugeriu ressaltar que a existência da *L. major-like* como agente causador da leishmaniose cutânea, deve ser considerada em estudos de identificação de *Leishmania* sp. isoladas no Novo Mundo, assim também como em estudos de investigação epidemiológica da LTA. Duas das cepas de *L. major-like*, isoladas de casos humanos de leishmaniose tegumentar no Brasil, e utilizadas na vacina Anti-LTA desenvolvida por Mayrink et al. (1979) e também em kits para diagnóstico de leishmaniose visceral (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002) apresentaram diferente perfil de infecciosidade para hamsters e para camundongos BALB/c e foram estudadas em especial através de outras técnicas – isoenzimas, RAPD-PCR, SSR-PCR e a técnica de **Supressão por Hibridização Subtrativa** (**Suppression Subtractive Hybridisation – SSH**). A análise de marcadores genéticos gerados pelas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR, e o perfil

isoenzimático de ambas as amostras não revelou diferença entre as duas e por isso foi pesquisada a presença de genes específicos, que pudessem determinar diferença na infecciosidade desses parasitos para animais de laboratório. Através da técnica de SSH, a qual seleciona genes diferencialmente expressos, essas cepas foram avaliadas quanto a possível expressão de proteínas relacionadas à infecciosidade. Nove sequências de cDNA mostraram homologia significativa com genes conhecidos de *Leishmania* sp (IVENS et al., 2005), dentre os quais, alguns estão possivelmente envolvidos com processos fisiológicos incluindo metabolismo, proteínas ribossomais, destinação de proteínas, produção de energia, fatores de virulência e funções desconhecidas. A técnica de SSH foi considerada uma boa ferramenta para identificação rápida de genes diferencialmente expressos e a análise desses genes, pode expandir a compreensão sobre a patogênese da leishmaniose, identificando genes que possam constituir alternativas para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra a leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana, caracterização, *Leishmania (Leishmania) major*-like, expressão gênica diferencial.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a spectrum of diseases (cutaneous, mucocutaneous and visceral) caused by many species of the genus *Leishmania* (ROSS, 1903). Currently leishmaniasis is endemic in 88 countries, with an estimated total of 350 million people at risk. The identification and classification of those parasites are essential for eco-epidemiological studies, treatment, and determination of prophylactic measures as well as the control of the disease. In Brazil, American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) has been systematically spread throughout its territory due to the accelerated process of urbanization among other factors. Eight *Leishmania* species had already been identified as causing ATL in the country. Among these, there is a species which is similar to *Leishmania major* of the Old World named *Leishmania major*-like. Although this leishmaniasis has not been completely characterized it has been frequently mentioned in many epidemiological studies carried out in the New World. The objective of this study was to characterize samples of *L. major*-like, isolated in Brazil, by the use of both biological and molecular techniques using samples from both New and Old Worlds as references. When the behavior of these samples was evaluated according to its “in vitro” growing, infections in hamsters and genome polymorphisms, no apparent difference was detected to the *L. major* of the Old World reference strain FN (MHOM/IL/1980/FN). This suggests that *L. major*-like may cause cutaneous leishmaniasis and must be considered while carrying out studies for *Leishmania* sp identification isolated in the New World as well as in epidemiological studies of American Tegumentary Leishmaniasis. Two strains of *L. major*-like, isolated from human cases of tegumentary leishmaniasis in Brazil which were used in the Vaccine against American Tegumentary Leishmaniasis (developed by Mayrink et al., 1979) as well as in visceral leishmaniasis diagnosis kits (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002) presented different infection profiles in hamsters and BALB/c mice. These strains were studied by the other techniques – isoenzymes, RAPD-PCR, SSR-PCR and the *Suppression Subtractive Hybridisation* – SSH technique. The analysis of genetic markers generated by RAPD-PCR and SSR-PCR techniques, as well as the isoenzyme profile did not reveal differences between the two samples. We next searched for genes that are differentially expressed between the two isolates and therefore may be involved in the distinct infectivity profile of these samples. By using

SSH technique, we identified nine cDNA sequences differentially expressed between the two isolates. Some of these genes are involved metabolism, translation, destination of proteins, production of energy, factors of virulence as well as unknown functions. This study may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in leishmaniasis infection and may allow the identification of new targets for drug and vaccine development against this parasite.

Keywords: American Tegumentary Leishmaniasis, *Leishmania (Leishmania) major*-like, characterization, gene differential expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** - Esquema da estratégia de estudo utilizada..... 61
- FIGURA 2** - Sequências dos adaptadores e iniciadores utilizados na realização da técnica SSH. Quando os adaptadores são ligados aos cDNAs digeridos pela enzima de restrição *Rsa* I, o sítio de ligação a esta enzima é restaurado. Em vermelho está representado o sítio de anelamento para o iniciador 1. Em azul e verde estão representados os sítios de anelamento para os iniciadores internos 1 e 2R, respectivamente (*Manual do “Kit” PCR-Select™ cDNA Subtraction -Clontech*)..... 82
- FIGURA 3** - Esquema da técnica SSH. As linhas sólidas representam os cDNAs de interesse ou de referência. A caixa preta externa representa a parte externa dos adaptadores 1 e 2R, idêntica à sequência do iniciador 1. As caixas hachuradas e em cinza correspondem à parte interna dos adaptadores 1 e 2R, idênticas a sequência dos iniciadores internos 1 e 2R, respectivamente..... 85
- FIGURA 4** - Lesões de hamsters inoculados no focinho com 1×10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento. I – Lesão no focinho e formas amastigotas da cepa BH49 sete semanas após inoculação (coloração pelo Giemsa, aumento 1000X). II - Lesão ulcerada num animal inoculado com a cepa BH135 oito semanas após inoculação e III – Presença de visceralização, edema e ascite e formas amastigotas de baço num animal inoculado com a cepa BH70 dez semanas após inoculação (coloração pelo Giemsa, aumento 1000X)..... 97
- FIGURA 5** - Diagrama representativo dos perfis eletroforéticos das cepas BH49 e BH121 em comparação com cepas PH8 - *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, M379 - *L. (L.) mexicana*, 5ASKH - *L. (L.) major*, LS94 - *L. (Viannia) panamensis*, M2903 - *L. (L.) braziliensis* e M1176 - *L. (V.) guyanensis*. GPI – Glicose-fosfo-isomerase; 6 PGD – 6- Fosfo-glicodesidrogenase; ES – Esterase; SOD – Superóxido Dismutase; MPI – Manose Fosfato Isomerase; NH – Nucleotidase..... 99
- FIGURA 6A** - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador B07, obtido em gel de poliácridamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major-like*..... 102
- FIGURA 6B** - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador B07. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major* e *L. major-like*, incluindo cepas de *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II - Demais cepas de *Leishmania sp.* de referência..... 102

FIGURA 7A - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de <i>Leishmania sp.</i> utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador L15, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de <i>L. major</i> e ● cepas de <i>L. major-like</i>	103
FIGURA 7B - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador L15. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de <i>Bootstrap</i> . I – Cepas de <i>L. major</i> e <i>L. major-like</i> , incluindo cepas de <i>L. major</i> de referência (FN e 5ASKH) e <i>L. tropica</i> (K27). II- Demais cepas de <i>Leishmania sp.</i> de referência.....	103
FIGURA 8A - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de <i>Leishmania sp.</i> utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador M13F, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de <i>L. major</i> e ● cepas de <i>L. major-like</i>	104
FIGURA 8B - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador M13F. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de <i>Bootstrap</i> . I – Cepas de <i>L. major</i> e <i>L. major-like</i> , incluindo cepas de <i>L. major</i> de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de <i>Leishmania sp.</i> de referência.....	104
FIGURA 9A - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de <i>Leishmania sp.</i> utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador M13R, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de <i>L. major</i> e ● cepas de <i>L. major-like</i>	105
FIGURA 9B - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador M13R. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de <i>Bootstrap</i> . I – Cepas de <i>L. major</i> e <i>L. major-like</i> , incluindo cepas de <i>L. major</i> de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de <i>Leishmania sp.</i> de referência.....	105
FIGURA 10A - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de <i>Leishmania sp.</i> utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador P14, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de <i>L. major</i> e ● cepas de <i>L. major-like</i>	106

FIGURA 10B - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador P14. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de <i>Bootstrap</i> . I – Cepas de <i>L. major</i> e <i>L. major</i> -like, incluindo cepas de <i>L. major</i> de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de <i>Leishmania</i> sp. de referência.....	106
FIGURA 11A - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de <i>Leishmania</i> sp. utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador QG1, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de <i>L. major</i> e ● cepas de <i>L. major</i> -like.....	107
FIGURA 11B - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador QG1. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de <i>Bootstrap</i> . I – Cepas de <i>L. major</i> e <i>L. major</i> -like, incluindo cepas de <i>L. major</i> de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de <i>Leishmania</i> sp. de referência.....	107
FIGURA 12A - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de <i>Leishmania</i> sp. utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador γ GT11, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de <i>L. major</i> e ● cepas de <i>L. major</i> -like.....	108
FIGURA 12B - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador γ GT11. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de <i>Bootstrap</i> . . I – Cepas de <i>L. major</i> e <i>L. major</i> -like, incluindo cepas de <i>L. major</i> de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de <i>Leishmania</i> sp. de referência.....	108
FIGURA 13 - Fenograma consenso das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de <i>Bootstrap</i> . . I – Cepas de <i>L. major</i> e <i>L. major</i> -like, incluindo cepas de <i>L. major</i> de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de <i>Leishmania</i> sp. de referência.....	111
FIGURA 14A - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de <i>Leishmania</i> sp. utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador (CA) ₈ RY, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de <i>L. major</i> e ● cepas de <i>L. major</i> -like.....	114

- FIGURA 14B** - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador CA)₈RY . Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major* e *L. major-like*, incluindo cepas de *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência..... 114
- FIGURA 15A** - Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania* sp. utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador CAA(CT)₆, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major-like*..... 115
- FIGURA 15B** - Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador CAA(CT)₆. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major* e *L. major-like*, incluindo cepas de *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência..... 115
- FIGURA 16** - Fenograma consenso das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major* e *L. major-like*, incluindo cepas de *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência..... 118
- FIGURA 17** - Curva de crescimento “in vitro” das amostras de *L. major-like* BH49 e BH121 e das amostras *L. major* FN e 5ASKH utilizadas como referência. Cada ponto representa a média de duas contagens de promastigotas em meio de Grace pH 6,5 incubadas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os pontos representam a média e o desvio padrão ($\pm\text{DP}$) de dois experimentos realizados em duplicata..... 120
- FIGURA 18** - Curso da infecção em camundongos BALB/c inoculados com 1×10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. major-like*, cepa BH49 em comparação com a cepa FN de referência. Os valores mostram a média do tamanho da lesão de 5 animais..... 122
- FIGURA 19** - Lesões observadas nas patas de BALB/c inoculadas com 1×10^6 promastigotas de *L. major* e *L. major-like*, na fase exponencial de crescimento. I - Lesão na pata direita de um animal inoculado com a cepa FN mostrando ulceração já na sexta semana de inoculação, II – Lesão na pata direita de um animal inoculado com a cepa BH49 na sexta semana mostrando ausência de ulceração e III - formas amastigotas locais da cepa BH49 (Coloração Giemsa, aumento 1000X)..... 123

FIGURA 20 - Gel de poliacrilamida 5% corado pelo nitrato de prata mostrando os produtos da reação de PCR 1 e da reação de PCR 2 das amostras BH49 e BH121 após a subtração. M – ϕ X174.....	124
FIGURA 21 - Gel de agarose a 1% em TBE 1X representando os produtos da segunda reação de PCR da técnica SSH.....	125
FIGURA 22 - – Gel de poliacrilamida 5% corado pelo nitrato de prata mostrando os produtos da PCR realizada com colônias bacterianas utilizando os iniciadores 1 e 2R. M – marcador de massa molecular 100pb.....	126
FIGURA 23 - Gel de poliacrilamida 5%, corado pela prata, mostrando os amplicons gerados pela técnica de RT-PCR para cada um dos clones selecionados a partir da cepas BH49 e BH121.....	129
FIGURA 24 - Distribuição de <i>L. major</i> -like na América do Sul. As localidades incluídas no mapa correspondem àquelas citadas em trabalhos anteriores utilizados como referencial teórico para este estudo. Mapa adaptado de Yamasaki et al., (1994).....	145
QUADRO 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> que causam Leishmaniose Tegumentar Americana no Novo Mundo.....	30
QUADRO 2 - Amostras de <i>Leishmania</i> sp. utilizadas no presente estudo.....	59
QUADRO 3 - Iniciadores aleatórios utilizados nas reações de RAPD-PCR...	70
QUADRO 4 - Iniciadores utilizados nas reações de SSR-PCR.....	71
QUADRO 5 - Ciclos de amplificação dos iniciadores (CA) ₈ RY e CAA(CT) ₆ na SSR-PCR.....	72
QUADRO 6 - – Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR. D – iniciador direto e R – Iniciador reverso.....	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, M13F, M13R, QG1, L15, λ GT11 e B07.....	109
TABELA 2 - Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de <i>Leishmania</i> utilizadas no estudo, detectados por RAPD-PCR, entre 250 e 1000 pb, com os iniciadores B07, L15, M13F, M13R, P14, QG1 e YGT11....	110
TABELA 3 - Resultados obtidos com a técnica de SSR-PCR com os iniciadores $(CA)_8RY$ e $CAA(CT)_6$	116
TABELA 4 - Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de <i>Leishmania</i> utilizadas no estudo, detectados por SSR-PCR, entre 250 e 1000 pb, com os iniciadores $(CA)_8RY$ e $CAA(CT)_6$	117
TABELA 5 - Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs específicos de cada uma das cepas de <i>L. major-like</i>	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
αMEM	<i>Minimum essential medium</i>
AP-PCR	<i>Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
cDNA	DNA complementar
CR3	<i>Complement receptor 3</i>
CR4	<i>Complement receptor 4</i>
DAF	<i>DNA Amplification Fingerprinting</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeos
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético de sódio
EMP70	Proteína endomembrana 70
EtBr	Brometo de Etídeo
FIG	Figura
<i>g</i>	Gravidade
gp63	Glicoproteína de 63 Kilodaltons
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hly	Hemolisinas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IPTG	Isopropiltioglicosídeo
KDa	Kilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
Kg	Kilograma
LB	Luria-Bertani
LGN	<i>Leishmania Genome Network</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LPG	Lipofosfoglicanos
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
MgCl_2	Cloreto de magnésio
MHOM	Mamífero – <i>Homo sapiens</i>
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia Virus</i>
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NNN	Meio de cultura Novy McNeal e Nicolle
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solução de fosfato tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSH	Supressão por Hibridização Subtrativa (<i>Suppression Subtractive Hybridisation</i>)
SSR	Repetições de Sequências Simples
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>
TAB	Tabela
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (OMS)
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactosídeo

Sumário

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 CICLO DE VIDA	26
1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	28
1.3 <i>LEISHMANIA MAJOR</i> -LIKE NO NOVO MUNDO	34
1.4 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	36
1.5 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES EM <i>LEISHMANIA</i>	47
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	53
3 OBJETIVO GERAL	56
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 PARASITOS	58
4.2 ESTRATÉGIA DE ESTUDO	59
4.3 ESTUDO DAS AMOSTRAS DE <i>L. MAJOR</i> -LIKE ISOLADAS NO BRASIL	61
4.3 ESTUDO DAS AMOSTRAS DE <i>L. MAJOR</i> -LIKE ISOLADAS NO BRASIL	62
4.3.1 Comportamento das cepas de <i>Leishmania</i> sp. em hamster	62
4.3.1.1 Animais	62
4.3.1.2 Infecção e acompanhamento dos animais	62
4.3.1.3 Coloração e documentação fotográfica	63
4.3.2 Eletroforese de enzimas	64
4.3.2.1 Preparo das amostras utilizadas	64
4.3.2.2 Sistemas enzimáticos	65
4.3.2.3 Determinação do padrão enzimático	65
4.3.2.4 Análise dos géis	66
4.3.3 Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPDs)	67
4.3.3.1 Obtenção de massa de promastigotas	67
4.3.3.2 Extração de DNA	67
4.3.3.3. Quantificação do DNA por eletroforese	68
4.3.3.4 Reações de RAPD-PCR	69
4.3.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida	70
4.3.4 Amplificação de repetições de sequências simples pela reação em cadeia da polimerase (SSR-PCR)	71
4.3.5 Análise dos dados e construção de fenogramas	72
4.3.6 Análise estatística dos resultados	74
4.4 ESTUDO DAS CEPAS DE <i>L. MAJOR</i> -LIKE BH49 E BH121	75
4.4.1 Comportamento em meio de cultura – curvas de crescimento	75
4.4.2 Testes de infecciosidade em camundongos BALB/c	76
4.4.2.1 Amostras de <i>Leishmania</i>	76
4.4.2.2 Animais	76
4.4.2.3 Infecção e acompanhamento dos animais inoculados	77
4.4.2.4 Análise estatística	78
4.4.3 Subtração e seleção de cDNAs específicos	78
4.4.3.1 Parasitos	78
4.4.3.2 Obtenção de mRNA	78
4.4.3.3 Síntese de cDNA	80

4.4.3.4	Ligação dos adaptadores	81
4.4.3.5	Hibridizações	84
4.4.3.6	Amplificação de cDNAs diferencialmente expressos	87
4.4.4	Clonagem, transformação e sequenciamento dos cDNAs diferencialmente expressos	88
4.4.4.1	Seleção e purificação dos cDNAs diferencialmente expressos	88
4.4.4.2	Reação de ligação	89
4.4.4.3	Transformação e plaqueamento das bactérias	89
4.4.4.4	Amplificação dos insertos e isolamento do DNA	90
4.4.4.5	Reações de sequenciamento	91
4.4.4.6	Análise das sequências em bancos de dados	92
4.4.5	RT-PCR	92
5	RESULTADOS	96
5.1	ESTUDO DAS AMOSTRAS DE <i>L. MAJOR</i> -LIKE ISOLADAS NO BRASIL	96
5.1.1	Comportamento das cepas de <i>L. major</i> -like em hamster	96
5.1.2	Eletroforese de isoenzimas	97
5.1.2	Eletroforese de isoenzimas	98
5.1.3	Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPDs)	100
5.1.4	Reação em Cadeia da Polimerase Ancorada a Repetições de Sequências Simples (SSR-PCR)	112
5.1.5	Análise estatística do RAPD-PCR e SSR-PCR	119
5.2	ESTUDO DAS CEPAS DE <i>L. MAJOR</i> -LIKE: BH49 E BH121	119
5.2.1	Comportamento em meio de cultura – Curvas de crescimento	119
5.2.2	Testes de infecciosidade em camundongo BALB/c	121
5.2.3	Seleção, clonagem e sequenciamento de cDNAs diferencialmente expressos	124
5.2.3.1	Obtenção de populações de cDNA específicos	124
5.2.3.2	Isolamento, clonagem e sequenciamento dos cDNAs diferencialmente expressos	126
5.2.3.3	Proteínas possivelmente codificadas pelos cDNAs	127
5.2.3.4	Análises por RT-PCR	129
6	DISCUSSÃO	131
6.1	ESTUDO DAS AMOSTRAS DE <i>L. MAJOR</i> -LIKE ISOLADAS NO BRASIL	131
6.2	ESTUDO DAS AMOSTRAS DE <i>L. MAJOR</i> -LIKE: CEPAS BH49 E BH121	146
6.2.1	Supressão por Hibridização Subtrativa	150
7	CONCLUSÕES	158
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	161
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
10	ANEXOS	191
	ANEXO 1 – PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.	191
	ANEXO 2- SISTEMAS DE REVELAÇÃO DE ENZIMAS.	196

1 Introdução

Apesar de estarmos há quase uma década no século XXI, as doenças causadas por parasitos, ainda representam grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e países pobres do mundo (WHO, 2006). Dentre os inúmeros parasitos de importância médica, destaca-se o protozoário *Leishmania*, que é agente de amplo espectro de doenças, coletivamente referidas como leishmanioses (VIEIRA et al., 1990; ASHFORD, 2000).

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). São geralmente zoonoses que acometem milhões de pessoas em todo o mundo, afetando populações de mais de 88 países (HERWALDT, 1999). A doença é endêmica em 4 continentes, com prevalência em áreas de clima temperado e tropical (OUMEISH, 1999). A estimativa anual de incidência da doença, no mundo, é de aproximadamente 1,5 a 2 milhões de casos, com mais de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (CROFT, 2001).

No Novo Mundo, a leishmaniose humana se apresenta basicamente sob duas formas clínicas: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). A importância das leishmanioses neste continente reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas graves, com altas taxas de mortalidade nos casos de LV não tratados e alta morbidade nos casos de LTA, que podem muitas vezes levar a lesões destrutivas e desfigurantes (DEDET e PRATLONG, 2000). As leishmanioses, sobretudo a LV, são consideradas doenças negligenciadas, também referidas como doenças esquecidas ou doenças de pobres (AULT, 2007).

No Brasil, as leishmanioses ocorrem em quase todos os estados. Ultimamente tem sido observado um aumento da incidência de ambas as formas de leishmaniose (LTA e LV) em todas as regiões geográficas do país a despeito, das medidas de controle tomadas pelo Ministério da Saúde. Provavelmente, devido a sua baixa taxa de mortalidade, a LTA não tem recebido tanta atenção das autoridades públicas como a LV, que apresenta taxa de mortalidade bem mais elevada, apesar das duas estarem incluídas entre as dez grandes endemias a serem estudadas com prioridade pela Organização Mundial de Saúde.

Nos últimos 20 anos, as estatísticas oficiais do país apontam para um aumento progressivo no número de casos de leishmanioses, com surtos descritos nas regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, configurando ampla endemicidade com nítida expansão geográfica, resultado de uma urbanização acelerada e da alteração do meio ambiente, mudanças no *status* imune das populações, falha no diagnóstico e tratamento, que segundo Dujardin (2006) constituem os principais fatores de risco responsáveis pela emergência, re-emergência e aumento na distribuição geográfica da doença. Os constantes movimentos migratórios das populações rurais carentes para as periferias das cidades, também têm favorecido este processo. Não há uma razão única para isto, e os fatores variam de uma região para outra (SHAW, 2007).

A taxonomia de *Leishmania* é complexa. Desde a criação do gênero, o número de espécies têm aumentado significativamente, assim como novos esquemas de classificação têm sido propostos. O gênero *Leishmania* abrange cerca de 30 espécies conhecidas, das quais pelo menos 21 são capazes de infectar o homem e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos (ASHFORD, 2000). A taxonomia baseou-se, primariamente, em critérios clínicos, biológicos, geográficos

e epidemiológicos. Dados imunológicos, bioquímicos e moleculares foram acrescentados para identificação de diferentes isolados de *Leishmania* (CUPOLILLO et al., 2000).

1.1 Ciclo de vida

O parasito possui um ciclo de vida heteroxênico, alternando estádios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados. Entre os hospedeiros mamíferos encontra-se grande variedade de espécies de roedores, edentados (tatu, tamanduá e preguiça), marsupiais (gambás), canídeos e primatas (LAINSON & SHAW, 1988). Os hospedeiros invertebrados são da ordem Díptera, família Psychodidae (MARTINS et al., 1978), pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2001).

Lainson & Shaw (1987) propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros – *Leishmania* e *Viannia*, considerando, dentre outros fatores, o local de desenvolvimento nos insetos vetores.

No inseto vetor, estes protozoários passam por uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas, sendo as promastigotas metacíclicas as formas infectantes. Após o repasto sanguíneo feito em hospedeiros infectados, formas amastigotas, que se encontram livres ou no interior de macrófagos presentes na pele, são ingeridas, juntamente com o sangue, infectando o vetor. O desenvolvimento de *Leishmania* spp. no tubo digestivo do vetor é complexo. Assim, diversos autores têm estudado as etapas deste desenvolvimento (KILLICK-KENDRICK, 1979; LAINSON & SHAW, 1988; BATES, 1994; LEHANE, 1997; PIMENTA et al., 1997; TERRA, 2001; ROGERS et al. 2002; GOSSAGE et al., 2003; BATES & ROGERS, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que as formas promastigotas leptomonadas, uma das formas do desenvolvimento parasitário, produzem e secretam um gel, constituído principalmente de proteofosfoglicanos, que bloqueia o lúmen intestinal (STIERHOF et al., 1999), exercendo uma pressão mecânica sobre as paredes do intestino médio torácico, dilatando-o e alterando o funcionamento da válvula do estomadoeu, o que favorece o processo de transmissão de *Leishmania*.

As formas promastigotas metacíclicas são dotadas de um flagelo longo, apresentam alta motilidade, não se multiplicam e não se aderem ao epitélio do tubo digestivo de inseto (KILLICK-KENDRICK, 1990; KILLICK-KENDRICK & RIOUX, 1991).

Durante o novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas podem ser transmitidas ao hospedeiro mamífero susceptível, o que dependerá, dentre outros fatores, da quantidade de metacíclicas presentes nas regiões próximas às peças bucais no momento do repasto sanguíneo.

No hospedeiro mamífero a infecção se dá pela picada da fêmea do vetor infectada, sendo os macrófagos, as células hospedeiras primárias de *Leishmania*. A interação *Leishmania*–macrófago envolve mecanismos complexos dependentes de múltiplos fatores dos hospedeiros mamíferos, insetos vetores, bem como do próprio parasito (KILLICK-KENDRICK, 1979). No interior do fagolisossoma ocorre a diferenciação para a forma amastigota (forma arredondada, com aproximadamente 5µm de diâmetro e flagelo inaparente), as quais podem ser destruídas pelos metabólitos oxidativos resultantes da explosão respiratória, conseqüente da ativação dos macrófagos, ou então resistirem através de mecanismos de escape, e multiplicarem por divisões binárias simples (SACKS, 1989). Quando repletos de parasitos, os macrófagos se rompem e liberam as amastigotas para o meio

extracelular, as quais são fagocitadas por outros macrófagos vizinhos, estabelecendo-se desta forma a disseminação dos parasitos por via linfática ou sanguínea. O ciclo se completa quando o vetor, ao alimentar-se no animal infectado, ingere formas amastigotas, as quais irão se diferenciar em promastigotas e multiplicar no intestino do mesmo (ASHFORD, 2000).

1.2 Leishmaniose tegumentar americana

Nas Américas, a LTA está distribuída desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, não havendo relato de transmissão apenas no Canadá, Chile, Uruguai e na maior parte das ilhas do Caribe (OUMEISH, 1999). Segundo Ashford et al. (1992), existem 39 milhões de pessoas sob risco de infecção e a incidência anual da doença é de aproximadamente 59 mil casos. Há uma grande diversidade na casuística dos diferentes países do continente. O maior número de casos ocorre no Brasil, Peru e Colômbia, embora outros relatos apontem para uma nítida expansão da doença em todo o continente Latino-Americano (SANCHEZ et al., 1992; ZELEDÓN, 1992).

No Brasil, apresenta-se em franco crescimento, tanto em magnitude como em expansão geográfica, observando-se a co-existência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores como, o acelerado processo de expansão das fronteiras agrícolas, a implantação de áreas de garimpos, a construção de estradas, o processo de invasão na periferia das cidades, entre outros (GUERRA et al., 2006). Cerca de 45 mil casos novos de Leishmaniose Tegumentar são detectados anualmente no Brasil, merecendo destaque entre as doenças transmissíveis no país, pela sua magnitude,

e pouca vulnerabilidade às medidas de controle (AMATO, 2006). A doença tem sido assinalada em praticamente todos os estados, sendo as regiões Norte e Nordeste as mais acometidas (BOSANO & CAMARGO, 2004; GUERRA, 2006). Em Minas Gerais, 401 dos 856 municípios já acusaram a presença de Leishmaniose tegumentar.

A doença consiste numa das afecções dermatológicas que merece maior atenção, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e seqüelas que pode acarretar. As manifestações clínicas da infecção dependem da espécie do parasito infectante e da resposta imune do hospedeiro, entre outros fatores. Variam desde uma forma inaparente ou subclínica, a um amplo espectro de manifestações envolvendo a pele e mucosas, com lesões sujeitas à diferentes graus de severidade (BALANÃ-FOUCE et al., 1998).

A evolução para os quadros crônicos da Leishmaniose tegumentar americana depende da espécie da *Leishmania*, da imunidade do hospedeiro e do local das lesões. A multiplicidade de espécies do parasito, a grande variedade de reservatórios/homem e vetores, que podem modular o nível da resposta imune, propiciam a existência de várias modalidades clínico-epidemiológicas da doença. As principais formas clínicas descritas são: a forma cutânea isolada, a forma mucosa tardia, a forma com lesões cutâneas e mucosas, ocorrendo simultaneamente e as formas cutânea disseminada e difusa; podendo ocorrer outras formas raras (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; SILVEIRA et al., 2005).

Considerando as espécies pertencentes aos dois subgêneros de *Leishmania* que causam leishmaniose tegumentar no Novo Mundo, Momen et al. (1993), utilizando cepas de referência do subgênero *Viannia*, em comparação com outras espécies do Velho e Novo Mundo, constataram que espécies isoladas no Novo

Mundo pertencentes a este subgênero constituem parasitos autóctones e correspondem a um grupo monofilético, em contraste com os parasitos do subgênero *Leishmania*, que parecem ser polifiléticos.

A taxonomia destes parasitos ainda é controversa. A classificação mais aceita pode ser encontrada em Lainson & Shaw (1987), acrescida pelas espécies descritas posteriormente por Lainson et al. (1989) e Silveira et al. (2002). Dentre as espécies, 15 são encontradas no Novo Mundo causando a LTA no homem (Quadro 1).

Subgênero <i>Viannia</i>		Subgênero <i>Leishmania</i>	
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Vianna, 1911	<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	Biagi, 1953
<i>L. (V.) peruviana</i>	Velez, 1913	<i>L. (L.) pifanoi</i>	Medina & Romero, 1959
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Floch, 1954	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Lainson & Shaw, 1972
<i>L. (V.) panamensis</i>	Lainson & Shaw, 1972	<i>L. (L.) garnhami</i>	Scorza et al., 1979
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Silveira et al., 1987	<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Bonfante-Garrido, 1980
<i>L. (V.) shawi</i>	Lainson et al., 1989	<i>L. (L.) major-like</i>	Momen et al., 1985
<i>L.(V.) colombiensis</i>	Kreutzer, 1991		
<i>L. (V.) naiffi</i>	Lainsoni & Shaw, 1989		
<i>L. (V.) lindenbergi</i>	Silveira et al., 2002		

QUADRO 1 – Espécies de *Leishmania* que causam Leishmaniose tegumentar americana no Novo Mundo.

No Brasil, a LTA apresenta uma diversidade de padrões epidemiológicos, o que faz com que a multiplicidade de espécies observadas, de insetos vetores e reservatórios em diferentes ambientes sejam fatores amplamente estudados para definição da epidemiologia da doença. Deve-se considerar ainda, que as manifestações clínicas e o curso da infecção dependem, sobretudo, de fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seus hospedeiros.

Dentre as numerosas espécies do gênero de *Leishmania* encontradas em mamíferos, somente um grupo também infecta e causa a LTA no homem, o que, certamente, se deve a uma combinação de fatores, incluindo a susceptibilidade intrínseca do homem à infecção e aos hábitos alimentares dos vetores de cada região.

Com diferentes padrões regionais, da Amazônia ao sul do Brasil, até o momento, oito espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, foram identificadas como causadoras de LTA humana (SHAW, 2003):

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: é a espécie mais prevalente no homem e causa lesões cutâneas e mucosas. Considerada uma zoonose, envolve mamíferos silvestres (Rodentia, Marsupialia, Edentata, entre outros) em florestas virgens. Já foi descrita desde o norte ao sul do Brasil, tanto em áreas de colonização antiga como recente. Está associada à presença de animais domésticos, e sua transmissão é feita por diferentes espécies de flebotomíneos, sendo as mais importantes a *Lutzomyia wellcomei* na região amazônica, *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L. paraensis*, *L. carrerai* e *L. migonei* em vários estados. Evidências epidemiológicas e moleculares sugerem que *L. pessoai* e *L. misionensis* também possam ser vetores em vários focos da região sudeste. A existência de pequenos mamíferos como reservatórios, associados ao extenso polimorfismo genético dessa espécie e ainda, a ocorrência de grupos regionais, indicam a multiplicidade de situações epidemiológicas relacionadas à biologia dos vetores e reservatórios;

2. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: causa predominantemente lesões cutâneas ulcerativas e ocorre na Amazônia, sobretudo na margem norte do rio Amazonas, e em áreas de colonização recente, estando relacionada com animais silvestres. O Edentata *Choloepus didactylus* (“preguiça de dois dedos”) é o principal

reservatório no norte do Brasil, sendo o *Tamandua tetradactyla* e *Didelphis marsupialis* reservatórios secundários. Os flebotomíneos envolvidos na sua transmissão são *L. umbratilis* e secundariamente *L. anduzei* e *L. whitmani*;

3. *Leishmania (Viannia) lainsoni*: Causa lesões cutâneas ulcerativas. É pouco freqüente em humanos, sendo associada ao roedor silvestre *Agouti paca* encontrado nas florestas primárias e secundárias da região amazônica. A espécie vetora é *L. ubiquitalis*, caracterizada como pouco antropofílica.

4. *Leishmania (Viannia) naiffi*: Considerada espécie amazônica, causa lesões cutâneas ulcerativas. Raramente está relacionada com infecções em humanos. Está associada com tatus (*Dasypus novemcinctus*) em florestas primárias da região amazônica e com a presença de vetores como *L. squamiventris squamiventris*, *L. paraensis* e *L. ayrozai*;

5. *Leishmania (Viannia) shawi*: Distribuída na região sul do rio Amazonas. Causa lesões cutâneas simples e está associada com diferentes ordens de animais silvestres, incluindo variedade de mamíferos (*Cebus apella*, *Chiropotes satanus*, *Choloepus didactylus*, *Bradypus tridactylus*, *Nasua nasua*) presentes nas florestas primárias da região amazônica. Muitos casos de infecções em humanos já foram relatados nos estados do Pará e Maranhão, sendo caracterizada nessas localidades como espécie responsável por zoonose peridoméstica. O vetor encontrado na região é *L. whitmani*;

6. *L. (Viannia) lindenbergi*: Descrita recentemente por Silveira e colaboradores (2002), esta espécie foi responsável por casos de leishmaniose cutânea em moradores da região amazônica. A *L. antunesi* foi considerada um possível vetor, sendo o reservatório ainda não conhecido;

7. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: causa lesões cutâneas e ocasionalmente a forma difusa, estando associada com roedores silvestres e marsupiais. São poucos os casos humanos, embora nos últimos anos tem aumentado o registro desta espécie no homem, sobretudo na Amazônia. É encontrada na bacia amazônica e também nos estados do Maranhão, Bahia, Minas Gerais e Goiás. Os vetores incriminados são *L. flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca nociva*;

8. *L. major-like*: assim designada por ser semelhante à *L. major* do Velho Mundo. Os vetores e hospedeiros dessa espécie ainda não estão bem caracterizados. A origem de casos autóctones ainda não está estabelecida. É possível que esta espécie represente parasitos neotropicais ou que tenha sido importada do Velho Mundo para países do continente americano, estabelecendo um ciclo de transmissão indígena.

Leishmania major, embora não pertencente às espécies do Novo Mundo será apresentada, devido à ocorrência da *L. major-like* no Brasil e outros países da América, cuja origem ainda não foi estabelecida. No Velho Mundo, a *L. major* destaca-se entre as principais espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea. O hospedeiro reservatório primário é o *Rhombomys opimus*, abundante na região e o principal vetor, *Phlebotomus papatasi*. Tem sido particularmente estudada na região central da Ásia e norte da África, onde é comumente responsável pelos casos de leishmaniose mucocutânea (DONDJI et al., 1998; KNIO et al., 2000; MOTAZEDIAN et al., 2002; AI-JAWABREH et al., 2004). Nestes continentes, são bem caracterizados focos endêmicos estáveis da leishmaniose cutânea, ocorrendo como zoonose e antroponose, causados principalmente por *L. major* e também *L. tropica*. (NEOUIMINE, 1996).

1.3 *Leishmania major*-like no Novo Mundo

Infecções em humanos por *L. major*-like têm sido relatadas em alguns países do continente americano. Entretanto, sua epidemiologia não é bem conhecida e estudos de caracterização têm sido realizados visando esclarecer a origem deste parasito (GRIMALDI et al., 1989; KATAKURA et al., 1993; SHAW et al., 2003).

Esta espécie tem sido alvo de estudos comparativos com diferentes espécies do Novo e Velho Mundo. Em muitos casos, amostras de *L. major*-like são comumente caracterizadas como do complexo *L. mexicana*, devido à existência de características semelhantes entre essas espécies, como desenvolvimento em vetores, morfologia das formas promastigotas e amastigotas, crescimento em meios de cultura e padrão de lesão em animais de laboratório (LAINSON, 1983).

O primeiro estudo a relatar a ocorrência de *L. major*-like no Novo Mundo foi realizado por Momen et al. (1985), que estudando amostras de *Leishmania* sp. isoladas de diferentes regiões geográficas do Brasil observaram, através da análise de zimodemas, esquizodemas e reatividade com anticorpos monoclonais, que algumas amostras estudadas apresentavam diferenças fenotípicas com relação às amostras dos complexos *L. mexicana*, *L. braziliensis* e àquelas do complexo *L. donovani*, as quais são consideradas as espécies primariamente relacionadas à leishmaniose cutânea nas Américas. O padrão de esquizodemas apresentado por estas amostras foi diferente daquele das espécies do complexo *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. donovani* e também, considerado diferente ao de *L. major*. Entretanto, neste mesmo estudo, semelhanças fenotípicas, detectadas pelas técnicas de eletroforese de enzimas e reatividade com anticorpos monoclonais, foram observadas, quando as amostras foram comparadas com as cepas-referência

de *L. major*. Isto levou os autores a sugerirem a existência de um tipo de *Leishmania* no Brasil, ainda não caracterizado, semelhante a *L. major*, que eles denominaram de *L. major-like*. Estes autores ressaltaram a importância de se utilizar cepas-referência do Velho Mundo, em particular de *L. major*, em estudos de caracterização de *Leishmania* sp. isoladas no Novo Mundo.

Grimaldi et al. (1989) estudando a distribuição geográfica e a epidemiologia das leishmanioses em diversos países do Novo Mundo, detectaram, no Equador, amostras de *Leishmania* sp. com características fenotípicas diferentes de todas as outras espécies do Novo Mundo identificadas anteriormente, o que indicou a possibilidade da presença de espécies características do Velho Mundo, “como por exemplo a *L. major*”, em países do Novo Mundo.

Em 1991, Hashigushi et al. (1991), isolaram amostras de *L. major-like* no Equador, que apresentaram um padrão de zimodema semelhante ao da cepa de referência de *L. major* empregada. Estas amostras mostraram-se reativas aos anticorpos monoclonais específicos para *L. major*, ausentes nas outras espécies estudadas. Resultado semelhante foi observado para os esquizodemas, os quais foram diferentes das outras espécies, incluindo a cepa-referência de *L. major*, e semelhantes ao grupo de parasitas *L. major-like* anteriormente descritos no Brasil.

Na Venezuela, *L. pifanoi* foi originalmente associada à leishmaniose cutânea difusa no país (SCORZA et al., 1985; GRIMALDI et al., 1989). Hashigushi et al. (1991) estudando uma cepa de *L. pifanoi* proveniente de um caso de leishmaniose cutânea difusa mostraram, através de técnicas moleculares, que a mesma era fenotipicamente similar à cepa de referência de *L. major*.

Katakura et al. (1993) analisando o cariótipo de amostras de *Leishmania* sp. semelhantes à *L. major-like*, isoladas no Equador, concluíram que as amostras

apresentavam diferenças significativas com relação à organização do DNA genômico quando comparado à *L. major*.

No Paraguai, Yamasaki et al. (1994), estudando amostras isoladas de pacientes com leishmaniose cutânea, observaram padrões de zimodemas idênticos e pequenas diferenças no perfil de esquizodemas com relação à *L. major*. Os autores ressaltam que as variações encontradas nos padrões de esquizodemas, poderiam resultar da heterogeneidade ou de uma divergência nos minicírculos do kDNA.

De acordo com Shaw (1994), que também identificou amostras de *L. major*-like no Peru, existem cepas de *Leishmania* no Novo Mundo, pertencentes ao subgênero *Leishmania* que são, de fato, muito similares, mas não idênticas à *L. major*.

Recentemente, Calvopina et al. (2006) estudando a variação fenotípica de amostras de *Leishmania* sp. isoladas no Equador, detectaram, através do padrão de zimodemas, dois isolados similares à *L. major* e os caracterizaram como *L. major*-like.

Esses dados indicam que amostras de *L. major*-like podem estar distribuídas por vários países do continente americano, e que a existência desse parasito como agente causador da leishmaniose cutânea deve ser considerada em estudos de identificação de isolados de *Leishmania* sp. do Novo Mundo, e também na investigação epidemiológica da LTA.

1.4 Caracterização do gênero *Leishmania*

Leishmania é provavelmente o gênero de protozoário que contém o maior número de espécies patogênicas para o homem, o que leva a um grande número de

estudos taxonômicos e epidemiológicos em busca de metodologias e técnicas de tipagem capazes de identificar diferentes espécies e até mesmo cepas dentro das espécies.

Até os anos 70, os estudos sobre a história natural das leishmanioses se baseavam em métodos utilizados na clínica, na epidemiologia e na ecologia de populações. A análise dos resultados obtidos com a identificação e o estudo do comportamento nos hospedeiros naturais e nos vetores das leishmanioses serviram para subsidiar programas de controle dessas endemias. Apesar, dos estudos clínico-epidemiológicos de isolados de *Leishmania* ampliarem o conhecimento da biologia parasitária e dos aspectos clínicos da doença, os métodos empregados se mostraram limitados principalmente com relação à identificação e caracterização das espécies dentro do gênero.

Atualmente, estudos envolvendo técnicas bioquímicas e de biologia molecular têm sido comumente utilizados em busca do conhecimento e caracterização de novos marcadores taxonômicos mais estáveis, utilizando-se de características intrínsecas, que não são modificadas ou influenciadas por fatores do hospedeiro e do meio ambiente.

Estudos envolvendo a caracterização de espécies de *Leishmania* utilizando critérios bioquímicos/moleculares e imunológicos incluem: fator de excreção (SCHNUR, 1982), eletroforese de enzimas (THOMAZ-SOCCOL et al., 1993; CUPOLILLO et al., 1994), análise de carboidratos de superfície por aglutinação com lectinas (JACOBSON et al., 1982), análise da composição lipídica (HOLTZ & BEACH, 1982), reatividade de anticorpos monoclonais com antígenos espécie-específico do parasito (SHAW et al., 1986; GRIMALDI & McMAHON-PRATT, 1996), análise da densidade de flutuação do DNA do cinetoplasto e do núcleo (CHANCE et

al., 1978), análise do perfil de restrição do kDNA (PACHECO et al., 1986), hibridização com sondas moleculares espécie-específicas (GUIZANI et al., 1994), cariotipagem molecular (TAVARES et al., 1992), análise de diferentes regiões do DNA nuclear, por sequenciamento ou por polimorfismo gerado por enzimas de restrição – RFLP (FERNANDES et al., 1994; MENDOZA-LEON et al., 1995), polimorfismo pela amplificação aleatória de DNA polimórfico – RAPD (TIBAYRENC et al., 1993; GOMES et al., 1995), estudo de genes específicos (OUAKAD et al., 2007) entre outros.

Das ferramentas empregadas na identificação e caracterização destes parasitos, algumas são úteis para estudos de populações específicas ou grupo de indivíduos ocorrendo numa determinada área, outras são melhores para estudos taxonômicos. Ao longo dos anos, novas técnicas se tornaram disponíveis sendo que a escolha do método a ser utilizado depende, dentre outros fatores, do nível de distinção ou associação que se deseja observar entre os organismos. Nenhuma técnica deve ser utilizada de forma isolada para caracterização de espécies de *Leishmania* devido à complexidade do gênero. Além disso, embora novas técnicas forneçam meios mais diretos e absolutos para classificar os organismos, é importante uma abordagem mais ampla, agrupando dados bioquímicos e moleculares a outras características das espécies de *Leishmania*, tais como a manifestação clínica, o comportamento biológico nos diferentes tipos de hospedeiros, bem como a distribuição geográfica das espécies de parasitos, reservatórios e vetores.

Métodos como a análise de isoenzimas, análise do polimorfismo de kDNA e de determinados genes, têm mostrado ser ferramentas muito úteis no estudo

taxonômico e evolutivo destes parasitos, alguns mostrando sensibilidade suficiente para determinarem polimorfismo dentro de uma população.

A difusão do uso de isoenzimas ocorreu através do desenvolvimento de métodos eficientes para visualização do produto enzimático e da aplicabilidade imediata encontrada em várias áreas da biologia. Estudos clássicos de genética de populações tiveram um efeito significativo na disseminação da técnica de análise isoenzimática, a qual tem sido aplicada em um grande número de organismos com o objetivo de responder as mais diversas questões genéticas.

Em *Leishmania* muitos estudos utilizando isoenzimas já foram descritos (CUPOLILLO et al., 1994; BICHICHI et al., 1999; KNIO et al., 2000; ZHANG et al., 2006). O primeiro foi realizado por Gardener et al. (1974) que, estudando amostras de origens variadas, observaram diferentes tipos de perfis enzimáticos da malato desidrogenase (MDH). Posteriormente, Chance et al. (1978) estenderam o estudo para as enzimas glicose fosfato isomerase (GPI), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfo-glicodesidrogenase (6PGD).

Vários autores utilizaram a técnica de isoenzimas em estudos taxonômicos de *Leishmania* e observaram que há um considerável grau de diversidade enzimática entre as espécies distintas e uma variabilidade significativamente menor, ou mesmo não detectável, entre membros de um mesmo complexo (MILES et al., 1981; MOMEN et al., 1987; GRIMALDI et al., 1991).

Um estudo realizado no estado do Espírito Santo, Brasil, envolvendo 100 amostras de *Leishmania* sp. isoladas de LTA de humanos e cães, mostrou o mesmo perfil de zimodema e sorodema (anticorpos monoclonais) das amostras estudadas em comparação a uma cepa referência de *L. (Viannia) braziliensis*. Em contraste, análise de genotipagem no mesmo estudo revelou variações intraespecíficas entre

as cepas, o que reflete a importância de se avaliar fatores eco-epidemiológicos da transmissão desses parasitos (FALQUETO et al., 2003). Atualmente, este método é amplamente utilizado na identificação e classificação do gênero *Leishmania*. A caracterização de amostras de *Leishmania* através da eletroforese de isoenzimas associada à taxonomia numérica contribui para o conhecimento dos focos de infecção, da biogeografia dos parasitos e da eco-epidemiologia das leishmanioses.

Estudos utilizando ácidos nucléicos – DNA do núcleo e do cinetoplasto e RNA – também têm sido realizados para detecção, tipagem e caracterização de *Leishmania*, permitindo diagnosticar a doença, a infecção em insetos vetores e reservatórios, o acompanhamento do tratamento e a análise da variabilidade genética dos parasitos (SINGH et al., 1999).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) amplamente utilizada como ferramenta para diagnóstico, análise e caracterização de organismos também tem sido comumente empregada em estudos com *Leishmania* (ERESH et al., 1994; BELLI et al., 1998; AVILES et al., 1999). Neste gênero, as principais aplicações da PCR são basicamente no diagnóstico da doença, a partir de amostras clínicas, na epidemiologia, através da detecção do parasito em possíveis vetores e reservatórios, e na caracterização de amostras isoladas, podendo inclusive ser estudadas as similaridades entre elas e estabelecidas correlações filogenéticas.

Os estudos taxonômicos e filogenéticos dos agentes causadores das leishmanioses no Novo Mundo são extremamente dificultados pela considerável diversidade genética observada entre as espécies. Com o emprego da PCR, o grande volume de material genético amplificado veio facilitar estes estudos. Devido à alta especificidade e sensibilidade da técnica, foi possível o desenvolvimento de

vários sistemas de aplicação que podem ser utilizados tanto na detecção, quanto na caracterização genética de *Leishmania* (DEGRAVE et al., 1994).

Técnicas alternativas foram descritas com o objetivo de combinar a alta sensibilidade da PCR com a hipervariabilidade dos produtos, onde o conhecimento prévio do genoma a ser analisado não é necessário. Assim, muitos grupos de pesquisadores têm utilizado a técnica de PCR com iniciadores aleatórios (AP-PCR – *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*), na qual os produtos obtidos são conhecidos como RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). O polimorfismo gerado através do RAPD tem sido muito utilizado na identificação de marcadores moleculares (WILLIAMS et al., 1990), porém a procura de um marcador ligado a um loco em particular é normalmente encontrada depois de se examinar centenas de marcadores (CAETANO ANOLES, 1993).

As estratégias de amplificação aleatória como RAPD, AP-PCR e DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) utilizam oligonucleotídeos aleatórios para reconhecer sítios específicos, porém desconhecidos no genoma, muitos dos quais são polimórficos. Estas técnicas se diferenciam basicamente pelo tamanho dos iniciadores, o rigor de amplificação e o procedimento usado para resolver os padrões de DNA. Essas estratégias são baseadas na amplificação de DNA de numerosos locos aleatórios, quando iniciadores de sequências arbitrárias suficientemente curtas são usados.

O RAPD tem sido extensivamente usado em estudos de epidemiologia molecular. Entretanto, a natureza da técnica limita sua aplicação. A validade molecular de RAPD em inferências filogenéticas tem sido questionada por alguns autores (BACKELJAU et al., 1995; SMITH et al., 1994). O ganho ou perda de bandas pode ocorrer devido a uma variedade de mecanismos, incluindo a mutação dos

sítios de ligação dos iniciadores e inserções ou deleções que podem alterar o tamanho do fragmento.

Apesar destas considerações, a técnica de RAPD tem sido muito utilizada na caracterização genética de uma variedade de parasitos e seus resultados têm sido concordantes com a análise de zimodemas (MORGAN et al., 1993; TIBAYRENC et al., 1993). Tibayrenc et al. (1993) mostraram que a técnica de RAPD é uma ferramenta bastante interessante no estudo de populações de protozoários parasitos. Estes estudos revelaram a existência de uma correlação entre alelos amplificados (ou amplicons) dentro de uma população, podendo ser usados em análises filogenéticas. Gomes et al. (1995) utilizando as técnicas de RAPD-PCR e DNA *fingerprinting* mostraram que amostras de *Leishmania (V.) braziliensis* isoladas em Minas Gerais constituíam um grupo relativamente homogêneo, em contraste com os isolados do Pará que apresentaram altos índices de variabilidade genética.

A técnica de RAPD foi utilizada com sucesso por Motazedian et al. (1996) para distinguir as principais espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (*L. tropica*, *L. major* e *L. infantum*), e para estudar amostras de *Sauroleishmania*, provenientes do Irã. Em 2002, Motazedian e colaboradores, estudando amostras de *Leishmania* isoladas de diferentes províncias no Irã, constataram, através da técnica de RAPD, alterações na epidemiologia da leishmaniose cutânea na região.

O RAPD, assim como a análise isoenzimática é uma ferramenta que pode ser utilizada para o estudo de qualquer organismo, permitindo fazer comparações diretas sobre diversidade genética e estrutura de populações entre organismos diferentes. O RAPD parece ter uma melhor resolução que isoenzimas e pode ser usado para complementá-las e para refinar o quadro da diversidade genética dentro de cada subdivisão de uma espécie (TIBAYRENC, 1995).

Outra variante da técnica de PCR baseia-se em Repetições de Sequências Simples (SSR-PCR), a qual se caracteriza pela amplificação de repetições distribuídas ubiquamente no genoma eucarioto, em *tandem*, constituídas de sequências curtas com poucos nucleotídeos (1 a 6 pb), chamadas de microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*). Os microssatélites são encontrados em um grande número de locos no genoma de grande variedade de organismos (ESTOUP et al., 1993; TAUTZ, 1989).

Os genomas eucariotos são densamente povoados de sequências repetidas, umas mais complexas (minisatélites), outras mais simples (microssatélites) (HAMADA et al., 1982; TAUTZ & RENZ, 1984). Os microssatélites estão amplamente distribuídos no genoma de eucariotos (BECKMAN & WEBER, 1992) e são altamente polimórficos (WEBER & MAY, 1989; TAUTZ, 1989). A identificação de marcadores polimórficos aumentou significativamente com a descoberta dos microssatélites, sendo considerados os marcadores úteis para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações, oferecendo uma alternativa metodológica para o estudo de variabilidade genética intra-específica de *Leishmania*.

Microssatélites já foram descritos em *Leishmania* (ROSSI et al., 1994). Estes autores identificaram três tipos de sequências de microssatélites (CA)_n, (GAC)_n e (GGT)_n no genoma de *Leishmania*. Observaram que estes microssatélites não estão distribuídos igualmente no genoma, sendo que a abundância de cada repetição varia entre diferentes cromossomos. Foi também observado que alguns destes microssatélites pareciam estar associados, e que alguns dos locos seqüenciados são alelos polimórficos, sendo estes, úteis como marcadores genéticos nestes parasitos. Zietkiewicz et al. (1994) indicaram a amplificação de SSR como uma

ferramenta útil no estudo da taxonomia e mapeamento genético de diversas espécies. Oliveira et al. (1997), testaram a técnica da SSR-PCR em estudos com alguns parasitos e observaram padrões altamente polimórficos e discriminativos para cepas de *Trypanosoma cruzi*, *L. braziliensis* e *Schistosoma mansoni*. A informatividade dos padrões obtidos foi comparável à da AP-PCR, apresentando maior reprodutibilidade, em decorrência da utilização de condições de alta stringência. Entretanto, Gomes et al. (1998) compararam a aplicabilidade das técnicas de SSR-PCR e de AP-PCR no estudo de cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos e demonstraram níveis de polimorfismo genético semelhantes para ambas as técnicas.

A amplificação de DNA utilizando o segmento com as repetições inter-microsatélites foi empregada no laboratório de Biologia de *Leishmania* (Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG) para estudos com diferentes espécies de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo (PIMENTA et al., 1998; GONTIJO et al., 2000). Foi observado que o subgênero *Viannia* é mais homogêneo que o subgênero *Leishmania* e que dentro deste, o complexo *L. donovani* foi o mais homogêneo. Volpini et al. (2001), empregaram a técnica de SSR-PCR para estudar espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose tegumentar no Novo Mundo. E, recentemente, Ochsenreither et al. (2006), demonstraram que alguns locos que contêm microsatélites na família Tripanosomatidae são estáveis em condições de laboratório e podem ser usados com segurança para demonstrar variabilidade genética intraespecífica.

Outra fonte de estudo que vem cada vez mais se ampliando em busca do conhecimento de características intrínsecas das espécies de *Leishmania* e entendimento da patogênese desses organismos é a pesquisa de genes específicos

e expressão nestes patógenos. O desenvolvimento da pesquisa genômica revela a importância da coordenação e análise da vasta informação acumulada com vistas à biologia e evolução do organismo estudado.

Em *Leishmania*, o desenvolvimento da pesquisa genômica promete tornar-se um instrumento fundamental para a busca de métodos eficientes de tratamento e prevenção da leishmaniose, uma doença de importância epidemiológica indiscutível.

A técnica de sequenciamento tem sido aplicada e explorada em busca de maiores informações sobre a sequência de DNA de *Leishmania* a fim de otimizar o diagnóstico e a identificação das espécies. Dados do genoma, utilizados em técnicas de clonagem de antígenos e genes seqüenciados têm sido empregados para sorodiagnóstico e desenvolvimento de vacinas (SCHALLING & OSKAM, 2002). Em 1994, estabeleceu-se, no Rio de Janeiro-RJ, o centro de projetos de sequenciamento do genoma deste parasito, o – *Leishmania Genome Network* (LGN), que visou o sequenciamento do genoma da cepa de referência *Leishmania major* Friedlin (IVENS & BLACKWELL, 1999), comumente utilizada em estudos de sequenciamento (MYLER et al., 2000). Em 2005, o genoma deste parasito estava completamente seqüenciado e toda informação a respeito da sequência de DNA, assim como das proteínas preditas se encontravam disponíveis (IVENS et al., 2005; www.genedb.org).

O projeto genoma de *Leishmania* veio acumulando informações acerca da estrutura e organização do genoma deste parasito e se concentra agora no sequenciamento, não só da *L. major*, mas também das espécies, *L. infantum* e *L. braziliensis* (PEACOCK et al., 2007). Estratégias de análise funcional também começam a aparecer. É importante ressaltar que os estudos de sequências e estruturas do genoma e, mais recentemente, a tónica funcional devem estar

permeados pela preocupação com as particularidades genéticas desse organismo. A determinação de sequência e a caracterização de estruturas do genoma devem ser utilizadas também para se pesquisar a relevância fenotípica da informação gerada.

Com a disponibilização de informações sobre a sequência do DNA de *Leishmania*, diversos estudos relacionados à análise de expressão gênica e estudos de proteômica se desenvolveram em torno desse parasito, muitos deles, focando principalmente a expressão diferencial nos diferentes estágios durante o ciclo de vida de *Leishmania* (AKOPYANTS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; COHEN-FREUE et al., 2007; HOLZER et al., 2006; LEIFSO et al., 2007; OUAKAD et al., 2007; SAXENA et al., 2003; SAXENA et al., 2007).

Uma técnica com uso ainda restrito – **Supressão por Hibridização Subtrativa (*Suppression Subtractive Hybridisation – SSH*)** tem sido utilizada como importante ferramenta na caracterização de genes diferencialmente expressos em células e tecidos e representa uma importante metodologia para caracterização e entendimento da patogênese, ao nível de espécie, podendo ser utilizada para identificação de genes específicos, que possam determinar virulência, resistência à drogas, poder de infecciosidade, patogenicidade, entre outros.

Esta técnica baseia-se na seleção de cDNAs diferencialmente expressos e combina hibridizações de DNA e reações de PCR para identificar genes que são expressos apenas em células e tecidos de interesse. Ela ainda possibilita que genes altamente expressados não sejam clonados e que genes específicos pouco expressados sejam selecionados (DIATCHENKO et al., 1996).

Utilizando-se desta metodologia, Charlab et al. (1999) foram capazes de selecionar e identificar genes específicos de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*. Sant'Anna et al. (2002) selecionaram, clonaram e sequenciaram cDNAs

específicos de glândulas salivares de *Triatoma braziliensis*, que codificam proteínas fundamentais no processo de alimentação do inseto. Spielmann e Beck (2000) identificaram genes estágio-específicos em *Plasmodium falciparum*. Hufton et al. (1999), Atalay et al. (2002) e Fox et al. (2004) identificaram genes diferencialmente expressos em células cancerosas em comparação com células normais e Akopyants et al. (1998) identificaram genes diferencialmente expressos em cepas patogênicas de *Helicobacter pylori*. Além disso, alguns pesquisadores utilizaram a técnica SSH em certos organismos para o estudo de genes que são expressos mediante determinados estímulos. Hao et al. (2001) descreveram genes envolvidos na expressão de peptídeos antimicrobianos em *Glossina morsitans*. Shin et al. (1998) isolaram e caracterizaram genes envolvidos na produção de peptídeos de defesa contra infecções bacterianas em *Hyphantria cunea* e Kuang et al. (1998) estudaram a expressão diferencial de genes em células cancerosas (carcinoma de seio) induzida pela adição de estrógeno. Janke et al. (2001) utilizaram a técnica de SSH para detectar diferenças na expressão gênica entre uma cepa patogênica e outra não-patogênica de *E. coli*. Nesse estudo, os autores demonstraram que a técnica foi eficiente para detectar genes de virulência presentes na cepa patogênica.

1.5 Expressão diferencial de genes em *Leishmania*

O sequenciamento do genoma de *L. major* (cepa Friedlin) revelou a presença de 36 cromossomos, 911 genes de RNA, 39 pseudogenes e 8272 genes codificadores de proteínas, dos quais 36% podem ser atribuídos a funções putativas. Várias proteínas expressas pelo genoma de *Leishmania* estão relacionadas ao processo de interação parasito-hospedeiro, tais como enzimas proteolíticas, e

também uma extensa maquinaria para síntese de complexos de glicoconjugados da superfície de membrana (IVENS et al., 2005). O sequenciamento do genoma de *Leishmania* ampliou as estratégias de estudo com relação aos genes de virulência, sobrevivência intracelular e resistência a drogas, bem como a validação funcional de proteínas, específicas do parasito, como novos alvos para quimio e imunoterapia (CORTAZAR & WALKER, 2004).

Atualmente muitos estudos têm sido realizados utilizando técnicas de *differential display* que identificam genes específicos de parasitos, assim como a expressão destes genes em diferentes condições. Em *Leishmania*, a maioria dos estudos têm focado a análise da expressão gênica durante os diferentes estágios do ciclo de vida do parasito, utilizando cDNAs obtidos tanto da forma amastigota como da forma promastigota (HANDMAN et al., 1984; QUIJADA et al., 2005; WALKER et al., 2006). Muitos desses estudos têm priorizado a identificação de genes expressos preferencialmente na forma amastigota, visto ser esta a forma de resistência no interior dos macrófagos hospedeiros e também de multiplicação do parasito nos hospedeiros mamíferos. A habilidade das amastigotas de *Leishmania* sobreviverem a mudanças drásticas de ambiente, ocorridas na célula hospedeira, está associada à atividade regulatória de uma variedade de genes (AKOPYANTS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; HOLTZER et al., 2006). A caracterização de tais genes pode constituir um passo fundamental para o entendimento do mecanismo de sobrevivência do parasito e dessa forma contribuir para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra leishmanioses.

Bellatin et al. (2002), estudando a expressão de genes específicos nas formas amastigotas e promastigotas de *L. mexicana* identificaram, através da técnica de SSH, dois genes preferencialmente expressos na forma amastigota, um dos quais

teria importante papel funcional na diferenciação ou na sobrevivência do parasito no interior do fagolisossoma. Por outro lado, Leifso et al. (2007), utilizando-se da tecnologia de *microarray* avaliaram a expressão gênica nas formas promastigotas e amastigotas de *L. major*. Os resultados demonstraram pequena diferença na expressão do RNAm das duas formas, sendo que mais de 94% dos genes são expressos em ambas as formas. Estes resultados levaram os autores a sugerirem que o genoma da *L. major* é constitutivamente transcrito nos diferentes estágios do ciclo de vida e que diferenças nos níveis de RNAm entre as formas promastigota e amastigota resultam de eventos pós-transcricionais, que determinam, principalmente, a estabilidade diferencial do RNAm. Cohen-Freue et al. (2007), estudando os níveis de expressão de RNA, através da técnica de *microarray*, quantificaram e compararam a expressão global de RNA em diferentes estágios do ciclo de vida de *Leishmania* e também observaram baixa frequência na expressão diferencial do RNAm nas formas amastigotas e promastigotas.

Dessa forma, alguns genes de *Leishmania* são constitutivamente expressos, ocorrendo número limitado de genes diferencialmente expressos durante seu desenvolvimento, seja no vetor ou no hospedeiro mamífero. Outros estudos também revelaram observação semelhante (AKOPYANTS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; HOLTZER et al., 2006; SAXENA et al., 2003; SAXENA et al., 2007).

Com relação à expressão diferencial de genes em cepas de *Leishmania* virulentas e cepas com infecciosidade atenuada, poucos trabalhos têm sido descritos. Ouakad et al. (2007), objetivando identificar genes de virulência específicos, utilizaram a técnica de *diferencial display* para comparar a expressão gênica em dois isolados de *L. major* que apresentavam diferentes níveis de virulência em camundongos BALB/c. O estudo foi realizado utilizando formas

amastigotas derivadas de lesões presentes nos animais avaliados. Um total de 13 clones distintos foi encontrado, porém não confirmados como diferencialmente expressos. Apenas genes específicos da forma amastigota, alguns já previamente caracterizados por estudos anteriores, foram identificados.

O recente sequenciamento completo do genoma de *L. major* (IVENS et al., 2005), revelou centenas de novos alvos potenciais e proteínas envolvidas na patogênese da leishmaniose. Entretanto, estratégias e técnicas cada vez mais avançadas são necessárias para a rápida identificação de tais genes. Há alguns anos, diversas moléculas responsáveis por mecanismos-chave na patogenicidade da *Leishmania* foram determinadas (DESCOTEAUX et al., 2002; JOSHI et al., 2005; ZHANG e MATLASHEWSKI, 2004; ZUFFEREY e BEM MAMOUN, 2006). A maior parte dos estudos relacionados à virulência de *Leishmania* baseia-se em clones desenvolvidos em laboratório, o que faz com que as observações provenientes desses estudos possam não se aplicar a patogenicidade natural destes parasitos no campo.

Neste estudo, a técnica de SSH foi utilizada como ferramenta para comparar e analisar possíveis genes diferencialmente expressos em formas promastigotas de *L. major*-like isoladas no Brasil e que apresentam poder de infecciosidade distintos tanto para hamsters (*Mesocricetus auratus*) quanto para camundongos BALB/c.

Duas cepas de *L. major*-like foram avaliadas: BH49 (MHOM/BR/1971/BH49), capaz de infectar animais de laboratório e BH121 (MHOM/BR/1973/BH121) que não infecta esses animais. Estas cepas foram empregadas por Mayrink et al. (1979) na vacina anti-Leishmaniose Tegumentar Americana desenvolvida no Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG. A cepa BH49 foi também utilizada em estudo para isolamento de um antígeno (LMS), aplicado no diagnóstico de leishmaniose visceral

em humanos e cães com alto poder de sensibilidade e especificidade (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002); e a cepa BH121 foi empregada no Kit-Biomanguinhos para diagnóstico de leishmaniose visceral canina e humana através da reação de imunofluorescência indireta.

~~Justificativa e Relevância~~

2 Justificativa e Relevância

A LTA no Brasil destaca-se como um importante problema de saúde pública, principalmente pelo processo crescente de urbanização da doença. O controle da LTA depende do conhecimento de vários aspectos de sua epidemiologia, que pode apresentar características peculiares para cada foco em questão.

Várias espécies de *Leishmania* têm sido registradas no Brasil e em outros países da América Latina como causadoras da LTA, dentre elas a *L. major-like*, cujos vetores e hospedeiros ainda não estão caracterizados. Embora semelhanças bioquímicas e moleculares desta espécie com a *L. major* do Velho Mundo tenham sido relatadas, a origem deste parasito no Novo Mundo ainda não está bem estabelecida. Se a espécie representa parasitos neotropicais ou parasitos importados para o Brasil, que estabeleceram um ciclo de transmissão indígena, é um fato que ainda não foi comprovado.

Estudos envolvendo cepas de *L. major-like* isoladas no Brasil tornam-se fundamentais para o conhecimento do parasito, como espécie autóctone ou importada do Velho Mundo, contribuindo ainda para a determinação do quadro eco-epidemiológico da LTA no país.

Neste trabalho foram utilizadas técnicas biológicas e moleculares que contribuíram para a caracterização de amostras de *L. major-like* isoladas no Brasil, em comparação com amostras de *L. major*.

Duas das amostras de *L. major-like* foram especialmente estudadas. Estas cepas, que foram utilizadas na vacina anti-LTA (MAYRINK et al., 1979; ANTUNES et al., 1986) e também em kits para diagnóstico de leishmaniose visceral (BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002) apresentam diferente perfil de infecciosidade em camundongos BALB/c, quando avaliadas em experimentos “in vivo”. Por isso além

de serem estudadas quanto à variabilidade genética através de técnicas moleculares, comportamento “in vitro” e “in vivo”, as duas cepas foram também avaliadas quanto à expressão diferencial de genes. A determinação de genes específicos destas amostras, além de contribuir para caracterização da espécie, poderá fornecer importantes dados para o conhecimento da patogênese do parasito, os quais poderiam ser utilizados como alvo para o desenvolvimento de drogas e vacinas contra leishmaniose, além de levar a um melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro.

Objetivos

3 Objetivo Geral

Caracterizar cepas de *L. major*-like isoladas no Brasil utilizando técnicas de biologia celular e molecular, em comparação com outras espécies do Novo e Velho Mundo, sobretudo a *L. major*.

Estudar e comparar genes diferencialmente expressos em duas cepas de *L. major*-like – BH49 (MHOM/BR/1971/BH49) e BH121 (MHOM/BR/1973/BH121), com poder de infecciosidade distintos para camundongos BALB/c.

3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar as amostras de *L. major*-like através de técnicas biológicas – crescimento “in vivo” e “in vitro”;
- Analisar polimorfismo de DNA utilizando marcadores genéticos gerados por RAPD, SSR-PCR e análise isoenzimática;
- Determinar as relações fenéticas entre as amostras utilizando a taxonomia numérica;
- Investigar a existência de correlação entre os marcadores encontrados e os zimodemas das amostras;
- Estudar as cepas de *L. major*-like BH49 e BH121, integrantes da vacina anti-LTA, utilizando a técnica de SSH (*Supression Subtraction Hybridization*), como ferramenta para seleção de cDNAs diferencialmente expressos;
- Clonar e sequenciar os cDNAs obtidos pela técnica de SSH;
- Comparar os cDNAs obtidos com o genoma de *L. major* e identificar possíveis proteínas, diferencialmente expressas, nas duas cepas de *L. major*-like BH49 e BH121.

~~Material e métodos~~

4 Material e Métodos

4.1 Parasitos

Foram utilizadas cepas de *L. major*-like e *L. major* isoladas no Brasil e cepas de referência preconizadas pela WHO. Com exceção da cepa BH49 isolada de caso de leishmaniose tegumentar humana no estado de Goiás, as demais cepas de *L. major*-like foram procedentes de casos humanos de leishmaniose tegumentar da região do Vale do Rio Doce-MG, de indivíduos que nunca viajaram para fora do Brasil. A cepa BH70 foi isolada de pele de cão procedente da mesma área. Os pacientes, dos quais foram isoladas as cepas caracterizadas como *L. major*, se infectaram no Iraque, na região de Basra, tiveram suas cepas isoladas em Belo Horizonte – MG. As amostras encontraram-se criopreservadas e mantidas no Criobanco de cepas do laboratório de Biologia de *Leishmania* no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais e também no criobanco da London School of Hygiene and Tropical Medicine – University of London. O QUADRO 2 mostra as cepas utilizadas no presente estudo.

DENOMINAÇÃO	CÓDIGO INTERNACIONAL	ESPÉCIE
BH10	MHOM/IQ/1985/BH10	<i>L. (Leishmania) major</i>
BH12	MHOM/IQ/1985/BH12	<i>L. (L.) major</i>
BH13	MHOM/IQ/1985/BH13	<i>L. (L.) major</i>
BH15	MHOM/IQ/1985/BH15	<i>L. (L.) major</i>
BH49	MHOM/BR/1971/BH49	<i>L. (L.) major-like</i>
BH70	MCAN/BR/1973/BH70	<i>L. (L.) major-like</i>
BH121	MHOM/BR/1973/BH121	<i>L. (L.) major-like</i>
BH122	MHOM/BR/1982/BH122	<i>L. (L.) major-like</i>
BH129	MHOM/BR/1986/BH129	<i>L. (L.) major-like</i>
BH135	MHOM/BR/1986/BH135	<i>L. (L.) major-like</i>
PH8	IFLA/BR/1968/PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i>
M379	MNYC/BZ/1962/M379	<i>L. (L.) mexicana</i>
M2903	MHOM/BR/1975/M2903	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>
M1176	MHOM/BR/1970/M1176	<i>L. (V.) guyanensis</i>
K27	MHOM/SU/1974/K27	<i>L. (L.) tropica</i>
5ASKH	MHOM/SU/1973/5ASKH	<i>L. (L.) major</i>
FN	MHOM/IL/1980/Friedlin	<i>L. (L.) major</i>
LS94*	MHOM/PA/1971/LS94	<i>L. (V.) panamensis</i>
JISH118*	MHOM/SA/1985/JISH118	<i>L. (L.) major</i>

QUADRO 2: Amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no presente estudo.

■ Cepas de *L. major* ■ Cepas de *L. major-like* ■ Cepas de referência da OMS

* Cepas de referência utilizadas somente na técnica de eletroforese de enzimas.

4.2 Estratégia de estudo

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao comportamento em hamster, quanto ao perfil isoenzimático e quanto ao perfil genômico gerado

pelas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR. As cepas de *L. major*-like - BH121 e BH49 foram estudadas quanto ao comportamento na pele de hamster, caracterizadas genomicamente, como as demais, através da técnica de RAPD-PCR e de SSR-PCR e ainda avaliadas quanto ao comportamento “in vitro” e “in vivo” - crescimento em meio de cultura e infecção de camundongos BALB/c, padrão isoenzimático e também pela expressão diferencial de genes.

Com o objetivo de avaliar o comportamento da amostra BH49 criopreservada após várias passagens em meio de cultura e a mesma cepa recém-isolada após infectar hamster (*Mesocricetus auratus*), a amostra foi estudada, pelas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR, nas duas subpopulações: uma criopreservada (BH49c) e outra recém-isolada de lesão de hamsters (BH49i), onde normalmente a cepa é mantida “in vivo”.

A figura 1 mostra esquematicamente a estratégia de estudo empregada.

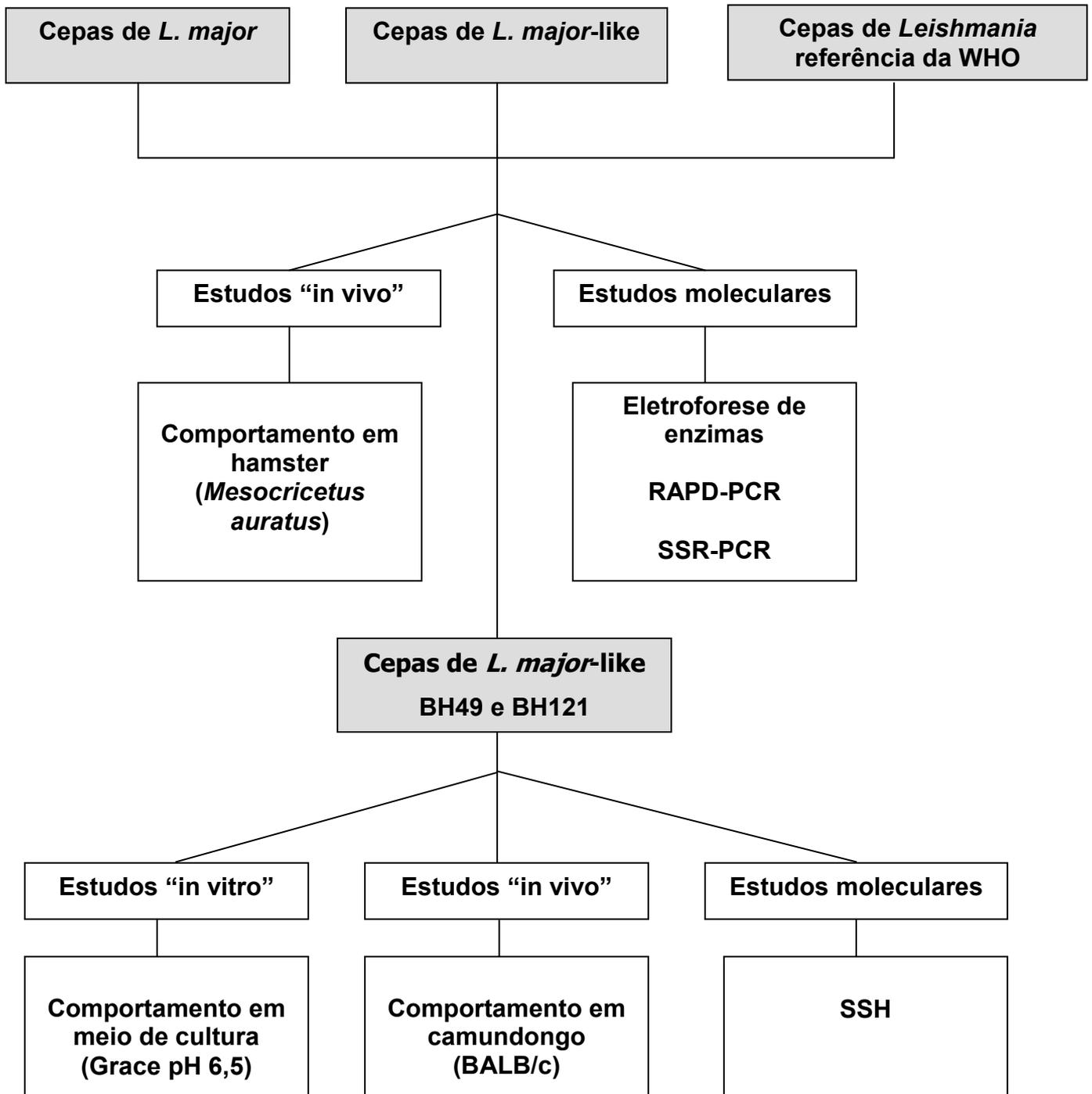


FIGURA 1 – Esquema da estratégia de estudo utilizada.

4.3 Estudo das amostras de *L. major*-like isoladas no Brasil

4.3.1 Comportamento das cepas de *Leishmania* sp. em hamster

4.3.1.1 Animais

Foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG. Estes animais foram experimentalmente infectados intradermicamente na pele do focinho com as cepas em estudo. Para cada cepa estudada foram utilizados grupos de 5 animais.

4.3.1.2 Infecção e acompanhamento dos animais

As cepas foram descongeladas, crescidas em meio de Grace (GIBCO BRL, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cutilab – Brasil) e de antibióticos (penicilina G potássica: 100 unidades/mL e estreptomicina: 50µg/mL). Os parasitos foram centrifugados duas vezes em salina tamponada – PBS (ANEXO 1), a 4°C, por 10 minutos, a 1800xg. O sedimento final foi ressuspenso em 1mL de PBS e os parasitos foram então contados em câmara de Neubauer, utilizando isoton (ANEXO 1).

Os animais foram inoculados intradermicamente com seringa tipo insulina, no focinho com 0,1mL de uma suspensão contendo 1×10^7 promastigotas/mL de salina para cada animal, provenientes do início da fase estacionária de crescimento. Depois de inoculados, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia ICB-UFMG, acondicionados em grupos de 5, em gaiolas plásticas e à temperatura ambiente. A alimentação era

composta de ração balanceada (Purina-Brasil) e água “ad libitum”. Após as inoculações, os animais foram acompanhados semanalmente durante 10 semanas para se observar a evolução da infecção, o tempo de aparecimento das lesões, ulcerações, metástases e visceralizações. A avaliação para detecção das lesões metastáticas cutâneas consistiu basicamente no exame das orelhas, patas traseiras e dianteiras, cauda, pele e genitália dos animais.

O exame clínico dos hamsters se iniciou na primeira semana após a inoculação. Foi avaliada a presença de lesão no local da inoculação através da observação macroscópica da área inoculada. Na quarta semana, dois animais foram escolhidos aleatoriamente, sacrificados e a presença de amastigotas foi pesquisada fazendo-se esfregaços por aposição do material colhido durante a autópsia do local de inoculação, da medula óssea e das vísceras (baço e fígado), através da compressão do fragmento de tecido sobre uma lâmina de microscopia, depois de retirado o excesso de exsudato e sangue em papel de filtro. Com material de medula óssea, colhido do fêmur, foi feito um esfregaço. Após a secagem natural, as preparações foram fixadas com metanol absoluto até a completa evaporação e coradas pelo Giemsa.

4.3.1.3 Coloração e documentação fotográfica

Para coloração pelo Giemsa, às preparações foram adicionadas duas gotas de solução corante para cada mililitro de solução tampão fosfato pH 7,4 (ANEXO 1). Após 20 minutos, as preparações foram examinadas ao microscópio óptico, com objetiva de imersão, sendo considerados negativos quando nenhuma amastigota era encontrada em cem campos dos *imprints*.

Tanto os esfregaços como as lesões que apareceram nos animais foram fotografadas utilizando-se filme Kodak Gold 100 ISO (35mm) e filme Kodak Plus X Pan 125.

4.3.2 Eletroforese de enzimas

4.3.2.1 Preparo das amostras utilizadas

À massa de células obtida após lavagem com PBS adicionou-se igual volume de uma solução aquosa hipotônica contendo estabilizadores de enzimas (ácido ϵ -aminocapróico 2mM, ditioneitol 2mM, ácido etilenodiamino tetracético de sódio – EDTA 2mM) pH 7,0 a 4°C. A suspensão foi homogeneizada e então, congelada e descongelada três vezes em nitrogênio líquido e água a 37°C. O lisado foi centrifugado a 3000xg durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo o extrato enzimático foi congelado em nitrogênio líquido sob a forma de pérolas de 20 μ L. As pérolas foram armazenadas em tubos de 1,5mL próprios para criopreservação (Nunc – Dinamarca). Para esta técnica foram utilizadas as amostras de *L. major* e *L. major*-like em comparação com sete amostras de referência: PH8, M379, 5ASKH, LS94, M1176, M2903 e JISH118 (QUADRO 2).

4.3.2.2 Sistemas enzimáticos

Foram utilizados seis sistemas enzimáticos:

1- GPI – Glicose-fosfo-isomerase (Enzyme Commission Number 5.3.1.9)*

2 - 6 PGD – 6- Fosfo-glico-desidrogenase (E. C. 1.1.1.43)

3 – ES – Esterase (E.C.3.1.1.1)

4 – SOD – Superóxido dismutase (E.C.1.15.2.2)

5 – MPI – Manose fosfato isomerase (E. C. 5.3.1.8)

6 – NH – Nucleotidase (E. C. 3.2.2.1)

* Numeração das enzimas de acordo com a Comissão Internacional de Nomenclatura de Enzimas (1972).

4.3.2.3 Determinação do padrão enzimático

Para a determinação do padrão enzimático foi utilizada a técnica de eletroforese horizontal a baixa temperatura (2°C) em camada fina de gel de amido, segundo descrição de Wraxall & Culliford (1968) e Godfrey & Kilgour (1976). O gel de amido foi preparado usando amido hidrolisado (11,25g/100mL). Foram feitas fendas no gel em intervalos regulares e as amostras aplicadas utilizando linha de algodão (Anchor[®]) embebida na solução de lisado (3-5µL lisado/linha). As condições de corrida e os sistemas utilizados para cada enzima está demonstrado no ANEXO 2.

Ao término da corrida, a revelação da atividade enzimática no gel foi feita por meio de uma solução contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões, próprios para cada enzima. As isoenzimas foram visualizadas no gel pela presença de um composto colorido correspondendo ao receptor de elétrons na sua forma reduzida (ANEXO 2).

Os géis foram incubados em estufa BOD (Modelo 347F - FANEM®), a 37°C até a revelação das bandas. Assim que estas apareceram, a revelação foi interrompida adicionando-se sobre os géis, ácido acético a 5% e estes foram lavados nesta mesma solução até que o excesso de corante fosse eliminado, deixando-os limpos e com as bandas eletroforéticas marcadas. Os géis foram expostos à temperatura ambiente para secagem e posteriormente analisados.

As técnicas aplicadas estão descritas com detalhes no *Handbook on Isolation Characterization of Leishmania* (Edited by David Evans, 1989) – UNDP/World Bank/WHO – Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva, Switzerland.

4.3.2.4 Análise dos géis

Os eletromorfos, que são as bandas visualizadas no gel foram numerados de acordo com sua mobilidade eletroforética, sendo que aquele mais próximo do catodo (ponto de aplicação das amostras), foi denominado eletromorfo 1, a banda imediatamente superior como eletromorfo 2 e assim por diante. A partir dos valores obtidos, foram construídos diagramas para a comparação dos eletromorfos das amostras em teste, com os das amostras de referência.

4.3.3 Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPDs)

4.3.3.1 Obtenção de massa de promastigotas

Para obtenção do número suficiente de parasitos ($\cong 10^9$), as amostras foram cultivadas em meio α -MEM (ANEXO 1) acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina G potássica: 100unidades/mL e estreptomicina: 50 μ g/mL), em estufa BOD (Modelo 347F – FANEM[®]) sob temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os parasitos foram expandidos por meio de repiques sucessivos e a massa de células foi coletada quando estas se encontravam na fase exponencial de crescimento. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e as culturas transferidas para tubos Falcon, centrifugadas a 3800xg, durante 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em solução PBS pH 7,2. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e a massa de células obtida estocada a -70°C , para posterior extração do DNA e também para utilização na preparação de pérolas de 20 μ L para estudo isoenzimático.

4.3.3.2 Extração de DNA

Após o descongelamento, as células, preparadas como descrito no item acima, foram ressuspendidas em 0,1mL/ 10^9 parasitos em solução de lise (dodecil sulfato de sódio - SDS 1% + NaCl 80mM + EDTA 45mM). Em cada tubo foi adicionada proteinase K na concentração de 50 μ g/mL e estes foram incubados em banho-maria a 37°C “overnight”. Foram feitas duas etapas de extração. Para tal, acrescentou-se igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1); os tubos foram delicadamente agitados por 10 minutos e

centrifugados por 5 minutos a 1800xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com auxílio de pipeta de transferência estéril e novamente foi realizada uma outra extração como descrito acima. Após estas duas extrações, acrescentou-se igual volume de clorofórmio. Os tubos foram agitados por 10 minutos e centrifugados a 1800xg por 5 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se 2 volumes de etanol 95% gelado e os tubos foram mantidos em gelo por 10 minutos para precipitação do DNA. Após isto, foram centrifugados por 10 minutos em 8000xg a 4°C. Retirado o sobrenadante, os tubos foram invertidos em papel absorvente até a evaporação do etanol. O DNA foi suspenso em Low TE (Tris 10mM contendo EDTA 1mM, pH 8,0) - 100 a 200 μ L/10⁸ células - e mantido em geladeira a 4°C até a realização dos experimentos.

4.3.3.3. Quantificação do DNA por eletroforese

A concentração do DNA foi determinada por comparação com o DNA do fago λ (DNA Quantification Standards, Phage λ DNA, GIBCO-BRL) nas concentrações 15ng/6 μ L, 31ng/6 μ L, 63ng/6 μ L, 125ng/6 μ L, 250ng/6 μ L e 500ng/6 μ L. O DNA foi aquecido a 60-65° C por 10 minutos em banho maria e centrifugado brevemente em minicentrífuga *Eppendorf*. Os DNAs extraídos (1 μ L), juntamente com os padrões de peso molecular foram submetidos à eletroforese convencional em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-borato 90mM contendo EDTA 2mM, pH 8,0), contendo 1% de brometo de etídeo (0,1 μ g/mL) a 60V por 4 horas.

Após a corrida eletroforética, as amostras foram visualizadas sob luz ultravioleta e o gel foi fotografado com máquina Polaroid em transluminador de

luz ultravioleta (340nm). A concentração de DNA foi estimada por comparação visual da intensidade das bandas de cada amostra com as bandas dos padrões de concentrações conhecidas. A partir desta análise, as amostras foram diluídas, em água MilliQ autoclavada, para uma concentração final de cerca de 1ng/ μ L.

4.3.3.4 Reações de RAPD-PCR

Para as reações de RAPD utilizou-se o KIT *Ready-to-go*TM *RAPD Analysis Beads* (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), composto de reagentes sob a forma de pérolas liofilizadas, estáveis à temperatura ambiente, que contêm uma polimerase termoestável (AmpliTaqTM DNA polimerase e fragmento Stoffel), dNTPs (0,4mM de cada dNTP), albumina de soro bovino (2,5 μ g) e tampão (Tris 10mM contendo MgCl₂ 3mM, KCl 30mM, pH 8,3).

Em cada tubo contendo uma pérola de reagente foram adicionados 24 μ L de água deionizada estéril e 6,4pmol do iniciador (3 μ L) (QUADRO 3). Depois de homogeneizada, esta solução foi distribuída igualmente para três tubos (9 μ L para cada um) e acrescentado 1 μ L de DNA (1ng/ μ L) perfazendo um volume final de 10 μ L para cada amostra. O programa de amplificação utilizado foi aquele descrito por Gomes et al. (1995), o qual consistiu de um passo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, dois ciclos de um passo de anelamento a 30°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos a 95°C para desnaturação, seguida de 33 ciclos, quando a temperatura de anelamento for aumentada para 40°C. No ciclo final, o passo

de extensão foi estendido para 5 minutos. Utilizou-se um termociclador PTC-100™ (MJ RESEARCH, INC).

Iniciador	Sequência	NT	G+C	Referência
A07	5'-GAAACGGGTG-3'	10	60%	WILKERSON et al. (1993)
B07	5'-GGTGACGCAG-3'	10	70%	RUNCIMAN et al. (1999)
L15	5'-CTCCACCATTAGCACCCAAAGC-3'	22	55%	DIRIENZO et al. (1991)
M13F	3'GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	17	60%	HU e MESSING (1982)
M13R	5'CAGGAAACAGCTATGAC-3'	17	47%	HU e MESSING (1982)
P14	5'-ACGACAGGGCTGGTTGCCCA-3'	20	65%	NIGRO et al. (1989)
QG1	5'CCATTAGCACCCAAAGC AGACCTCACCTGTGGAGC-3'	36	58%	GOMES et al. (1995)
λGT11	5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3'	24	46%	YOUNG & DAVIS (1983)

QUADRO 3- Iniciadores aleatórios utilizados nas reações de RAPD-PCR.

NT = Número de nucleotídeos.

4.3.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5%, não desnaturante, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Foi realizada uma corrida de 100 volts por aproximadamente 6 horas, até que o corante xileno-cianol, utilizado como marcador de corrida no gel, tivesse percorrido 7cm. Como marcador de massa molecular foi utilizado o 1kb (Promega). Após a eletroforese, os fragmentos amplificados, foram visualizados por coloração com nitrato de prata, de acordo com protocolo descrito por Santos et al. (1993).

O gel foi fixado com solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Em seguida, o gel foi incubado em solução contendo 0,17% de nitrato de prata, por 10 minutos. A revelação foi realizada utilizando-se solução contendo 3% de NaOH (p/v) e

0,3% de formaldeído 37% (v/v). Após fixação, os géis foram fotografados com filme KODAK 35 mm 50 ISO/18 DIN, sob luz branca, com filtro azul e câmara NIKON FM2.

4.3.4 Amplificação de repetições de sequências simples pela reação em cadeia da polimerase (SSR-PCR)

A amplificação do DNA, utilizando repetições de sequências simples, foi realizada com dois iniciadores:

- $(CA)_8RY$, que apresenta repetições CA ancoradas na porção 3' por uma purina R e uma pirimidina Y quaisquer. Amplifica os segmentos inter-repetições. O protocolo utilizado foi aquele descrito por Zietkiewicz et al. (1994) modificado por Oliveira et al. (1997).
- $CAA(CT)_6$, conhecido como primer "K7" (WU et al., 1994), ancorado na extremidade 5' e que amplifica tanto a região inter-repetições quanto às repetições.

O QUADRO 4 apresenta detalhadamente os iniciadores utilizados:

Iniciador	Sequência	NT	G+C	Referência
$(CA)_8RY$	5'-CACACACACACACACARY-3'	18	50%	ZIETKIEWICZ et al. (1994)
$CAA(CT)_6$	5'-CAACTCTCTCTCTCT-3'	15	47%	WU et al. (1994)

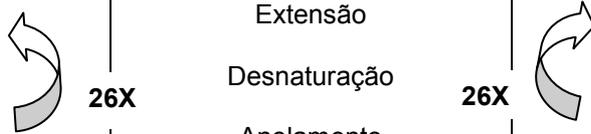
QUADRO 4 - Iniciadores utilizados nas reações de SSR-PCR.

NT = Número de nucleotídeos

Para as reações de SSR-PCR foi utilizado o KIT *Ready-to-go*TM *RAPD Analysis Beads* (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), composto de reagentes sob a forma de pérolas liofilizadas, conforme descrito anteriormente.

As reações de amplificação foram realizadas segundo Zietkiewicz et al. (1994) com modificações introduzidas por Oliveira et al. (1997). Os ciclos de amplificação utilizados para os iniciadores $(CA)_8RY$ e $CAA(CT)_6$ apresentam pequenas diferenças nos tempos de cada passo e diferença significativa com relação à temperatura de anelamento e tempo de desnaturação (QUADRO 5). Para estas reações também se utilizou o termociclador PTC-100TM (MJ RESEARCH, INC) e o 1kb (Promega) como marcador de massa molecular.

Iniciador $(CA)_8RY$	Ciclos de amplificação	Iniciador $CAA(CT)_6$
94°C- 30 seg	Desnaturação	94°C- 3 min
52°C- 45 seg	Anelamento	42°C- 45 seg
72°C- 2 min	Extensão	72°C- 1 min
94°C- 30 seg	Desnaturação	94°C- 30 seg
52°C- 45 seg	Anelamento	42°C- 45 seg
72°C- 7 min	Extensão final	72°C- 7 min



QUADRO 5- Ciclos de amplificação dos iniciadores $(CA)_8RY$ e $CAA(CT)_6$ na SSR-PCR.

Para visualização dos fragmentos amplificados, uma alíquota de 4 μ L do produto foi adicionada a 6 μ L de tampão de aplicação 2X (TBE 5X, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, ficoll 400 25%) e aplicados em gel de poliacrilamida a 5%, submetido a eletroforese até que o corante de corrida percorresse 7cm. Os géis foram corados com nitrato de prata e fotografados como descrito anteriormente (item 4.3.3.5).

4.3.5 Análise dos dados e construção de fenogramas

Para analisar o padrão de bandas obtido em cada cepa, as fotografias (18 x 24cm) foram analisadas visualmente e os padrões de bandas inseridos manualmente no computador. O programa DNA-POP (PENA & NUNES, 1990) foi usado para calcular a proporção de bandas compartilhadas entre as amostras (S). Este programa usa como princípio básico, a divisão vertical do gel em níveis de mobilidade. Um nível é definido pela presença de, pelo menos, uma banda em qualquer uma das canaletas do gel. O gel é analisado do topo ao final e quando uma banda é encontrada, definindo assim um nível, o número da canaleta onde ela se encontra, bem como o número de outras canaletas contendo bandas exatamente no mesmo nível, é colocado no computador. Depois de computar todas as bandas, de acordo com o número da canaleta onde se encontram e o nível de mobilidade, o programa calcula a proporção de bandas compartilhadas entre n amostras corridas no mesmo gel. O programa analisa os dados em comparações de pares em $n(n-1)/2$ fornecendo o número total de bandas e a proporção de bandas compartilhadas entre as cepas, espécies e subgêneros de *Leishmania*. Os valores foram comparados e testados estatisticamente utilizando-se o teste t *Student* para determinar a significância das diferenças considerando $p \geq 0,05$.

O “software” *Treecon* (VAN DER PEER, 1994) foi utilizado para a construção dos fenogramas. Foi usado o parâmetro $GD_{xy} = 1 (2N_{xy} / (N_x + N_y))$ como medida de distância genética (NEI e LI, 1979), onde N_{xy} é o número de fragmentos (bandas) compartilhadas entre as amostras x e y, N_x é o número de fragmentos na linha x e N_y é o número de fragmentos na linha y.

As árvores foram construídas pelo Método da Média Aritmética não Ponderada - UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic*

Averages) (SNEATH & SOKAL, 1973). O grau de reprodutibilidade e confiabilidade dos agrupamentos e das relações taxonômicas obtidas nos fenogramas foram submetidos ao teste de Bootstrap, com 1000 reamostragens (FELSENSTEIN, 1985). O Bootstrap envolve substituição aleatória de dados, de forma a criar uma série de conjuntos de dados diferentes, mas mantendo o mesmo tamanho do conjunto de dados originais. Por exemplo, quando se analisa fragmentos de restrição, os cálculos da distância genética são feitos tendo como base a presença, ou ausência, de bandas em cada linha do gel. O padrão de bandas é representado no programa por uma matriz onde o número zero (0) representa ausência e o número um (1) presença. O programa substitui aleatoriamente 0 por 1 (e vice-versa), em qualquer ponto da matriz, de forma a obter 1000 matrizes diferentes. A partir de cada uma destas matrizes, automaticamente é construída uma árvore fenética. As árvores obtidas são, então, comparadas entre si. A significância estatística de um determinado agrupamento é dada pela porcentagem de árvores, baseadas nos dados reamostrados, contendo aquele agrupamento (FELSENSTEIN, 1985). Apenas os valores de Bootstrap acima de 70% foram considerados significativos (HILLIS & HUELSENBECK, 1992).

4.3.6 Análise estatística dos resultados

A comparação entre as médias do número de bandas compartilhadas e a proporção de bandas compartilhadas foi feita através do teste de *Kruskal-Wallis* para a técnica de RAPD-PCR e teste de *Mann Whitney* para a técnica de SSR-PCR, calculando-se a diferença mínima significativa entre as amostras de *L. major-like* e *L. major* e os iniciadores.

4.4 Estudo das cepas de *L. major*-like BH49 e BH121

4.4.1 Comportamento em meio de cultura – curvas de crescimento

As cepas BH49 e BH121 também foram estudadas quanto ao comportamento em meio de cultura. Para tal, foram inoculadas em meio de Grace pH 6,5 (GIBCO-BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino pH 6,5. As culturas foram examinadas e avaliadas quanto à riqueza e motilidade das promastigotas através do exame ao microscópio óptico utilizando objetiva de 40X. As curvas de crescimento foram iniciadas com um inóculo de 1×10^6 parasitos por mililitro de meio de cultura em Erlenmeyers de 50mL contendo 5mL de meio de Grace acrescido de soro fetal bovino (10%) pH 6,5, em duplicata. As promastigotas utilizadas foram provenientes de culturas no quarto dia de crescimento. As culturas foram mantidas em estufa BOD (modelo 347F-FANEM[®]) a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, examinadas a cada dia ao microscópio para avaliar a motilidade e ausência de contaminação antes de se proceder à contagem do número de parasitos. A avaliação do crescimento foi realizada em câmara de Neubauer pela contagem do número de parasitos por mililitro de meio de cultura a cada 24 horas.

Levando-se em consideração a quantidade de parasitos observada a cada dia, foram preparadas diluições adequadas com a cultura em solução de isotón. Estas foram homogeneizadas em agitador “vortex” por alguns segundos e, em seguida, foram retirados 20 μL da solução e transferidos para a câmara

de Neubauer para a contagem do número de parasitos. Duas contagens foram realizadas de cada frasco em cada tempo de avaliação do rendimento celular e o número final de parasitos por mililitro de cultura foi calculado utilizando-se a fórmula:

Número de parasitos/mL = média aritmética de quatro contagens x 10^4 (Fator de Correção da câmara de Neubauer) x diluição utilizada.

O número obtido em cada dia foi utilizado para construir as curvas de crescimento, as quais forneceram os perfis de desenvolvimento de cada cepa no meio de Grace no pH 6,5 (GIBCO-BRL USA). Foram calculados os desvios padrões para cada média obtida em cada tempo e construídos gráficos utilizando o *software* Microsoft Excel.

4.4.2 Testes de infecciosidade em camundongos BALB/c

4.4.2.1 Amostras de *Leishmania*

As cepas de *L. major*-like BH121 e BH49, foram estudadas quanto as suas características de infecciosidade para camundongos BALB/c, em comparação com a cepa de referência *L. major* FN, para confirmação da capacidade de infecção dessas cepas nestes animais.

4.4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade, provenientes do centro de Bioterismo do ICB-UFMG, para os estudos de avaliação de infecciosidade. Para cada cepa estudada foram utilizados 5 animais.

4.4.2.3 Infecção e acompanhamento dos animais inoculados

Os animais foram inoculados subcutâneamente na região plantar da pata posterior direita com promastigotas em fase estacionária de crescimento com um inóculo de 1×10^6 células/50 μ L. Como controle, um outro inóculo utilizando o mesmo volume de PBS foi inoculado na pata esquerda dos animais. Os animais inoculados foram mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia ICB-UFMG, acondicionados em grupos de 5, em gaiolas plásticas e à temperatura ambiente. A alimentação oferecida era composta de ração balanceada (Purina-Brasil) e água “ad libitum”. Após as inoculações, os animais foram avaliados semanalmente durante 10 semanas, observando-se macroscopicamente o aspecto das lesões e a presença ou não de metástases. Para acompanhamento da evolução da infecção, foram observados o tempo de aparecimento das lesões e também a presença de ulcerações, metástases e visceralização e pesquisa de amastigota no local da lesão e vísceras (baço e fígado).

Foram realizadas, a cada semana, medidas da espessura das patas posterior direita (infectada) e esquerda (não infectada) utilizando-se um paquímetro (Mitotoyo-Japão). A diferença entre essas medidas expressa em milímetros representou o tamanho da lesão.

Este experimento foi repetido por três vezes, mostrando resultados semelhantes.

4.4.2.4 Análise estatística

Para analisar diferenças significativas entre as medidas das patas inoculadas e não inoculadas utilizou-se o teste *t* de “Student”, sendo que somente os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para a análise. Os cálculos foram realizados utilizando o programa EPISTAT (T. L. Gustafson, Round Rock, USA).

4.4.3 Subtração e seleção de cDNAs específicos

4.4.3.1 Parasitos

A técnica de subtração por hibridização e supressão, que tem como fundamento a amplificação seletiva de genes diferencialmente expressos, foi utilizada como ferramenta para comparação das duas amostras de *L. major*-like - BH49 e a BH121 - as quais, como já descrito, são utilizadas na vacina anti-LTA e apresentam conforme observado em experimentos anteriores, poder de infecciosidade distintos em camundongos BALB/c. Enquanto a cepa BH49 demonstrou infecciosidade, a BH121 não apresentou infecciosidade para aqueles animais.

4.4.3.2 Obtenção de mRNA

O mRNA das duas cepas de *L. major*-like foi obtido a partir da massa de promastigotas em fase logarítmica de crescimento ($\cong 10^9$ células) utilizando o *Kit* Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] (DYNAL, Great Neck, NY), segundo instruções do fabricante, com pequenas modificações. O princípio da técnica baseia-se no isolamento do mRNA utilizando-se microesferas magnéticas

contendo sequências oligo (dT)₂₅. Em cada tubo contendo o sedimento das promastigotas foi adicionado 1mL de tampão de lise, homogeneizado vagarosamente até que a solução tornasse viscosa, a qual foi mantida em gelo até a preparação das microesferas.

Preparação das microesferas magnéticas

O preparo das microesferas magnéticas foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os conteúdos dos tubos contendo as microesferas foram homogeneizados levemente e 250µL da suspensão foram transferidos para um tubo novo (1,5mL). As microesferas foram lavadas com solução de lise, utilizando-se para tal um suporte magnético que promove o isolamento destas. O lisado obtido anteriormente foi então adicionado às microesferas. A mistura foi homogeneizada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Esta etapa promove a ligação do mRNA aos oligos (dT). Utilizando-se do suporte magnético foi realizada a sedimentação das esferas magnéticas (cerca de 2 minutos) e o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e posteriormente descartado. As microesferas foram lavadas duas vezes com 1mL de tampão “A” e uma vez com 1mL de tampão “B” fornecidos pelo *Kit Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™]* (DYNAL, Great Neck), NY). Após as lavagens, adicionou-se 50µL de Tris-HCl 10mM e os tubos foram incubados em *termoblock* a 65°C por 2 minutos. Após a incubação, etapa que promove o desanelamento do mRNA, os tubos foram colocados no suporte magnético e todo o sobrenadante (contendo o mRNA) foi cuidadosamente coletado. O mRNA foi imediatamente estocado à -70°C até a realização dos experimentos. Para avaliação da concentração, uma alíquota do mRNA, foi diluída em água destilada deionizada estéril na

proporção de 1:50 e a dosagem foi realizada em espectrofotômetro (GeneQuant RNA/DNA Calculator - Biochrom, RU) a 260 e 280nm.

4.4.3.3 Síntese de cDNA

A partir de 0,5µg dos mRNAs obtidos das cepas de *L. major*-like foram sintetizados os respectivos cDNAs utilizando-se o *Kit PCR-select cDNA subtraction* (Clontech®), de acordo com as instruções do fabricante. Para a síntese dos cDNAs utilizou-se o iniciador específico a 2µM e a transcriptase reversa AMV (4 unidades). A síntese da segunda fita foi realizada com a T4 DNA polimerase (6 unidades) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA resultante foi ressuspenso em 50µL de água estéril deionizada e digeridos com a enzima de restrição *Rsa* I (0,3 unidades) por 1,5 h a 37°C, em tampão 1X *Rsa* I *restriction buffer* (bis-Tris propano-HCl 100mM pH 7,0 contendo MgCl₂ 100mM e dithitreitól 1mM). A digestão dos cDNAs gerou fragmentos com extremidades abruptas. Embora este procedimento não seja ideal para a obtenção de cDNAs “full-length” específicos, a clivagem destas populações de cDNA em fragmentos menores oferece duas vantagens importantes: primeiro, fragmentos longos poderiam formar extensos emaranhados que dificultariam a formação de híbridos em etapas posteriores da técnica SSH; segundo, a divisão de uma população de cDNAs em fragmentos menores poderia proporcionar que genes distintos (derivados de uma mesma família de genes) fossem selecionados, uma vez que possíveis hibridizações cruzadas devido a um elevado grau de homologia interna poderiam eliminá-los do processo final de subtração (DIATCHENKO et al., 1999). Em seguida, os cDNAs foram purificados utilizando fenol-clorofórmio-

álcool-isoamílico (24:24:1), precipitados com etanol 95% e, finalmente, dissolvidos em água deionizada estéril.

Foram realizadas tanto a subtração direta como a reversa, em que se obteve sequências diferencialmente expressas nas amostras BH49 e BH121, respectivamente. Na subtração direta o cDNA da amostra BH49 foi utilizado como cDNA “tester” (cDNA de interesse, o qual se procura selecionar genes específicos) e o cDNA da amostra BH121 como cDNA “driver” (utilizado como cDNA comparativo para subtrair sequências homólogas e se obter as sequências específicas do cDNA “tester”). Já na subtração reversa, o cDNA utilizado como “tester” foi o cDNA referente a amostra BH121 e o cDNA considerado como “driver”, o da amostra BH49. Como controle, uma outra subtração foi feita utilizando-se uma mistura de cDNAs de músculo esquelético com DNA ϕ X174/*Hae* III, fornecido pelo kit.

4.4.3.4 Ligação dos adaptadores

Para realização desta etapa, foi utilizado apenas o produto de digestão com a enzima *Rsa* I obtido anteriormente. Um microlitro do produto final da digestão do cDNA das amostras BH49 e BH121 foi diluído em 5 μ L de água deionizada estéril. Na subtração direta, 2 μ L do cDNA “tester” (amostra BH49) foram ligados separadamente aos adaptadores 1 e 2R 2 μ M (FIG. 2). Para esta reação adicionou-se 2 μ L de tampão de ligação 5X (Tris-HCl 250mM pH 7,8 contendo MgCl₂ 50mM, dithitritol 10mM e BSA a 0,25mg/mL) em volume final de 10 μ L, seguindo-se um período de incubação de cerca de 16 horas a 16°C utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (40 unidades). Esta etapa produz duas subpopulações de cDNA ligadas a adaptadores diferentes.

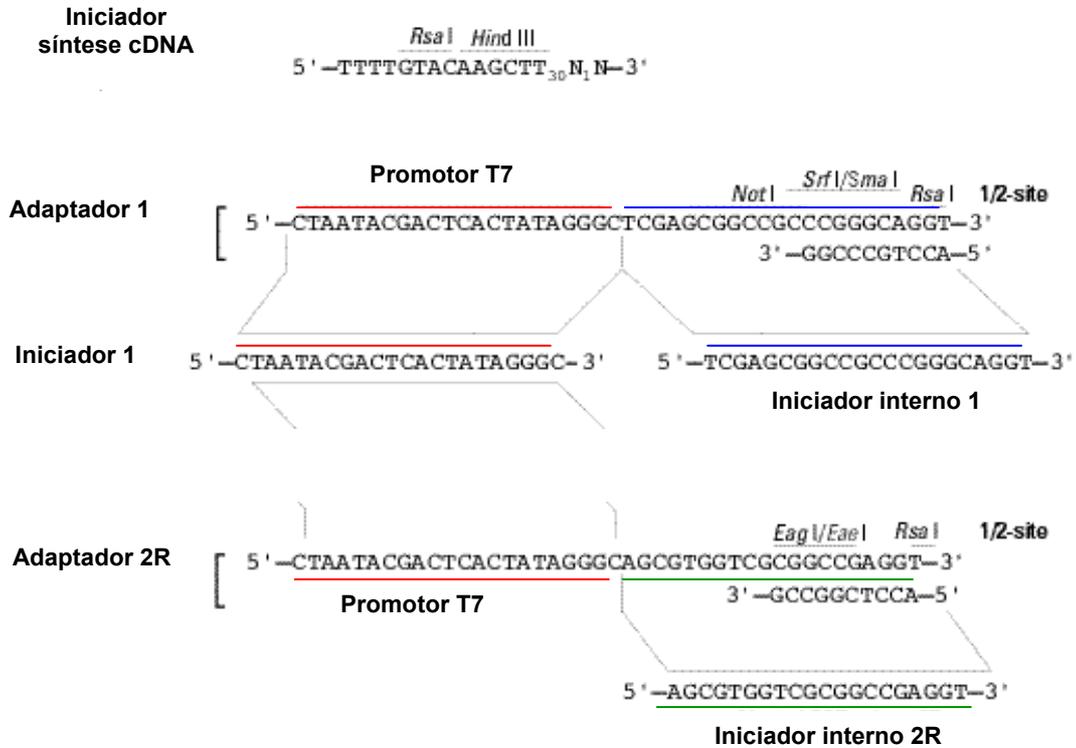


FIGURA 2. Sequências dos adaptadores e iniciadores utilizados na realização da técnica SSH. Quando os adaptadores são ligados aos cDNAs digeridos pela enzima de restrição *Rsa* I, o sítio de ligação desta enzima é restaurado. Em vermelho está representado o sítio de anelamento para o iniciador 1. Em azul e verde estão representados os sítios de anelamento para os iniciadores internos 1 e 2R, respectivamente (*Manual do “Kit” PCR-Select™ cDNA Subtraction - Clontech*).

Após a ligação, a enzima DNA ligase foi inativada por aquecimento a 72°C durante 5 minutos na presença de EDTA 0,2M e glicogênio (1mg/mL). As extremidades destes adaptadores não possuem um grupamento fosfato, sendo que apenas uma fita de cada adaptador se liga apenas à extremidade 5' do cDNA. Os dois adaptadores (1 e 2R) possuem regiões de sequência de DNA idênticas ao iniciador 1 e aos iniciadores internos 1 e 2R. Isso permite a criação

de sítios de anelamento para esses iniciadores após o preenchimento das extremidades de cada adaptador pela DNA polimerase. Nenhum tipo de adaptador é ligado à população de cDNA da amostra BH121 (cDNA “driver”). Para a realização do processo de subtração reverso, o cDNA da amostra BH121 digerido com a enzima *Rsa I* foi igualmente separado em duas subpopulações e ligado aos adaptadores de maneira análoga ao descrito acima.

No processo de subtração controle, foram utilizados cDNA de músculo esquelético e DNA ϕ X174/*Hae III*. Primeiramente, o DNA ϕ X174/*Hae III* (3ng/ μ L) foi diluído para uma concentração final de 0,15ng/ μ L utilizando-se água Milli-Q. Em seguida, 5 μ L deste DNA foram misturados com 1 μ L de cDNA de músculo esquelético em um tubo de 0,5mL, obtendo-se o controle a ser utilizado na subtração. Seguindo um procedimento análogo ao descrito anteriormente, 2 μ L do controle foram adicionados em dois tubos de 0,5mL, colocando-se, em seguida, o adaptador 1 no primeiro tubo e o adaptador 2R no segundo tubo. Em seguida, foram adicionados 2 μ L de tampão de ligação 5X e 40U de T4 DNA ligase para um volume final de 10 μ L em cada tubo. Após homogeneização, 2 μ L do conteúdo de cada tubo foram misturados em um terceiro tubo denominado de controle não subtraído. Os tubos foram centrifugados e incubados a 16°C durante a noite. A reação foi interrompida adicionando-se em cada tubo 1 μ L de solução de glicogênio/EDTA (0,2M) e aquecendo-os, durante 5 minutos para inativação da T4 DNA ligase. Um microlitro de cada subpopulação de cDNA da amostra BH49 e BH121 ligados aos adaptadores 1 e 2R foram diluídos em 1mL de água estéril deionizada e estocados a -20°C. Estes cDNAs não foram submetidos ao processo de subtração, sendo posteriormente utilizados como molde em reações de PCR.

4.4.3.5 Hibridizações

Após a ligação dos adaptadores foram realizadas duas hibridizações. Na primeira, o cDNA “tester” (contendo os adaptadores 1 e 2R em duas subpopulações distintas) foi adicionado ao cDNA “driver” (sem os adaptadores), para que se obtivesse dessa forma, dois tipos de cDNAs híbridos, visto que foram utilizados dois adaptadores diferentes. Na segunda hibridização, as duas amostras de cDNA obtidas anteriormente, foram hibridizadas novamente, agora para obtenção de cDNAs contendo os dois tipos de adaptadores (1 e 2R). Todo o processo de hibridização foi realizado segundo as instruções descritas no *Kit PCR-select cDNA subtraction* (Clontech®).

Na subtração direta, durante a primeira hibridização, 1,5µL do cDNA “driver” (amostra BH121) foram adicionados a cada um dos dois tubos contendo 1,5µL do cDNA “tester” (amostra BH49) ligados aos adaptadores 1 e 2R. Após adição de 1 µL do tampão de hibridização 4X, as soluções foram cobertas por uma gota de óleo mineral e submetidas ao processo de desnaturação por 1,5 minutos a 98°C, permitindo-se o re-anelamento por 10 horas a 68°C. Nesse processo, um excesso de cDNA “driver” foi adicionado a cada uma das duas populações de cDNA “tester”. O re-anelamento lento permitiu a produção de 4 tipos de moléculas (**a**, **b**, **c** e **d**) em cada amostra (FIG. 3).

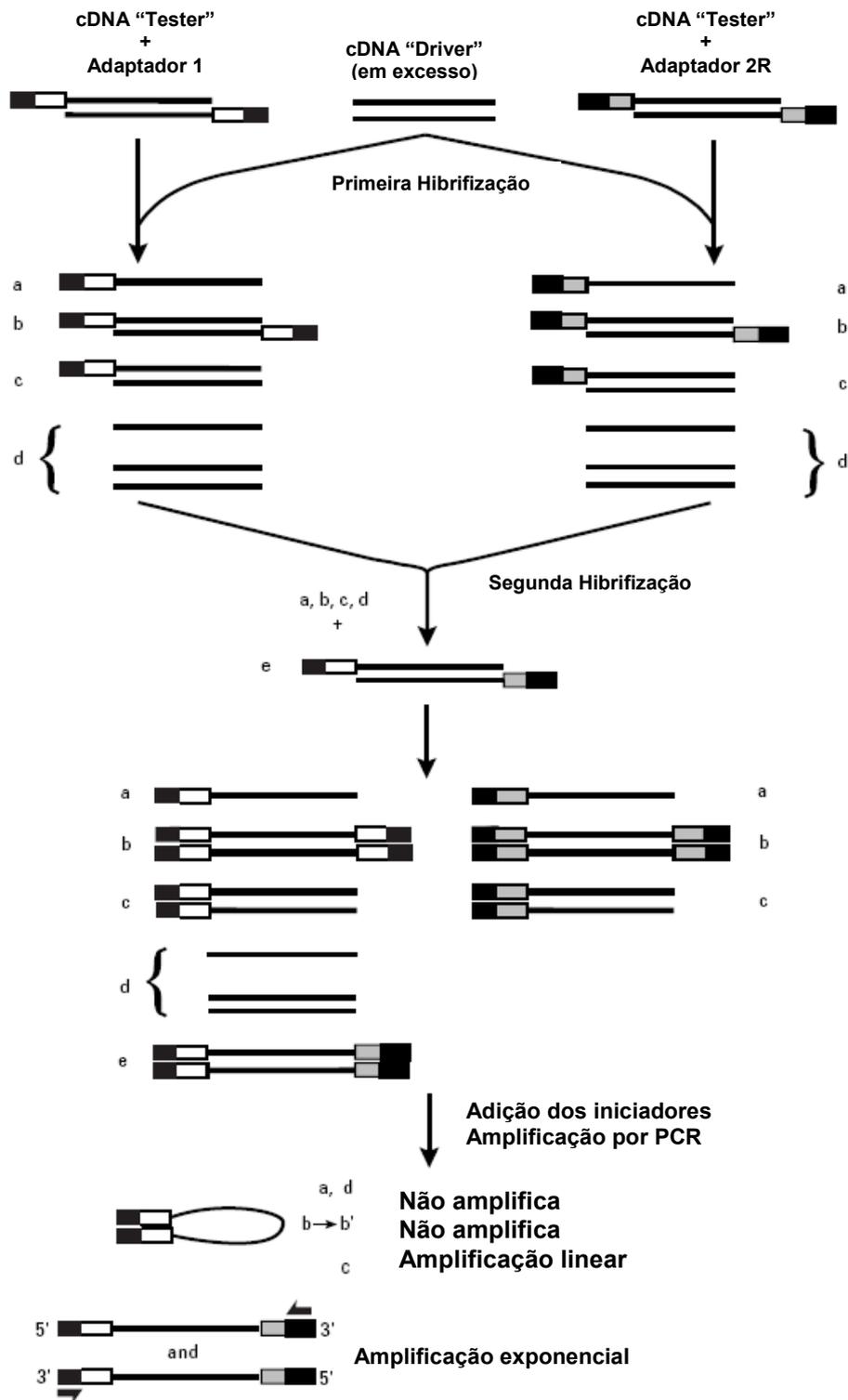


FIGURA 3 - Esquema da técnica SSH. As linhas sólidas representam os cDNAs de interesse ou de referência. A caixa preta externa representa a parte externa dos adaptadores 1 e 2R, idêntica à sequência do iniciador 1. As caixas brancas e em cinza correspondem à parte interna dos adaptadores 1 e 2R, idênticas a sequência dos iniciadores internos 1 e 2R, respectivamente (*Manual do "Kit" PCR-Select™ cDNA Subtraction -Clontech*).

Nesta etapa, o re-anelamento é mais lento para cDNAs diferencialmente expressos de rara abundância (tipo **a**), quando comparado com os transcritos mais abundantes representados pelo tipo **b**. Moléculas comuns entre cDNAs das populações de interesse e de referência são representados pelas moléculas de tipo **c**. As moléculas tipo **d** representam fragmentos que não se ligaram aos adaptadores.

Após a primeira hibridização, as duas amostras resultantes foram misturadas sem sofrerem desnaturação e 1 μ L de cDNA da amostra BH121, previamente desnaturado, foi adicionado juntamente com 1 μ L de tampão de hibridização. As amostras foram novamente hibridizadas durante 10 horas a 68°C. O produto final dessa hibridização foi diluído em 200 μ L de tampão de diluição (HEPES-HCl 20mM pH 8,3 contendo NaCl 50mM e EDTA 0,2mM), aquecido a 68°C por 7 minutos e estocado a -20°C.

Após esta etapa, são produzidos os mesmos tipos de moléculas formados na primeira hibridização, entretanto apenas as moléculas de cDNA de interesse, representados pelas moléculas tipo **a**, podem se reassociar, dando origem a um novo tipo de híbrido (molécula tipo **e**), o qual possui diferentes tipos de adaptadores localizados em suas extremidades. Após o preenchimento das extremidades de todas as moléculas pela DNA polimerase, somente as moléculas tipo **e** apresentam os sítios de anelamento para os iniciadores internos 1 e 2R em suas extremidades.

4.4.3.6 Amplificação de cDNAs diferencialmente expressos

Após as reações de hibridizações, as populações de cDNAs (das amostras BH49 e BH121) obtidas antes e após o processo de subtração foram utilizadas em reações de PCR. Nessa etapa, somente as sequências com diferentes adaptadores (moléculas tipo e), diferencialmente expressas, são amplificadas exponencialmente. Para isto, 1 μ L dos cDNAs obtidos foram adicionados separadamente a 24 μ L de uma mistura para PCR contendo iniciador 1 (0,4 μ M), 0,2mM de cada dNTP e 0,5 μ L da enzima Advantage cDNA polimerase Mix 50X (Clontech) contendo Tris-HCl 40mM (pH 7,5), KCl 50mM, (NH₄)SO₄ 25mM, EDTA 0,1mM, thesit 0,25% (v/v), glicerol 50% (v/v), Klentaq-1 DNA polimerase e anticorpo TaqStart a 1,1 μ g/ μ L e ainda 2,5 μ L de tampão de PCR 10X (tricina-KOH 400mM pH 9,2, acetato de potássio 150mM, acetato de magnésio 35mM e BSA a 37,5 μ g/mL) fornecidos pelo *Kit PCR-select cDNA subtraction* (Clontech®). A reação se processou de acordo com os seguintes passos: ciclo inicial a 75°C durante 5 minutos para extensão da fita complementar dos adaptadores 1 e 2R, seguindo-se 27 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento a 66 °C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1,5 minutos. Um ciclo adicional de extensão foi realizado a 68°C durante 7 minutos. Posteriormente 3 μ L dos produtos da PCR forma diluídos em 27 μ L de água deionizada estéril e estocados a -20°C.

Um microlitro dos produtos da primeira reação de PCR foi utilizado como molde para uma segunda reação de PCR, utilizando-se os iniciadores internos 1 e 2R. Para estas reações, adicionou-se 1 μ L dos produtos da primeira reação, separadamente, a 24 μ L de uma mistura para PCR contendo 0,4 μ M dos iniciadores internos 1 e 2R, 0,2mM de cada dNTP e 0,5 μ L da enzima

Advantage cDNA polimerase Mix 50X (CLONTECH) contendo Tris-HCl 40mM (pH 7,5), KCl 50 mM, (NH₄)SO₄ 25mM, EDTA 0,1mM, thesit 0,25% (v/v), glicerol 50% (v/v), Klentaq-1 DNA polimerase e anticorpo TaqStart a 1,1µg/µL e ainda 2,5µL de tampão de PCR 10X (tricina-KOH 400mM pH 9,2, acetato de potássio 150mM, acetato de magnésio 35mM e BSA a 37,5µg/mL) fornecidos pelo *Kit* PCR-select cDNA subtraction (CLONTECH®), seguindo-se de 10 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento a 68°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1,5 minutos. Cinco microlitros dos produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de poliacrilamida 5%, posteriormente corado por nitrato de prata (SANTOS et al., 1993).

Durante essas reações, as moléculas do tipo *a* e *d* não são amplificadas, pois não apresentam sítios de anelamento dos iniciadores. As moléculas tipo *b* possuem extremidades com sequências invertidas e homólogas que induzem a formação de uma estrutura em grampo, que não permite a amplificação por PCR. As moléculas tipo *c* apresentam apenas um sítio de ligação dos iniciadores e por isso são amplificadas linearmente. Somente as moléculas do tipo *e* possuem os dois sítios de anelamento dos iniciadores, podendo ser amplificadas de forma exponencial.

4.4.4 Clonagem, transformação e sequenciamento dos cDNAs diferencialmente expressos

4.4.4.1 Seleção e purificação dos cDNAs diferencialmente expressos

As amostras subtraídas foram aplicadas em gel de agarose *low melt* 0,8%. Após coloração com brometo de etídeo (0,1µg/mL) e visualização em

transluminador de luz ultravioleta, cada banda foi cortada e purificada utilizando o Kit Wizard® SV gel and PCR clean-Up System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Após purificação as amostras foram estocadas a 4°C.

4.4.4.2 Reação de ligação

Para a reação de ligação, 4µL dos produtos obtidos na purificação foram adicionados a 1µL do vetor pGEM-T *Easy Vector* (Promega), 1,0µL de T4 DNA ligase e 1µL do tampão de T4 DNA ligase (Tris-HCl 30mM pH 7,8 contendo MgCl₂ 10mM, ditioneitol 10mM e ATP 0,5mM). O volume final foi ajustado para 10µL com água Milli-Q estéril e a mistura incubada a 4°C por pelo menos 16 horas.

4.4.4.3 Transformação e plaqueamento das bactérias

Os produtos da reação de ligação foram utilizados para transformação de bactérias competentes, *Escherichia coli* linhagem DH5-α (Invitrogen), de acordo com o método já estabelecido (HANAHAN et al., 1991). Estes produtos foram incubados com aproximadamente 100µL de bactérias competentes em gelo, por 30 minutos, e em seguida submetidos a um choque térmico a 42°C por 30 segundos. As bactérias foram novamente incubadas em gelo por 2 minutos e a seguir foi acrescentado ao incubado 450µL de meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5,0g/L, NaCl 5,0g/L e pH ajustado para 7,4). Esta mistura foi incubada a 37°C por aproximadamente 1 hora em *termomixer* (Eppendorf, Alemanha), com agitação. Foram plaqueados 150µL da suspensão de bactérias em placas de Petri contendo ágar a 1,5% em meio LB contendo

ampicilina (100µg/mL), isopropiltioglicosídeo - IPTG - (200µg/mL) e 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactosídeo – Xgal – (65µg/mL), com posterior incubação a 37°C durante 16 horas.

4.4.4.4 Amplificação dos insertos e isolamento do DNA

Todas as colônias brancas foram selecionadas e pinçadas das placas com auxílio de palitos de madeira esterilizados, e submetidas a reações de PCR para confirmação da presença do inserto. Para tal, utilizou-se os iniciadores 1 e 2R que se anelam aos adaptadores ligados às extremidades das sequências diferencialmente expressas. As reações de PCR se processaram na presença de tampão (Tris-HCl 10mM pH 9,0 contendo MgCl₂ 1,5mM, 0,2mM de dNTPs, Triton X-100 0,1%), 0,1U de Taq polimerase (Promega) e água Milli-Q para um volume final de 10µL. A mistura foi submetida a 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 68°C durante 45 segundos e extensão a 72°C durante 1,5 minutos.

Para os clones que apresentaram insertos foi feito o isolamento do DNA plasmidial utilizando-se o *Kit Plus SV Minipreps* (DNA Purification System - Promega) a partir de culturas bacterianas crescidas em 4mL de meio LB contendo ampicilina (100µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas. A confirmação do isolamento do plasmídeo e presença do inserto foi realizada a partir de reações de digestão utilizando a endonuclease de restrição *Eco RI* (5U) de acordo com instruções do fabricante (Promega).

4.4.4.5 Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo método descrito originalmente por Sanger et al. (1977), utilizando-se o *DYEnamicTMET dye terminator kit MegaBACETM* (Amershan Biosciences, EUA), em tubos de microcentrífuga de 0,5mL com um volume final de 10 μ L contendo 0,5 μ M do iniciador M13 direto (5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3') ou reverso (5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3'), 200ng de DNA plasmidial, 4 μ L de premix para sequenciamento e água ultrapura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em um termociclador (Mastercycler® - Eppendorf) com 30 ciclos a 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram precipitados pela adição de 1 μ L de acetato de amônio (7,5M) e 25 μ L de etanol 95% (Merck, Alemanha). Após incubação a 25°C por 15 minutos, seguido de centrifugação a 4000xg por 45 minutos a 25°C, o sobrenadante foi descartado e 150 μ L de etanol 70% (Merck) adicionado às amostras seguindo-se de uma centrifugação a 4000xg por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspendido por agitação em vórtex com 10 μ L do tampão de resuspensão contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos à leitura no seqüenciador automático capilar *Mega BACE 1000TM sequencing system*, com uma injeção de 2kv por 100 segundos e corrida de 6kv por 230 segundos.

4.4.4.6 Análise das sequências em bancos de dados

As sequências foram obtidas em forma de cromatograma e a edição das ambigüidades foi realizada de acordo com os resultados do sequenciamento da fita complementar de cada cDNA utilizando-se o programa *Chromas* versão 1.51 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). As sequências parciais de cDNA assim obtidas foram submetidas a análise de homologia utilizando-se principalmente o servidor BLAST 2.0 (“Basic Local Alignment Search Tool”) (ALTSCHUL et al., 1990) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) da biblioteca Nacional de Medicina do NIH (“National Institute of Health”), Maryland, EUA. Foi verificado a existência de sequências homólogas de DNA (BLASTN) ou homologias entre a possível sequência de aminoácidos codificada pelos cDNAs das amostras de *L. major*-like (BH121 e BH49) e as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados (BLASTX). As mesmas sequências foram analisadas também com relação ao banco de dados disponível referente à *L. major* do servidor Omniblast do Instituto Sanger. A tradução dos cDNAs e a identificação das possíveis janelas de leitura (ORFs) foram realizadas utilizando-se o servidor ExPASy.

4.4.5 RT-PCR

A técnica de RT-PCR foi realizada para obtenção de cDNA, a partir do RNAm das duas cepas (BH49 e BH121), de acordo com protocolo descrito por Gerard et al. (1997), com algumas modificações. Foram utilizados para cada reação os seguintes reagentes: 0,2µg do RNAm, dNTPs numa concentração final de 10mM, 4µL de M-MLV RT tampão 5X (Invitrogen, EUA), 2µL de

dithiothreitol (DTT) 100mM (Promega, EUA), 8unidades de RNAsin inibitor (PROMEGA, EUA), 0,5µg de iniciadores oligo dT (Promega, EUA), 200 unidades de transcriptase reversa M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*, Invitrogen, EUA). As etapas para a transcrição foram: 5 min a 37°C, 60 min a 42°C, 20 min a 70°C e por último, 5 min a 4°C. Os produtos finais desta reação foram diluídos para 60µL de água livre de nucleases. O cDNA diluído foi utilizado como molde em reações de PCR para confirmar se os cDNAs subtraídos pela técnica SSH estavam presentes em apenas uma das cepas analisadas. Para estas reações de PCR foi utilizado 1µL do cDNA, iniciadores específicos (10pM), os quais foram construídos a partir da sequência dos fragmentos subtraídos, tampão (Tris-HCl 10mM pH 9,0, MgCl₂ 1,5mM, 0,2mM de dNTPs, Triton X-100 0,1%), 0,1U de Taq polimerase (Promega) e água Milli-Q para um volume final de 10µL. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos e 1 minuto com a temperatura de anelamento adequada para cada iniciador. O QUADRO 6 mostra os iniciadores utilizados. Como controle utilizou-se um par de oligonucleotídeos para amplificar um fragmento de 120pb da região conservada do kDNA do minicírculo de *Leishmania* sp. (DEGRAVE et al., 1994): HM1/HM3 - [5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)CTAT(A/T)TTACACAACCC-3'] e HM2: [5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3'].

CLONES	INICIADORES	PRODUTO (pb)
49-2	D 5' GGCTCGCTCCGAACGAC 3' R 5' GCCTTGCAGCTTCGTGC 3'	253
49-10	D 5' GAGTGTCAGCACGAGAC 3' R 5' CACTCATAGATACTCC 3'	106
49-16	D 5' AGCTTGGCGTAATCATG 3' R 5' TGGCCGATTCATTAATG 3'	203
49-28	D 5' GCTCGAGCTGCTGATACC 3' R 5' CCAGCATACGGACCTGATG 3'	300
121-6	D 5' TTAGGGATATGTGGCGTC 3' R 5' AACGGGATGGCAGTAGTG 3'	180
121-9	D 5' CATAACGGGGGCGCC 3' R 5' CCCC GCCAGTGAGCTC 3'	150
121-19	D 5' GCCAAGAAGACGAAGTC 3' R 5' CCGAGGTACTCCACCTC 3'	182
121-21	D 5' GCGCACGTGGTCAACAG 3' R 5' CCAACCGGTGCGACTCC 3'	156
121-39	D 5' AACGAATGTCTGCTCCCAC 3' R 5' GCTTGTGGGGCACAGCAAG 3'	116

QUADRO 6 – Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR. D – iniciador direto e R – iniciador reverso.

Os produtos da amplificação obtidos na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata para análise.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Estudo das amostras de *L. major*-like isoladas no Brasil

5.1.1 Comportamento das cepas de *L. major*-like em hamster

Com exceção da cepa BH121, as demais cepas de *Leishmania* utilizadas neste estudo foram capazes de infectar os hamsters inoculados com formas promastigotas, os quais apresentaram lesões nodulares no focinho entre a quarta e sexta semana após inoculação.

Todos os animais apresentaram formas amastigotas em material biopsiado da lesão do focinho. A cepa BH70 apresentou um comportamento diferente das demais. Enquanto aquelas causaram apenas lesões no focinho sem a presença de metástase ou visceralização, a cepa BH70 causou visceralização afetando baço, fígado e medula óssea e levando ainda a presença de ascite e edema nos animais. A lesão desenvolvida no focinho pelos animais inoculados por esta cepa foi muito pequena, quando comparada com a lesão apresentada pelos animais dos outros grupos, e desapareceu antes de seis semanas, embora amastigotas fossem encontradas no ponto de inoculação. O número de amastigotas presentes no baço foi maior (cerca de duas vezes) que nos demais órgãos parasitados (fígado e medula óssea) quando se comparou o número de amastigotas por 1000 núcleos de células nos esfregaços por aposição (dados não mostrados).

Na FIG. 4 pode-se observar alguns dos animais com a presença de lesões no focinho e presença de formas amastigotas encontradas na lesão dos mesmos e também no baço de um dos animais inoculados com a cepa BH70.

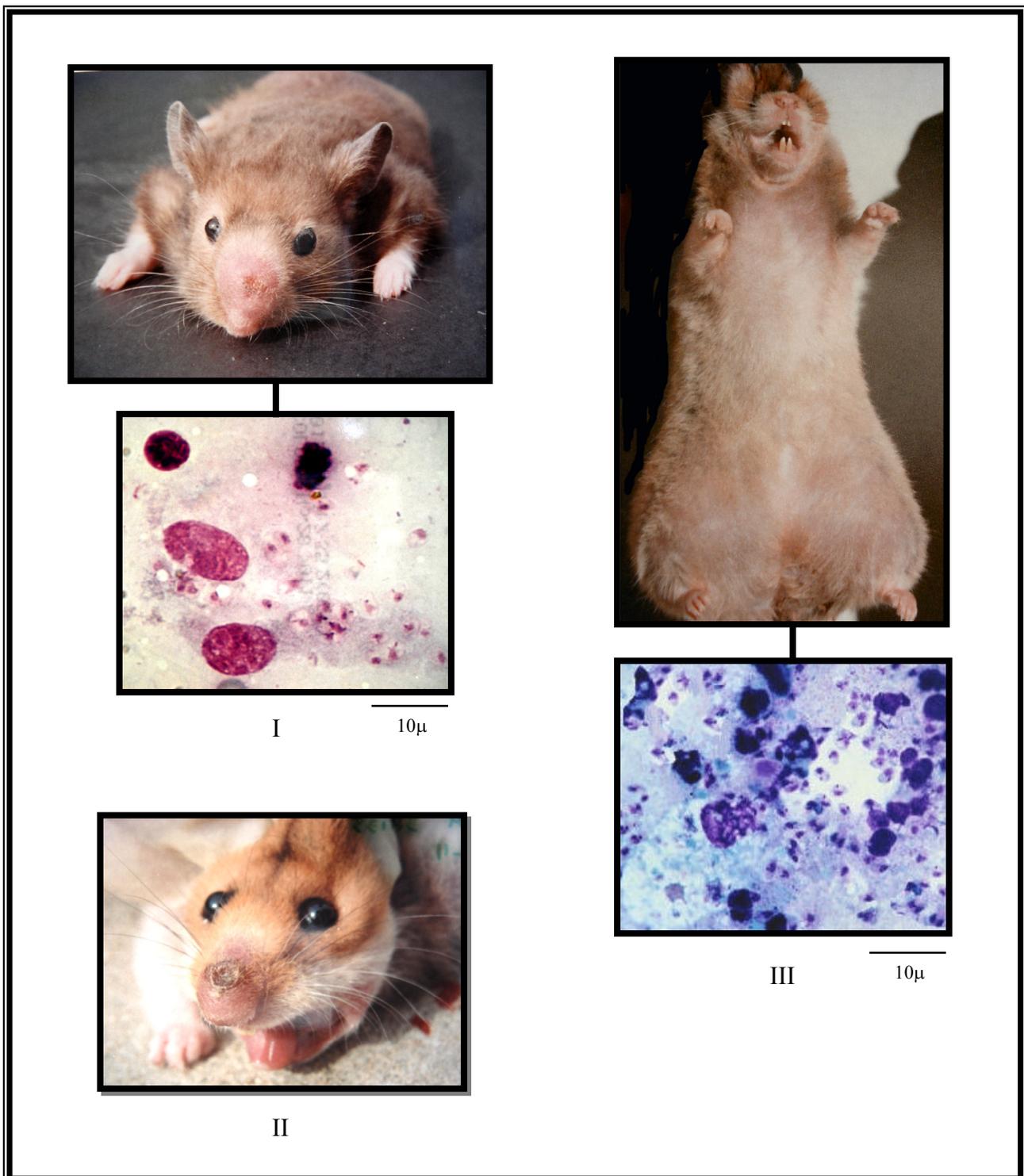


FIGURA 4 – Lesões de hamsters inoculados no focinho com 1×10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento. I – Lesão no focinho e formas amastigotas da cepa BH49 sete semanas após inoculação (coloração pelo Giemsa, aumento 1000X). II - Lesão ulcerada num animal inoculado com a cepa BH135 oito semanas após inoculação e III – Presença de visceralização, edema e ascite e formas amastigotas de baço num animal inoculado com a cepa BH70 dez semanas após inoculação (coloração pelo Giemsa, aumento 1000X).

5.1.2 Eletroforese de isoenzimas

A análise dos resultados da eletroforese de todas as amostras com os 6 sistemas enzimáticos possibilitou a determinação dos eletromorfos para cada amostra. Para cada enzima, as bandas com mobilidade eletroforética idêntica foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo. Os eletromorfos observados para as amostras estudadas e as amostras de referência estão representados na FIGURA 5.

Para todos os sistemas enzimáticos, as amostras de *L. major*-like e *L. major* e as amostras de *L. major*, utilizadas como referência (5ASKH e JISH118), apresentaram eletromorfos bem definidos, idênticos entre si e diferentes das outras amostras de referência utilizadas (PH8, M379, M1176, LS94 e M2903).

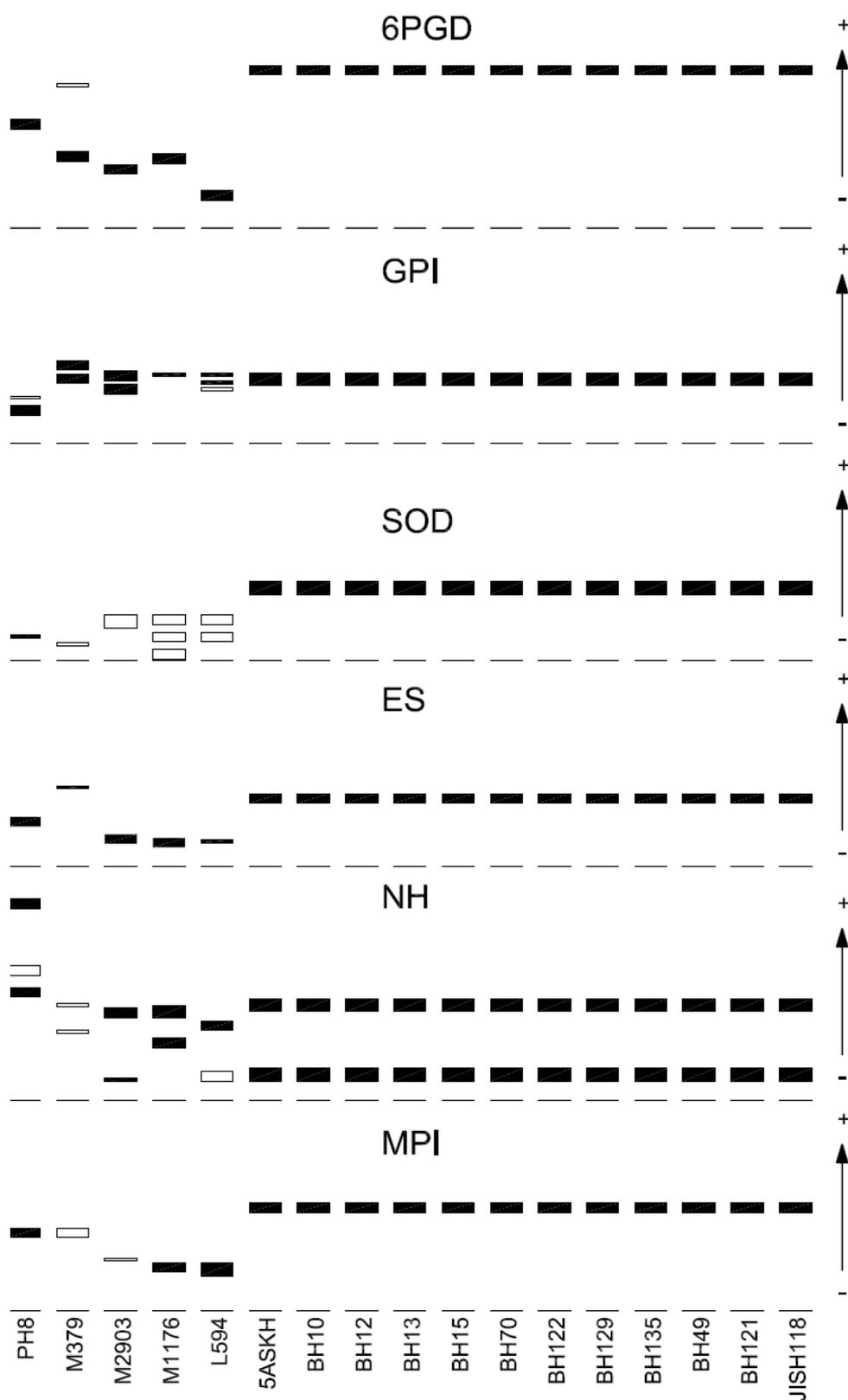


FIGURA 5 – Diagrama representativo dos perfis eletroforéticos das amostras estudadas em comparação com as cepas PH8 - *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, M379 - *L. (L.) mexicana*, 5ASKH - *L. (L.) major*, LS94 - *L. (Viannia) panamensis*, M2903 - *L. (L.) braziliensis* e M1176 - *L. (V.) guyanensis*. GPI – Glicose-fosfo-isomerase; 6 PGD – 6-Fosfo-glico-desidrogenase; ES – Esterase; SOD – Superóxido Dismutase; MPI – Manose Fosfato Isomerase; NH – Nucleotidase. ■ Forte intensidade □ Fraca intensidade

5.1.3 Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPDs)

Na otimização das condições para realização do RAPD-PCR, a concentração do iniciador utilizada foi de 6,4 μ mol/ μ L. O programa de PCR utilizado para as reações de amplificação foi aquele descrito por Gomes et al. (1995). Quanto à concentração de DNA, depois de quantificadas pela eletroforese em gel de agarose, as amostras foram diluídas para uma concentração de 1ng/ μ L.

Os perfis de RAPD-PCR para as amostras de *L. major* e *L. major*-like, bem como para as amostras de referência, obtidos com os iniciadores B07 (FIG. 6A), L15 (FIG. 7A), M13F (FIG. 8A), M13R (FIG. 9A), P14 (FIG. 10A), QG1 (FIG. 11A) e γ GT11 (FIG. 12A) foram polimórficos contendo várias bandas. Quando utilizado o iniciador A07, algumas amostras não amplificaram e outras apresentaram um padrão de amplificação de difícil análise. Por esse motivo esse iniciador não pode ser analisado e, portanto, não foi incluído no estudo.

Pela análise dos perfis de bandas, foi possível identificar diferenças pela presença ou ausência de um a vários fragmentos amplificados. A maioria dos fragmentos foi compartilhada por todas as amostras de *L. major*-like e *L. major* (média de 0,89). Desta forma, a análise dos perfis de RAPDs das amostras de *L. major*-like estudadas mostrou um alto grau de homogeneidade entre elas, como também quando essas foram comparadas com as amostras de *L. major* (FN e 5ASKH) utilizadas como cepas de referência, conforme ilustrado na FIGURA 11A obtida com o iniciador QG1.

A TABELA 1 mostra o número médio de bandas, o número médio de bandas compartilhadas entre todos os pares e a proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras, bem como entre as amostras de *L. major* e *L. major*-like, com

cada um dos iniciadores utilizados. O número total de produtos amplificados entre as amostras com todos os iniciadores aleatórios está apresentado na TABELA 2.

Como mostra a TABELA 1, os perfis gerados pelos iniciadores M13R e L15 deram origem a um maior número de bandas analisadas ($27,3 \pm 2,6$ e $27,0 \pm 3,6$ respectivamente), enquanto maior porcentagem de bandas compartilhadas foi observada para os iniciadores L15, M13F, P14, QG1 e γ GT11 ($\geq 90\%$), sendo que o iniciador QG1 apresentou 99% de bandas compartilhadas entre as amostras de *L. major* e *L. major*-like. Por outro lado, os iniciadores B07 e P14 geraram um menor número de bandas ($16,6 \pm 3,4$ e $16,7 \pm 3,1$, respectivamente) enquanto, uma menor porcentagem de bandas compartilhadas entre as amostras foi gerada pelo iniciador M13R com 72%. O iniciador M13R foi o que gerou o perfil mais polimórfico entre os iniciadores utilizados no estudo (FIG. 9A).

Para o cálculo dos coeficientes de similaridade e distância genética foram utilizados os fragmentos de RAPD-PCR entre 250 e 1000 bp. Esse intervalo foi escolhido baseado na melhor visualização e qualidade de definição das bandas. Fragmentos de maior massa molecular (>1000 bp) não foram considerados para análise por ser de difícil visualização. Os coeficientes de similaridade entre todas as amostras, com base na média dos coeficientes calculados para cada iniciador utilizado, estão apresentados também na TABELA 2. Para melhor visualização e comparação os fenogramas, construídos pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows 2.0* (FIG. 6B à 12B), foram apresentados juntamente com os respectivos géis, que representam o perfil de RAPD-PCR das amostras estudadas (FIG. 6A à 12A). Nestes fenogramas, além dos agrupamentos obtidos, observa-se a escala de distância genética e os valores de *Bootstrap*, que indicam o percentual de suporte calculado pelo teste às relações apresentadas.

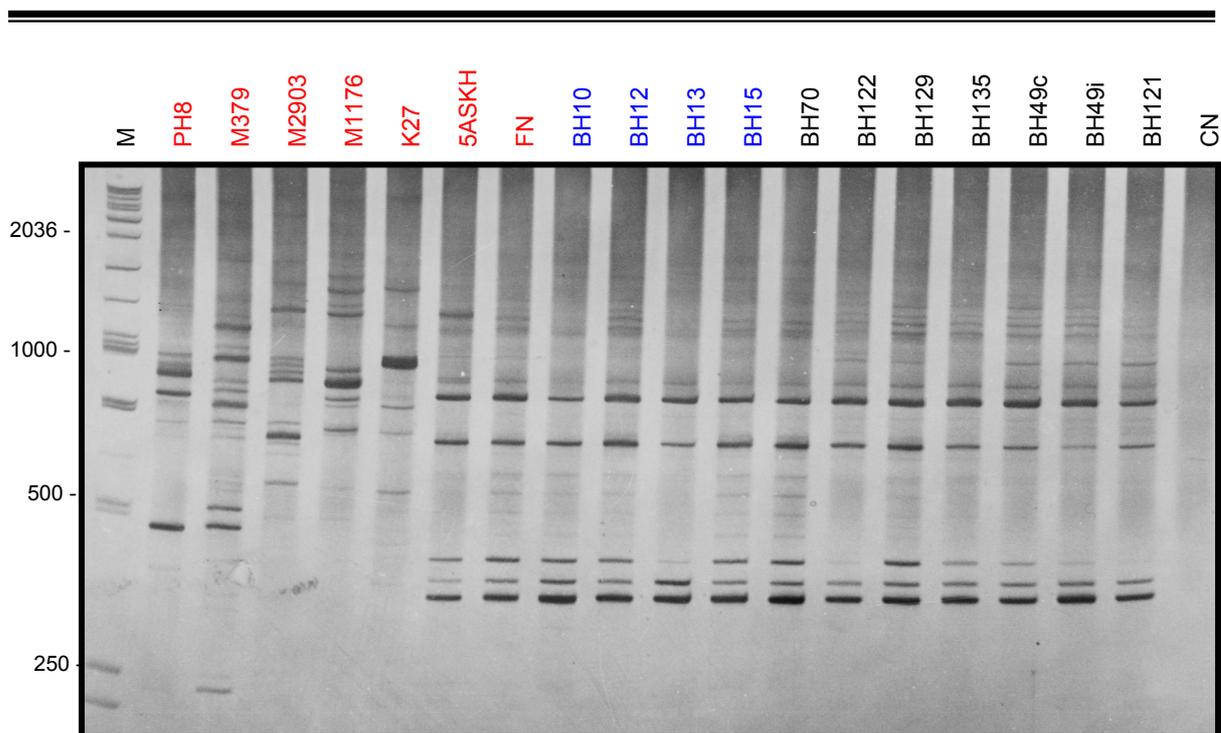


FIGURA 6A – Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador B07, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

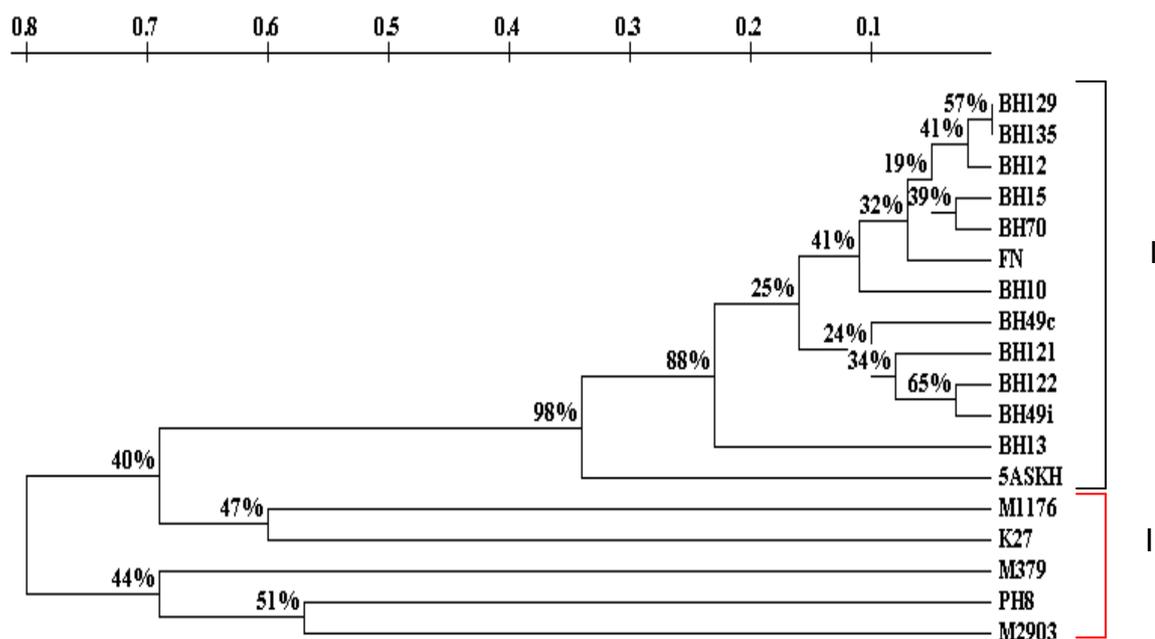


FIGURA 6B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador B07. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II - Demais cepas de *Leishmania sp.* de referência.

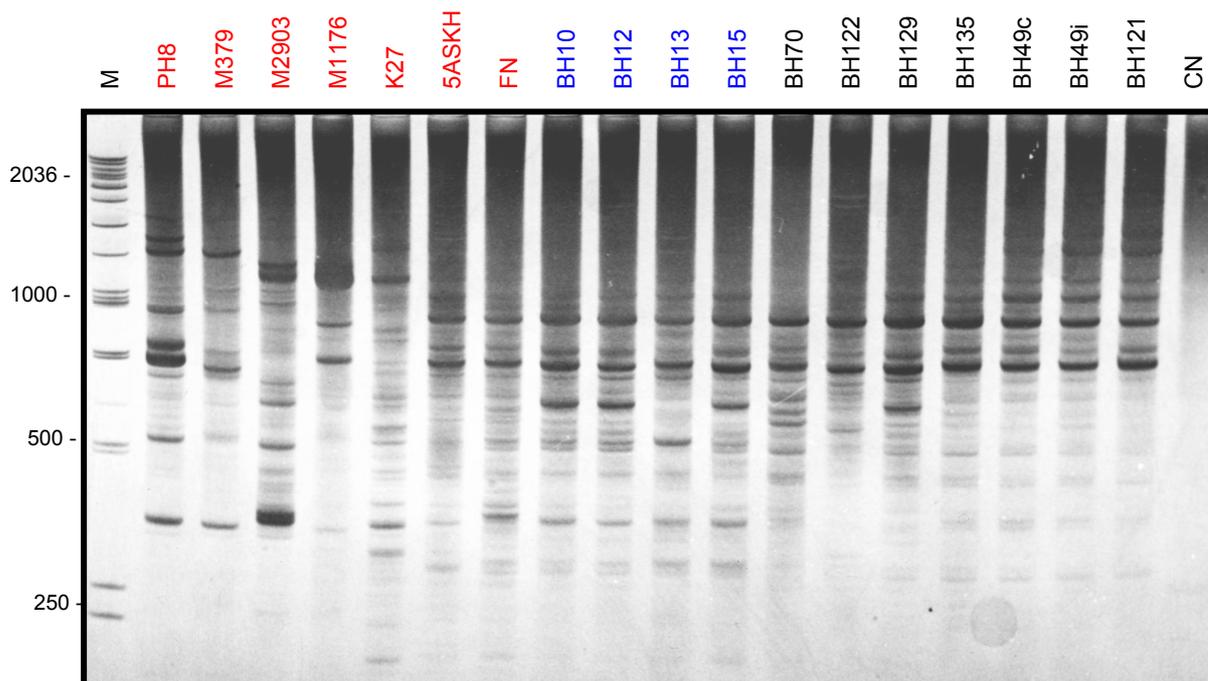


FIGURA 7A – Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador L15, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

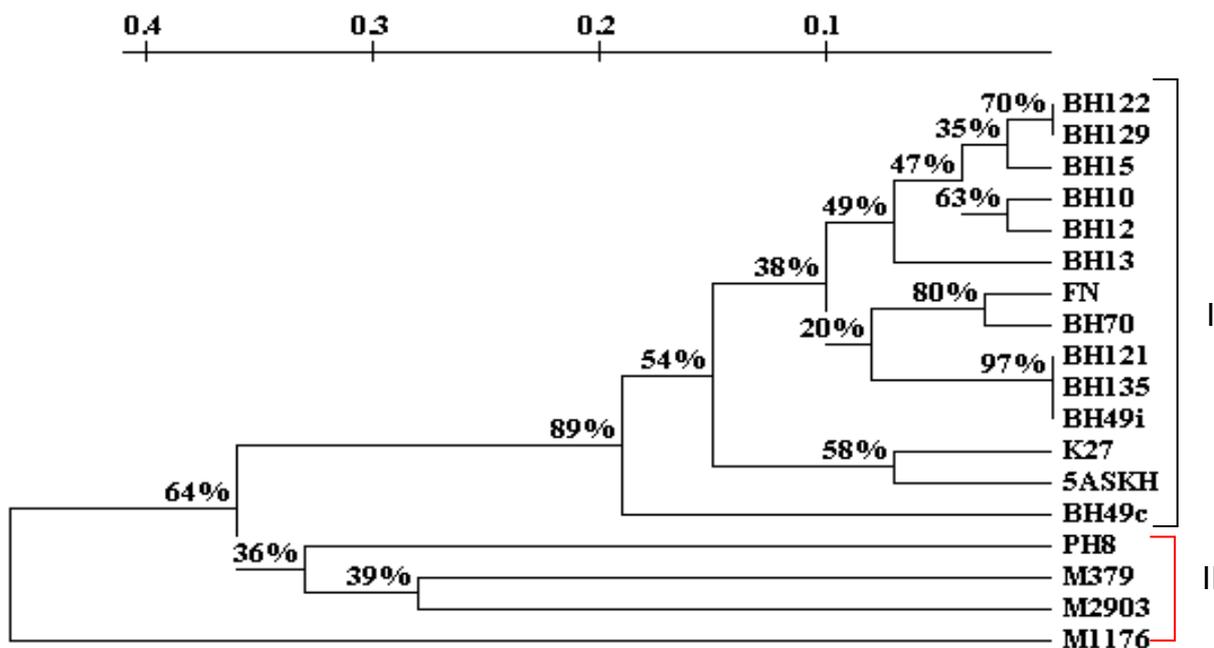


FIGURA 7B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador L15. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH) e *L. tropica* (K27). II- Demais cepas de *Leishmania sp.* de referência.

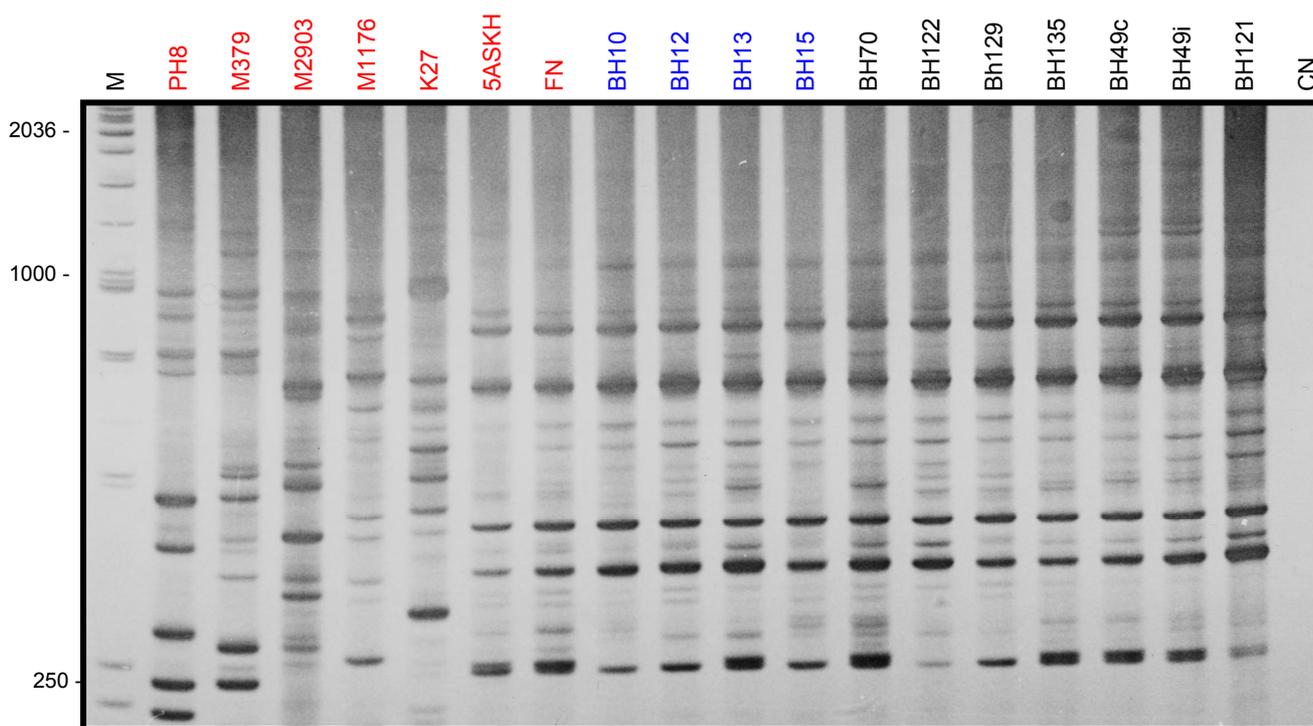


FIGURA 8A – Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania* sp. utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador M13F, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

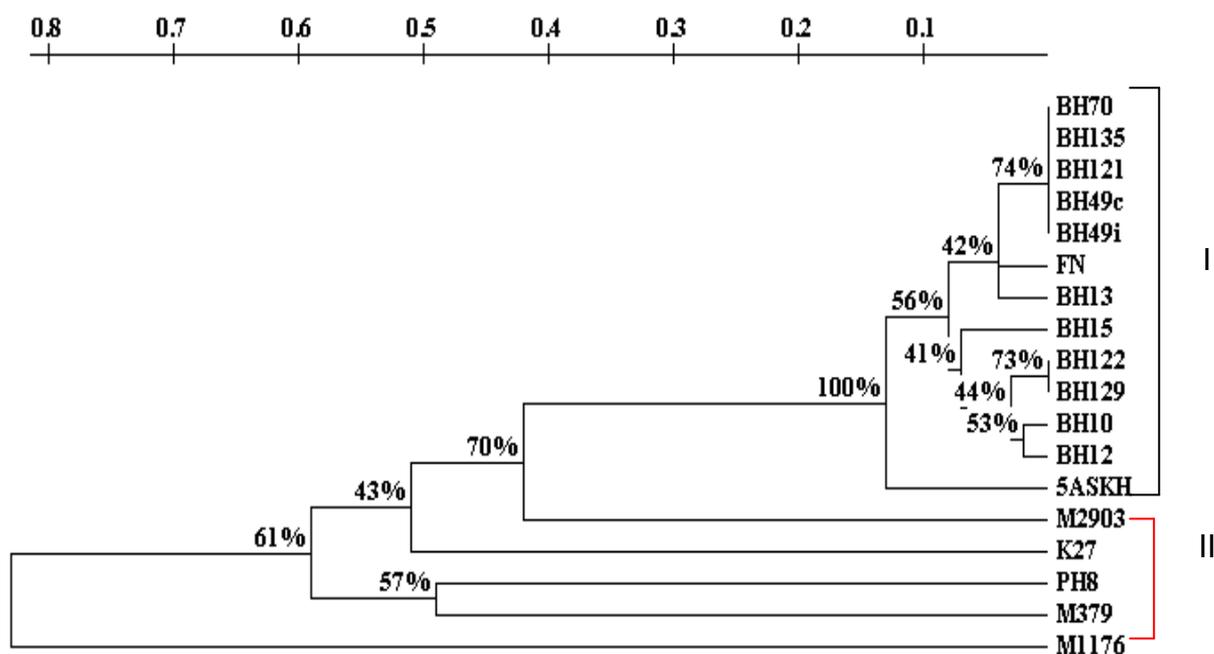


FIGURA 8B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador M13F. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência.

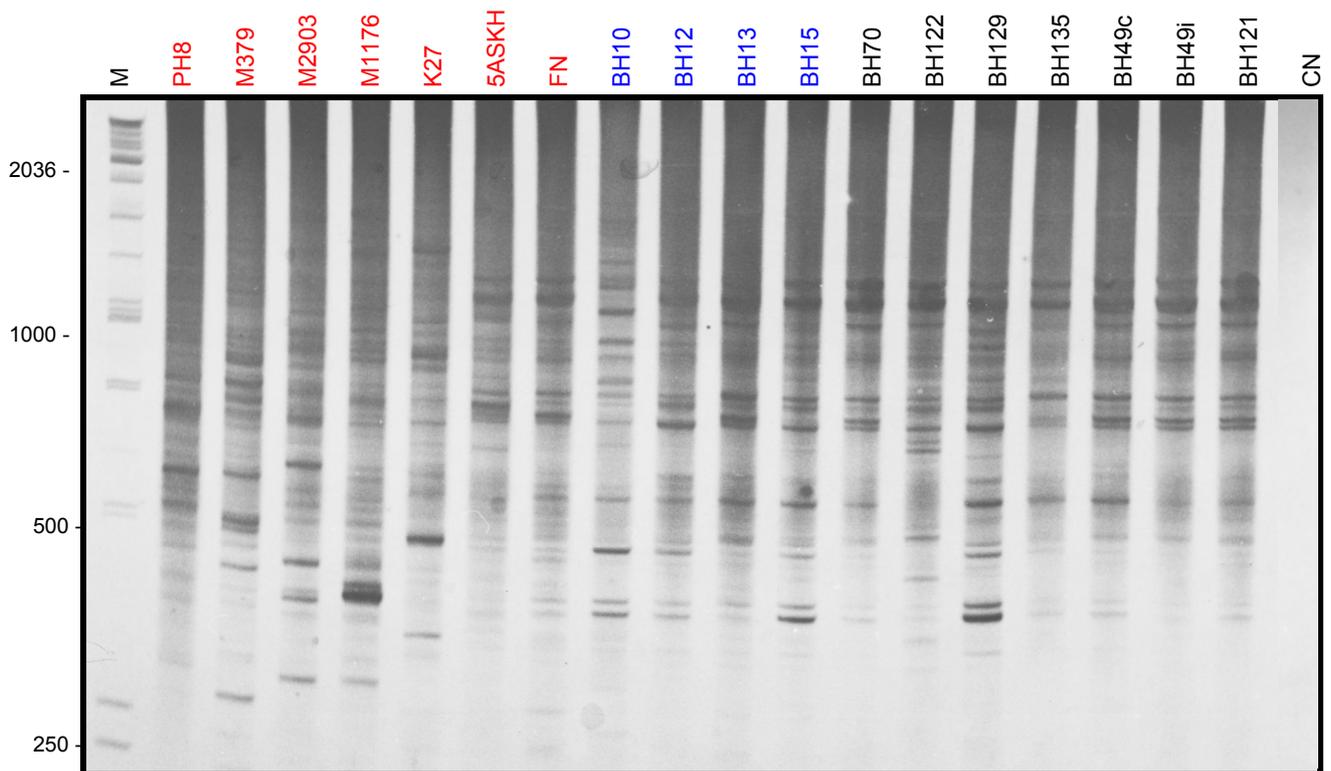


FIGURA 9A – Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador M13R, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN = controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

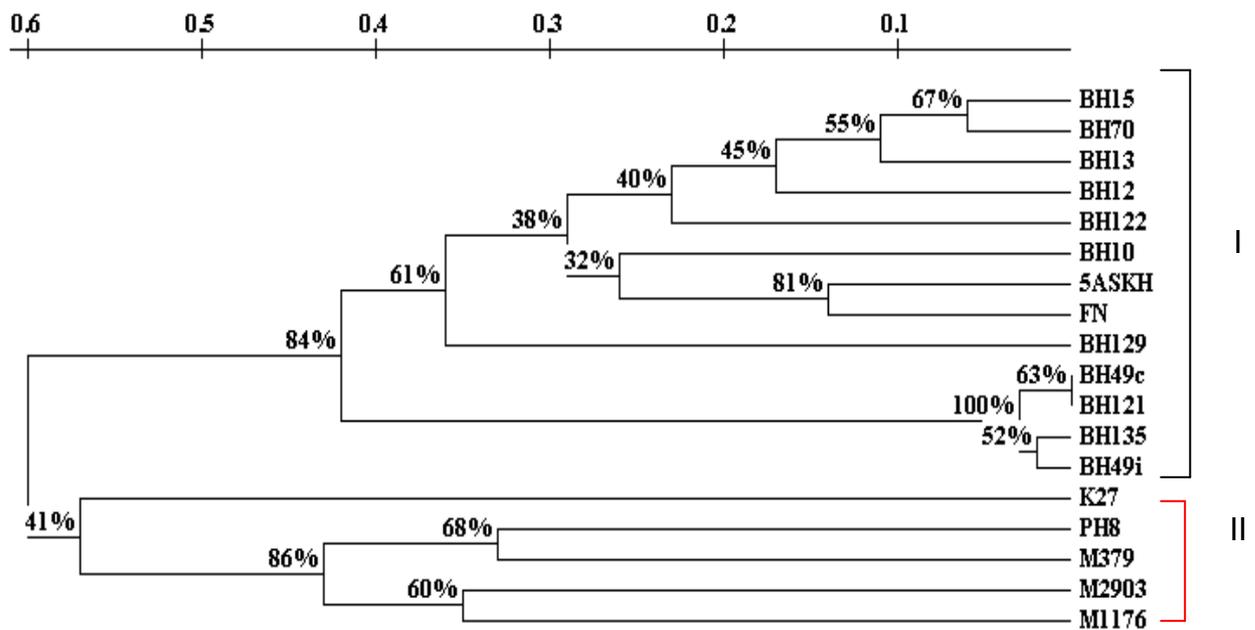


FIGURA 9B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador M13R. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania sp.* de referência.

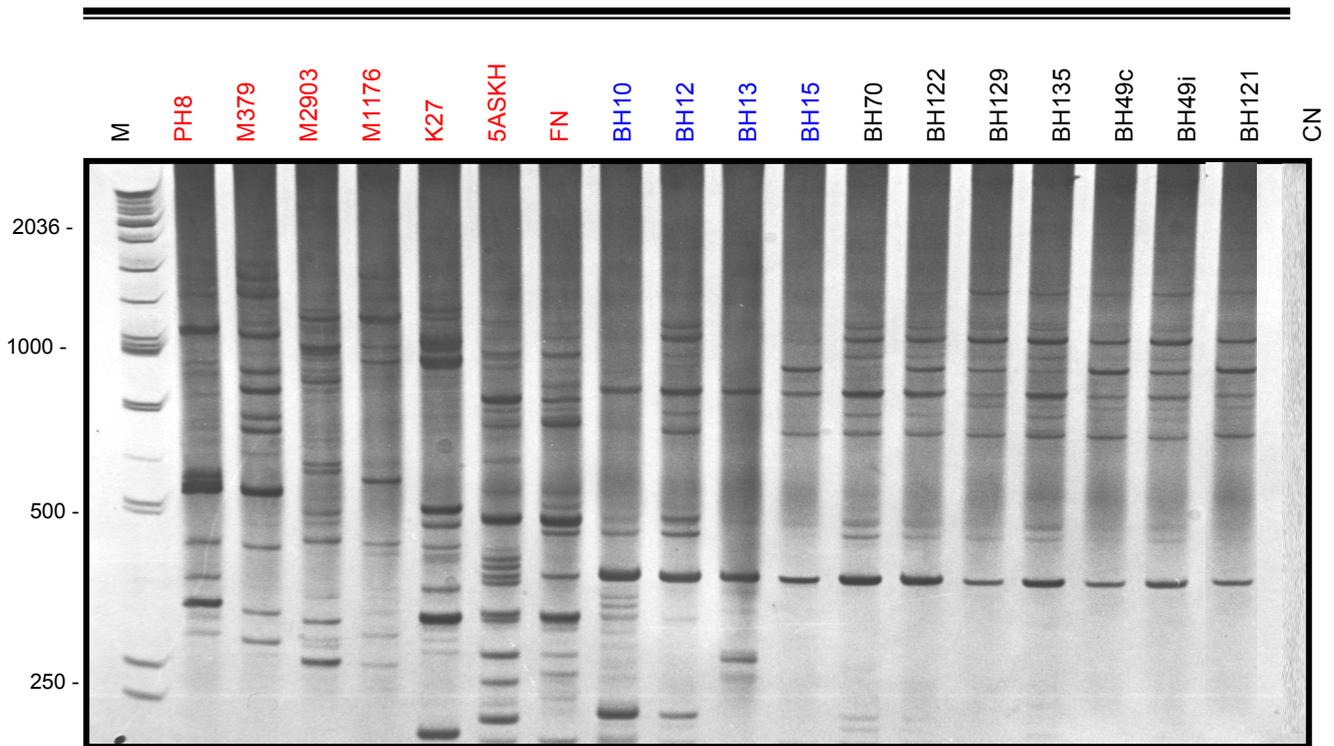


FIGURA 10A – Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador P14, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

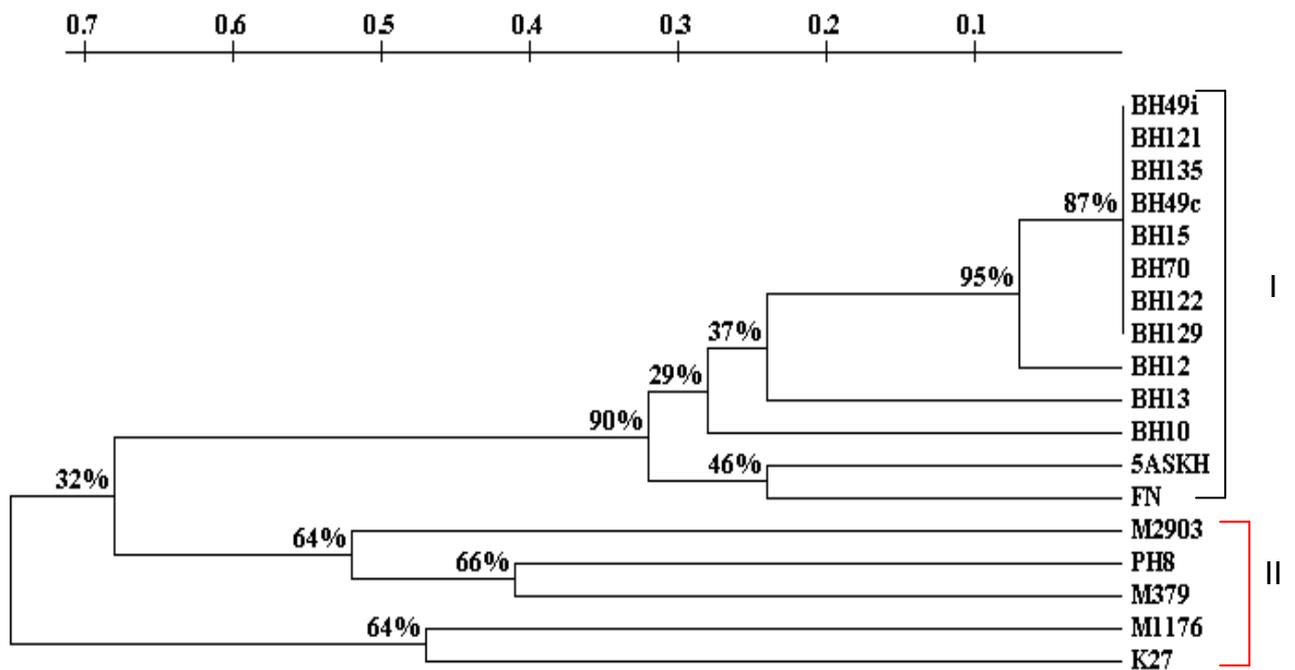


FIGURA 10B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador P14. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e de *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania sp.* de referência.

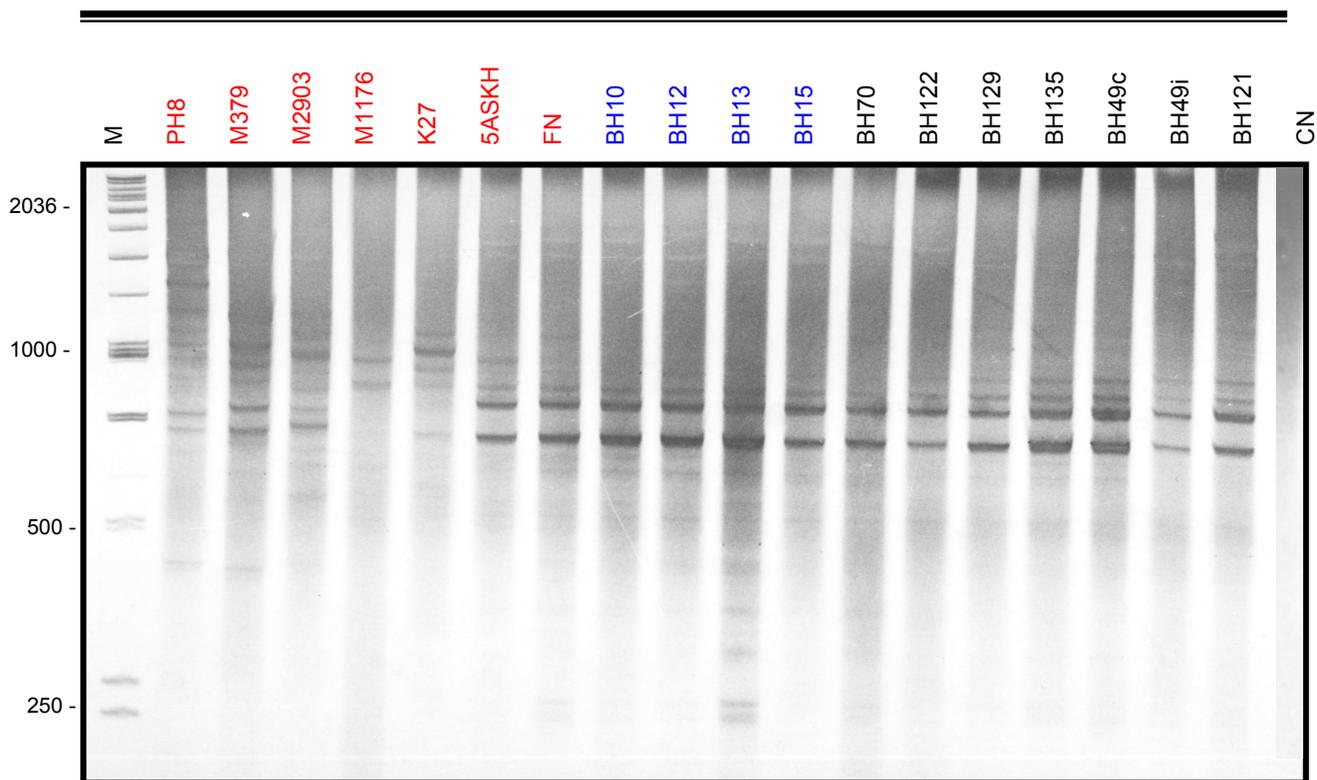


FIGURA 11A – Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador QG1, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA.
 ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

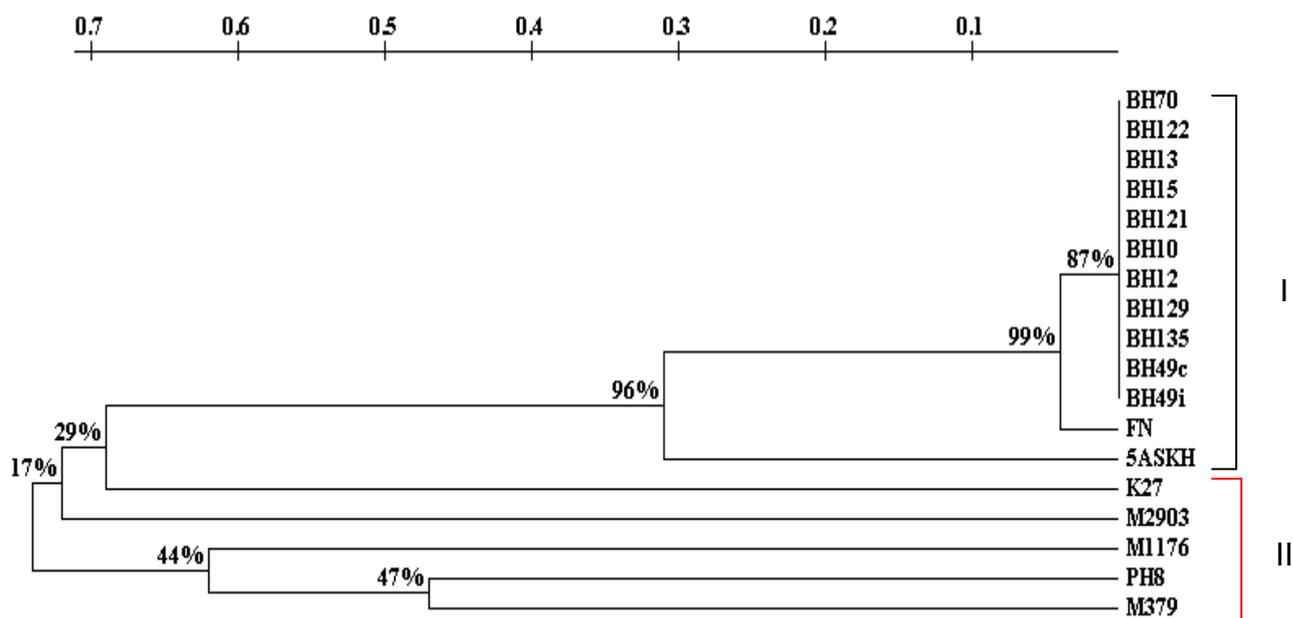


FIGURA 11B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador QG1. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania sp.* de referência.

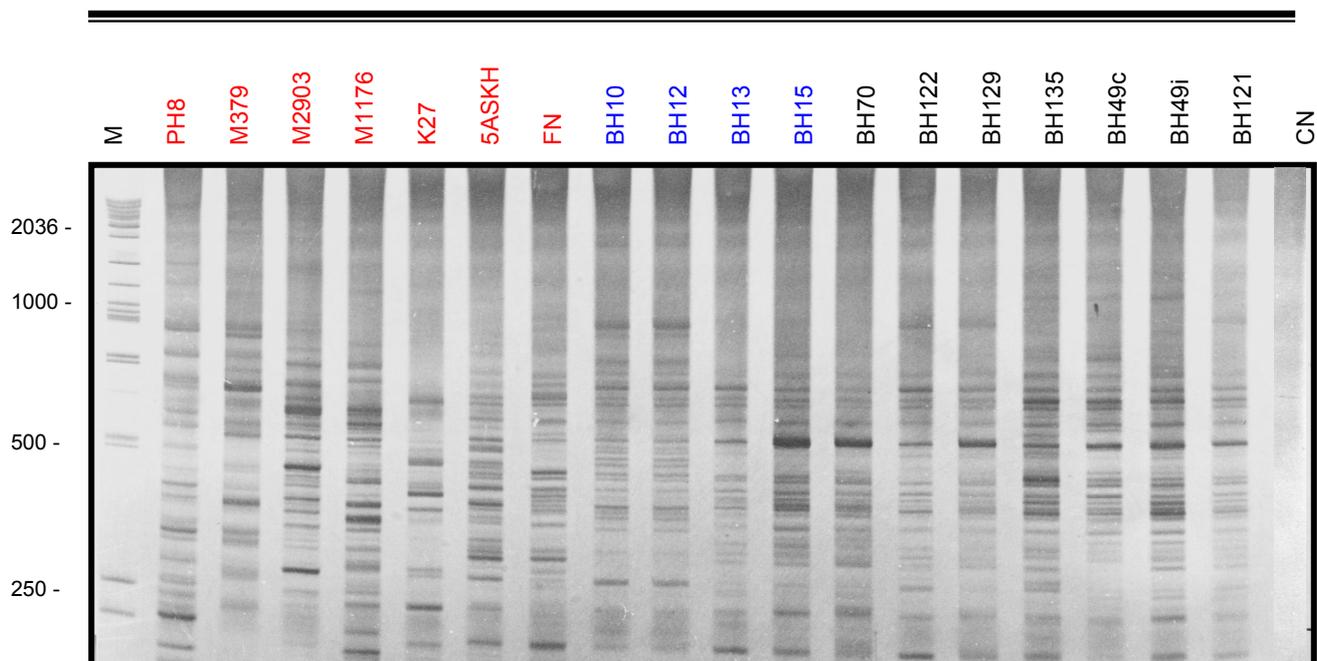


FIGURA 12A – Perfil de RAPD-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania* sp. utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador γ GT11, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA.

● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

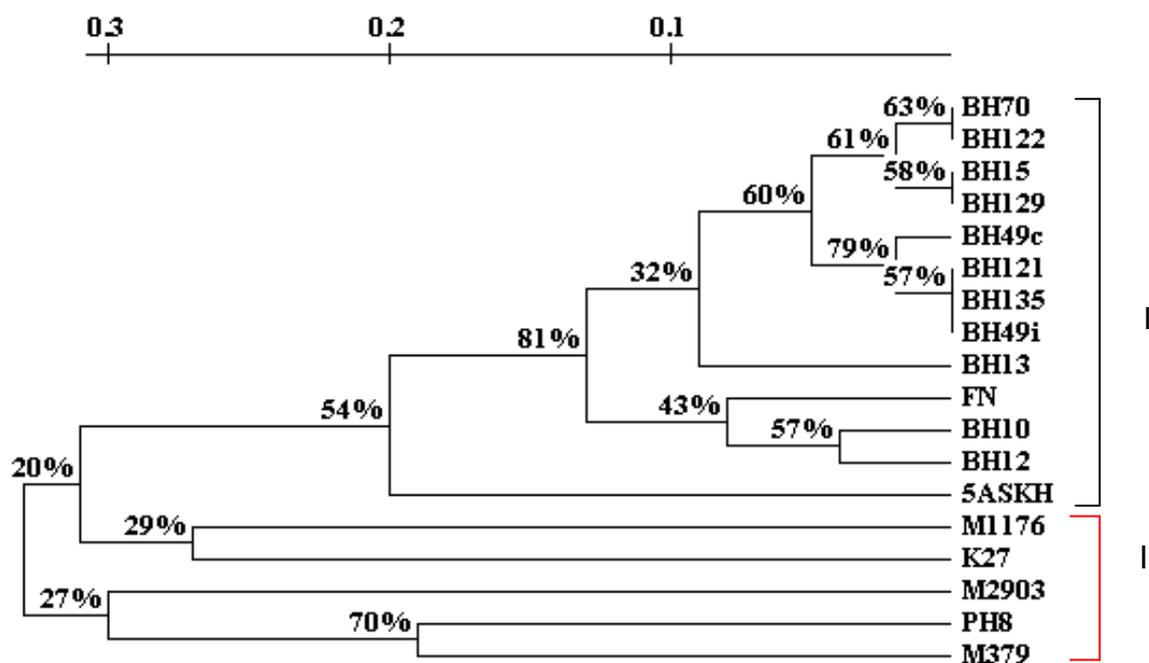


FIGURA 12B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador γ GT11. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência.

TABELA 1 - Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, M13F, M13R, QG1, L15, γ GT11 e B07.

Iniciador	Média de bandas entre todas as amostras* \pm DP	Média de bandas compartilhadas entre todas as amostras* \pm DP	Média de bandas compartilhadas entre as amostras de <i>L. major</i> e <i>L. major-like</i> \pm DP	Média da proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Média da proporção de bandas compartilhadas entre as amostras de <i>L. major</i> e <i>L. major-like</i>
P14	16,7 \pm 3,1	9,2 \pm 4,2	13 \pm 0,7	0,57	0,90
M13 F	23,7 \pm 4,2	16,6 \pm 8,2	24,5 \pm 1,9	0,67	0,94
M13 R	27,3 \pm 2,6	15,2 \pm 4,9	18,9 \pm 3,3	0,56	0,72
QG1	18,6 \pm 6,5	12,8 \pm 9,1	22,6 \pm 0,8	0,62	0,99
L15	27,0 \pm 3,6	22 \pm 5,6	26 \pm 1,1	0,78	0,92
λ GT11	25,6 \pm 2,6	20,4 \pm 4,1	24,7 \pm 1,7	0,79	0,93
B07	16,6 \pm 3,4	9,3 \pm 6,1	15 \pm 2,5	0,54	0,86
Média Geral					0,89

* Incluindo as amostras de referência da OMS: PH8, M379, M2903, M1176, K27, 5ASKH, FN.
DP – Desvio padrão

TABELA 2 – Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de *Leishmania* utilizadas no estudo, detectados por RAPD-PCR, entre 250 e 1000 pb, com os iniciadores B07, L15, M13F, M13R, P14, QG1 e γ GT11. Os números de fragmentos amplificados estão apresentados, diagonalmente em negrito. Os números abaixo e acima da diagonal representam os números de fragmentos amplificados, comuns entre dois taxa e as médias dos coeficientes de similaridade, respectivamente.

	PH8	M379	M2903	M1176	K27	5ASKH	FN	BH10	BH12	BH13	BH15	BH70	BH122	BH129	BH135	BH49c	BH49i	BH121	
PH8	131	0,58	0,49	0,45	0,44	0,45	0,45	0,42	0,43	0,42	0,43	0,43	0,45	0,42	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
M379	83	140	0,48	0,39	0,40	0,41	0,42	0,40	0,41	0,41	0,39	0,39	0,39	0,38	0,38	0,38	0,39	0,39	0,38
M2903	74	75	149	0,41	0,42	0,47	0,46	0,46	0,45	0,44	0,43	0,45	0,43	0,43	0,46	0,44	0,42	0,42	0,43
M1176	61	57	63	121	0,43	0,39	0,40	0,37	0,35	0,33	0,34	0,36	0,35	0,34	0,35	0,34	0,32	0,31	0,31
K27	60	59	65	60	130	0,53	0,50	0,46	0,47	0,45	0,44	0,46	0,45	0,45	0,45	0,44	0,43	0,42	0,42
5ASKH	71	69	81	62	85	164	0,81	0,74	0,75	0,74	0,74	0,76	0,73	0,73	0,73	0,73	0,71	0,71	0,72
FN	73	71	81	65	83	141	178	0,89	0,88	0,85	0,85	0,89	0,85	0,85	0,85	0,84	0,83	0,83	0,83
BH10	65	67	78	57	73	125	153	166	0,91	0,86	0,88	0,87	0,85	0,86	0,83	0,81	0,81	0,81	0,80
BH12	67	67	75	55	73	125	151	151	164	0,89	0,93	0,92	0,92	0,92	0,89	0,87	0,86	0,86	0,86
BH13	63	65	73	51	70	121	144	140	145	157	0,89	0,89	0,88	0,86	0,85	0,85	0,87	0,87	0,87
BH15	66	63	71	52	67	119	143	143	149	141	157	0,95	0,93	0,93	0,92	0,90	0,80	0,89	0,89
BH70	67	65	76	56	73	127	153	145	150	145	153	165	0,91	0,94	0,93	0,92	0,90	0,90	0,90
BH122	69	63	72	54	70	119	144	140	150	141	148	148	161	0,94	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
BH129	64	62	71	53	70	119	144	142	150	139	148	152	151	162	0,91	0,90	0,88	0,88	0,88
BH135	67	63	73	55	71	121	146	138	145	139	147	154	145	148	166	0,98	0,97	0,97	0,97
BH49c	67	62	74	54	70	121	144	135	143	139	144	151	145	146	163	166	0,97	0,97	0,98
BH49i	66	63	71	51	69	117	141	132	139	138	141	147	143	141	159	159	160	159	1,00
BH121	66	62	72	50	68	118	141	132	139	139	141	147	143	142	159	161	158	161	161

O fenograma consenso produzido pela análise dos perfis de RAPD-PCR das amostras de *L. major* e *L. major-like*, com os iniciadores B07, L15, M13R, M13F, P14, QG1 e γ GT11 utilizados, está apresentado na FIGURA 13.

Utilizando-se todos os iniciadores para a técnica de RAPD-PCR, com base no método da média aritmética não ponderada (UPGMA), realizado pelo programa *Treecon for Windows 2.0*, o fenograma consenso revelou, assim como para cada iniciador analisado individualmente, que não existe a formação de grupos distintos entre as amostras de *L. major* e *L. major-like* utilizadas com 100% de suporte pelo *Bootstrap* incluindo as amostras FN e 5ASKH (amostras referência de *L. major*).

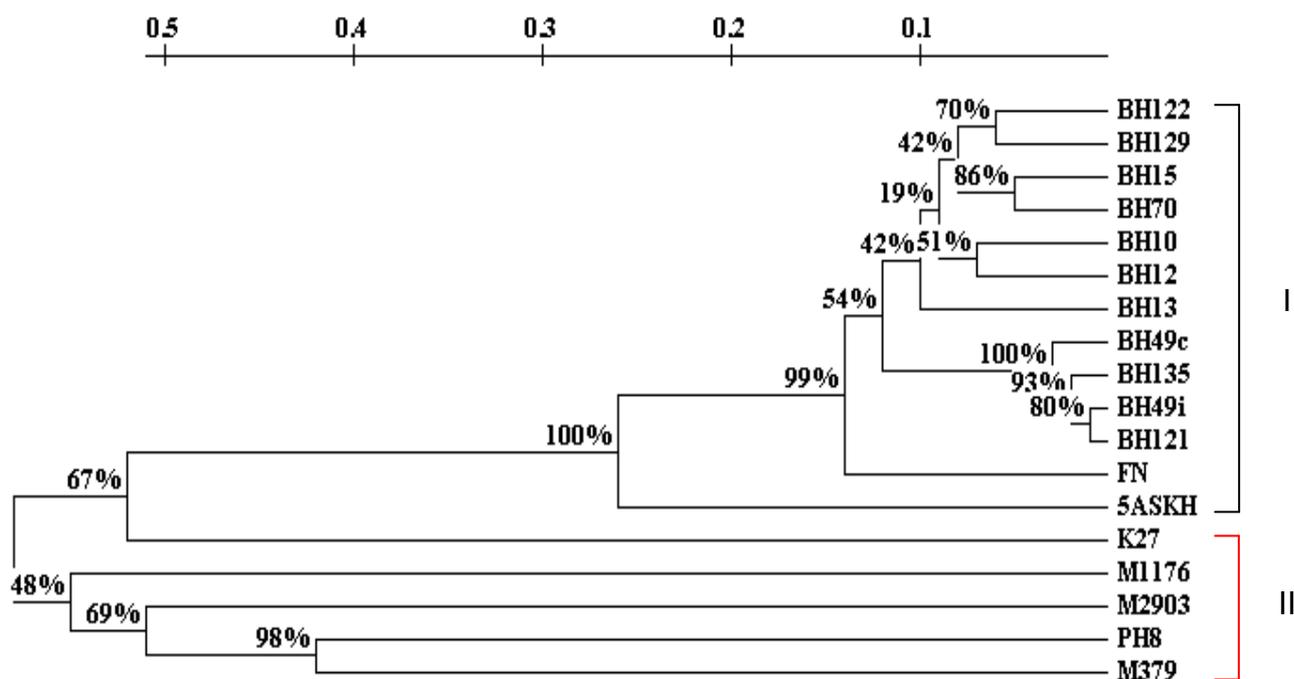


FIGURA 13 – Fenograma consenso das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major-like* e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência.

5.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase Ancorada a Repetições de Sequências Simples (SSR-PCR)

As FIGURAS 14A e 15A mostram os perfis de SSR-PCR para todas as amostras de *Leishmania* utilizadas no presente estudo com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆, respectivamente. Os resultados da SSR-PCR com os iniciadores citados também mostraram baixa diversidade genética entre as amostras de *L. major-like* e *L. major*.

A TABELA 3 mostra a média de bandas obtidas, a média de bandas compartilhadas e a proporção de bandas compartilhadas entre as amostras com os iniciadores utilizados na metodologia de SSR-PCR. Os resultados obtidos mostraram um perfil de bandas homogêneo com a média de proporção de bandas compartilhadas de 98% para o iniciador (CA)₈RY e 88% para o iniciador CAA(CT)₆.

O número total de produtos amplificados entre as amostras de *Leishmania* com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆, está apresentado na TABELA 4.

Para o cálculo dos coeficientes de similaridade e distância genética, a análise foi limitada, como para o RAPD, à amplicons entre 250 e 1000 bp. Os coeficientes de similaridade entre as amostras utilizadas no presente estudo com base na média dos coeficientes calculados para os dois iniciadores utilizados estão apresentados na TABELA 4. As amostras apresentaram coeficientes de similaridade variando de 0,22 a 1,00. Em geral, a topologia dos fenogramas construídos, com base nos produtos obtidos com os iniciadores de SSR-PCR, foi semelhante àquela observada para os fenogramas construídos com base nos produtos de RAPD-PCR, não mostrando divisão entre as amostras de *L. major* e *L. major-like*. As amostras de *L. major* e *L. major-like*, incluindo as amostras de *L. major* de referência foram agrupadas em

conjunto com 100% e 88% de suporte pelo *Bootstrap*, para o iniciador (CA)₈RY e para o iniciador CAA(CT)₆, respectivamente.

O fenograma construído pela análise de agrupamento baseada nos perfis de SSR-PCR com o iniciador (CA)₈RY de todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 14B. O fenograma gerado com os dados obtidos com o iniciador CAA(CT)₆ de todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 15B.

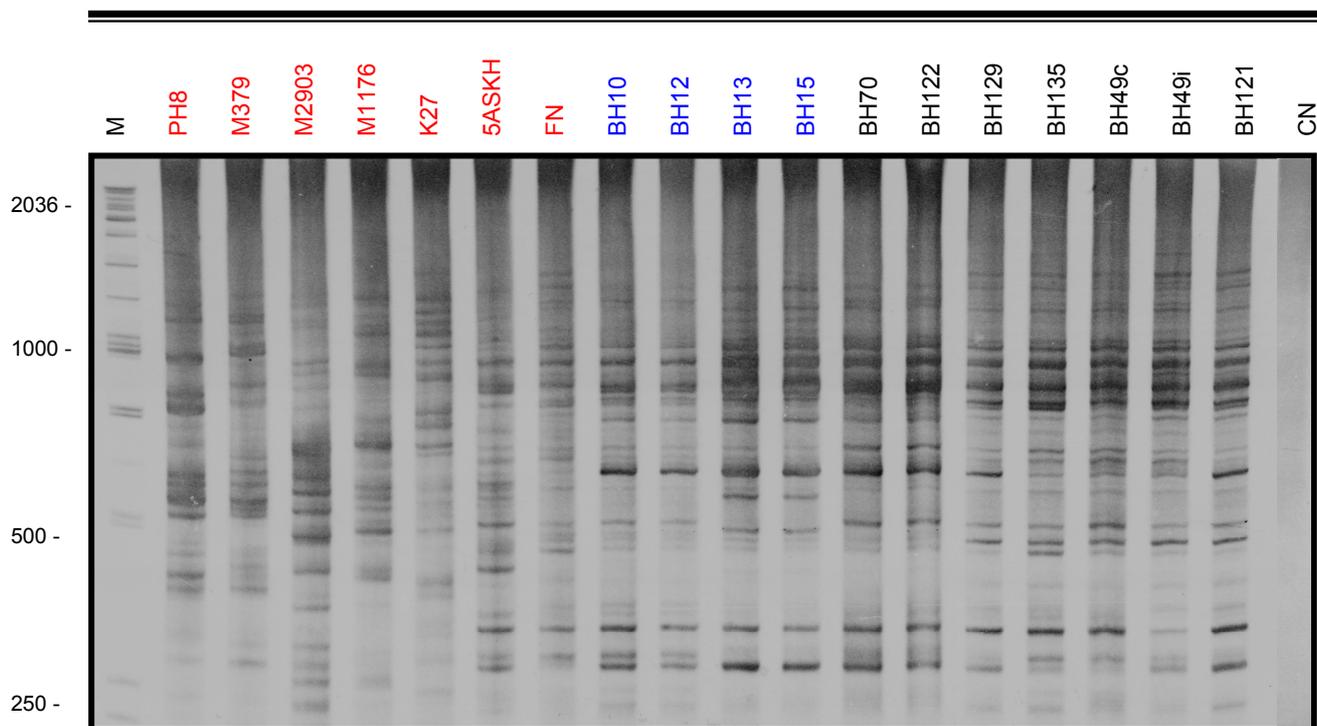


FIGURA 14A – Perfil de SSR-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania* sp. utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador (CA)₈RY, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M = marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA. ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

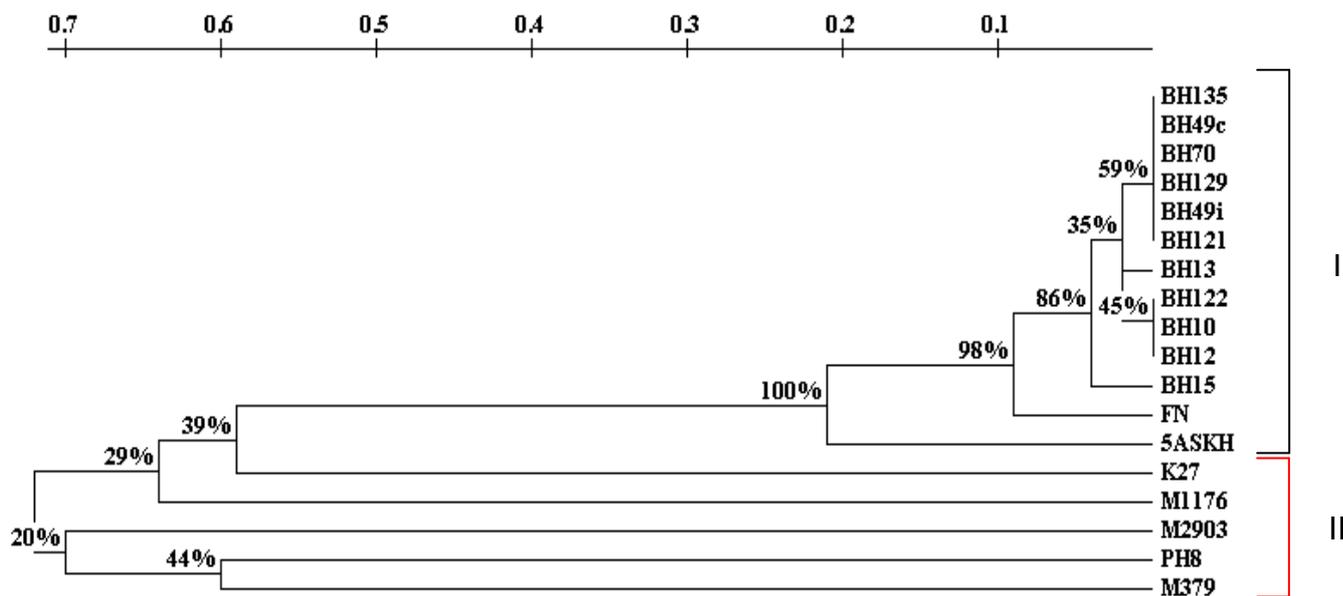


FIGURA 14B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com o iniciador (CA)₈RY. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência.

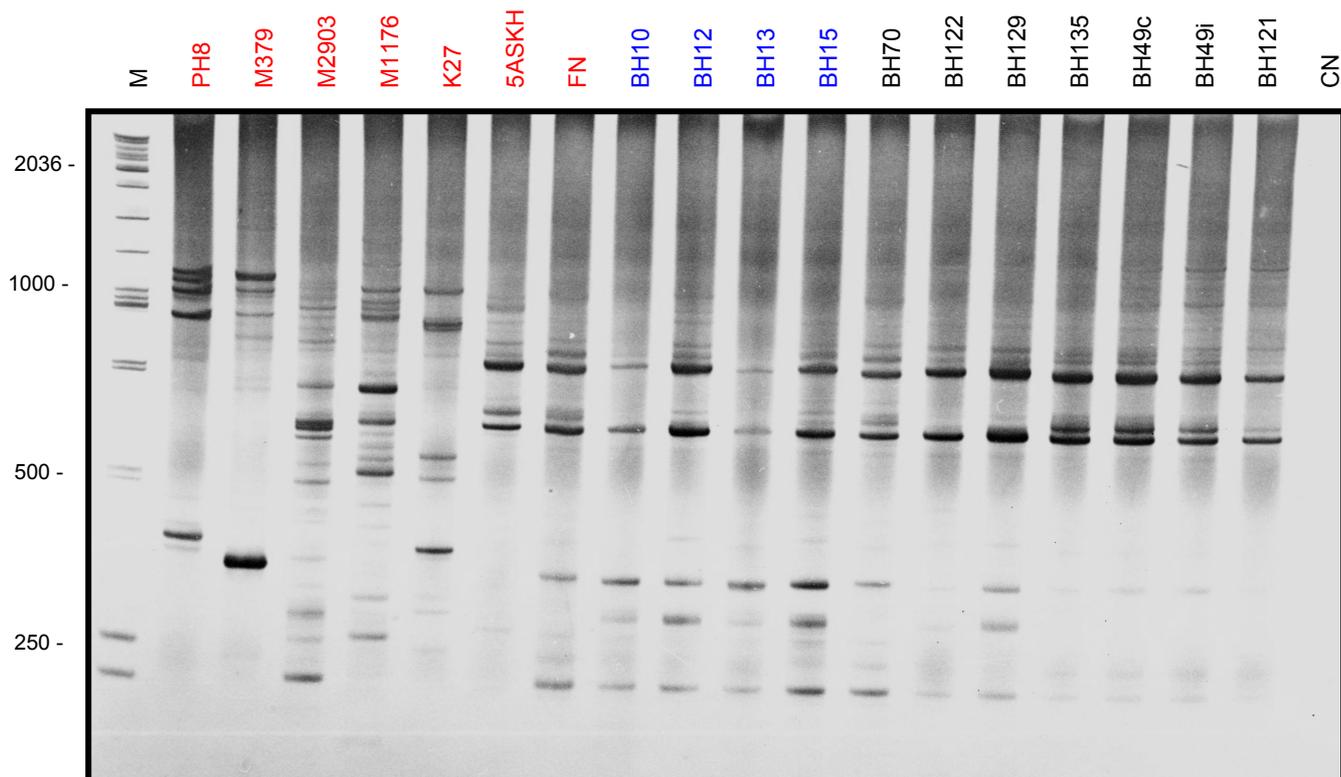


FIGURA 15A – Perfil de SSR-PCR de DNA genômico de amostras de *Leishmania sp.* utilizadas no estudo e das amostras de referência, com o iniciador CAA(CT)₆, obtido em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de massa molecular (Promega 1 kb); CN= controle negativo, sem DNA.
 ● cepas de referência ● cepas de *L. major* e ● cepas de *L. major*-like.

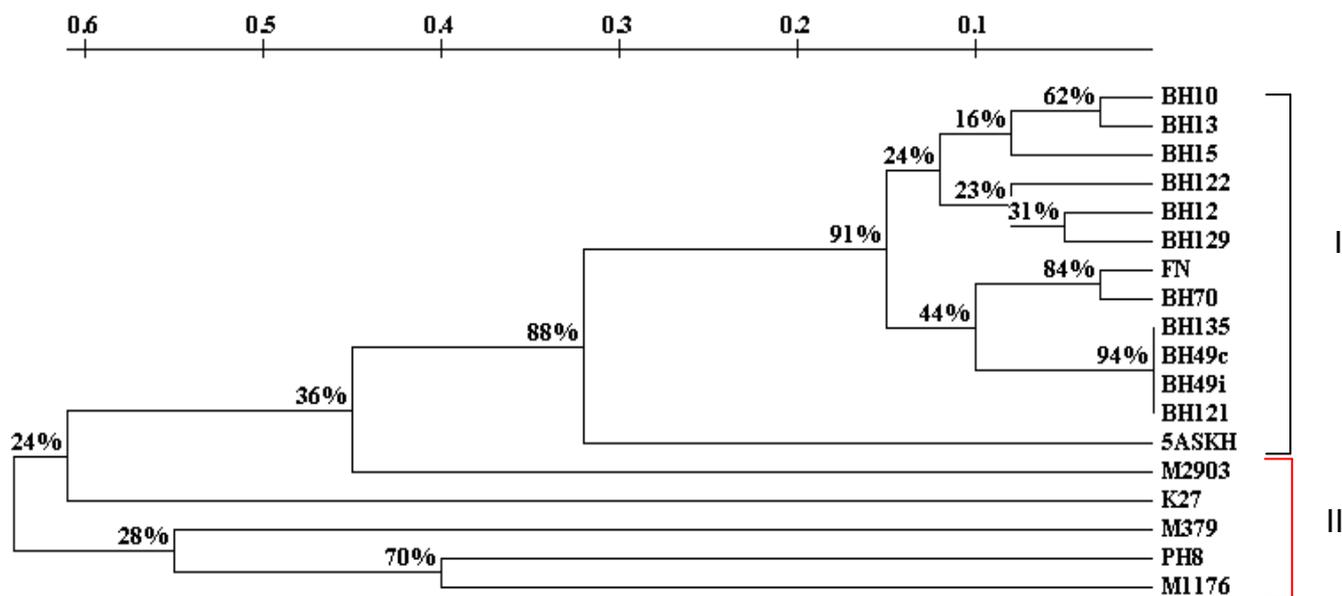


FIGURA 15B – Fenograma das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com o iniciador CAA(CT)₆. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania sp.* de referência.

TABELA 3 - Resultados obtidos com a técnica de SSR-PCR com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆ para as amostras utilizadas.

Iniciador	Média de bandas entre todas as amostras* ± DP	Média de bandas compartilhadas entre todas as amostras* ± DP	Média de bandas compartilhadas entre as amostras de <i>L. major</i> e <i>L. major-like</i> ± DP	Média da proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Média da proporção de bandas compartilhadas entre as amostras de <i>L. major</i> e <i>L. major-like</i>
(CA) ₈ RY	27,9 ± 5,3	18,8 ± 11	30,7 ± 0,8	0,63	0,98
CAA(CT) ₆	18,9 ± 3,6	12 ± 5	17 ± 1	0,63	0,88

* Incluindo as amostras de referência da OMS: PH8, M379, M2903, M1176, K27, 5ASKH, FN.
DP – Desvio padrão

TABELA 4 – Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de *Leishmania* utilizadas no estudo, detectados por SSR-PCR, entre 250 e 1000 pb, com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆. Os números de fragmentos amplificados estão apresentados, diagonalmente em negrito. Os números abaixo e acima da diagonal representam os números de fragmentos amplificados comuns entre dois taxa e as médias dos coeficientes de similaridade, respectivamente.

	PH8	M379	M2903	M1176	K27	5ASKH	FN	BH10	BH12	BH13	BH15	BH70	BH122	BH129	BH135	BH49c	BH49i	BH121
PH8	32	0,44	0,35	0,41	0,34	0,32	0,26	0,22	0,22	0,25	0,25	0,25	0,22	0,22	0,26	0,26	0,26	0,26
M379	14	33	0,42	0,33	0,29	0,28	0,31	0,31	0,30	0,31	0,30	0,31	0,31	0,31	0,32	0,32	0,32	0,32
M2903	14	17	48	0,44	0,41	0,37	0,41	0,44	0,43	0,44	0,41	0,42	0,42	0,44	0,43	0,43	0,43	0,43
M1176	16	13	21	45	0,38	0,47	0,41	0,40	0,39	0,42	0,40	0,40	0,38	0,40	0,42	0,42	0,42	0,42
K27	13	11	19	17	45	0,45	0,38	0,40	0,39	0,40	0,39	0,38	0,37	0,40	0,39	0,39	0,39	0,39
5ASKH	11	10	16	20	19	41	0,77	0,75	0,73	0,73	0,70	0,76	0,72	0,73	0,75	0,75	0,75	0,75
FN	10	13	19	19	18	35	49	0,89	0,87	0,90	0,87	0,94	0,87	0,86	0,91	0,91	0,91	0,91
BH10	9	13	21	19	19	35	45	51	0,98	0,98	0,95	0,91	0,92	0,94	0,91	0,91	0,91	0,91
BH12	9	13	21	19	19	35	45	51	53	0,96	0,95	0,92	0,95	0,97	0,91	0,91	0,91	0,91
BH13	10	13	21	20	19	34	45	50	50	51	0,94	0,92	0,90	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
BH15	10	13	20	19	19	33	44	49	50	49	52	0,92	0,90	0,92	0,86	0,86	0,86	0,86
BH70	10	13	20	19	18	35	46	47	48	47	47	50	0,91	0,92	0,95	0,95	0,95	0,95
BH122	9	13	20	18	18	34	44	48	50	47	47	47	51	0,97	0,94	0,94	0,94	0,94
BH129	9	13	21	19	19	34	43	48	50	47	47	47	49	50	0,95	0,95	0,95	0,95
BH135	10	13	20	19	18	34	44	46	47	46	44	47	47	47	48	1,00	1,00	1,00
BH49c	10	13	20	19	18	34	44	46	47	46	44	47	47	47	48	48	1,00	1,00
BH49i	10	13	20	19	18	34	44	46	47	46	44	47	47	47	48	48	48	1,00
BH121	10	13	20	19	18	34	44	46	47	46	44	47	47	47	48	48	48	48

O fenograma consenso da técnica SSR-PCR com os dois iniciadores está apresentado na FIGURA 16. Neste fenograma, tanto as amostras de *L. major*-like como as amostras de *L. major* foram mantidas num mesmo agrupamento, como observado para cada iniciador separadamente.

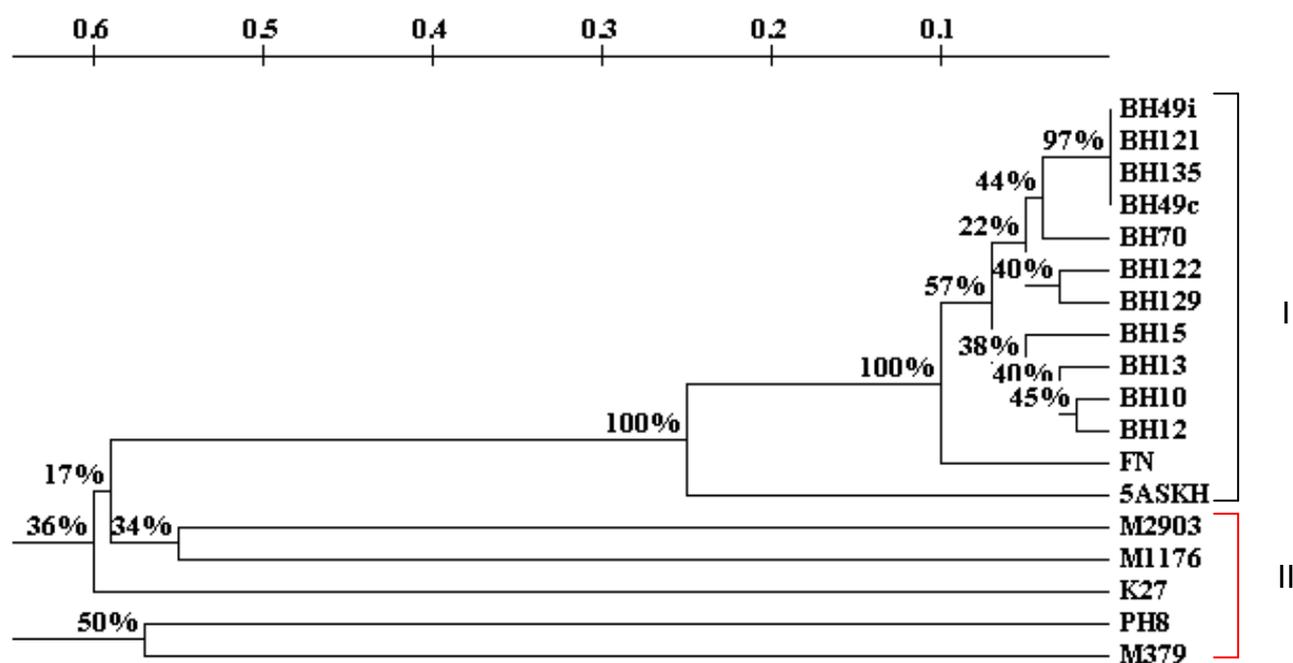


FIGURA 16 – Fenograma consenso das amostras utilizadas, com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*. I – Cepas de *L. major*-like e *L. major* de referência (FN e 5ASKH). II- Demais cepas de *Leishmania* sp. de referência.

Nas duas técnicas baseadas na PCR (RAPD-PCR e SSR-PCR), a amostra BH49, avaliada em duas subpopulações diferentes (BH49c - criopreservada após várias passagens em meio de cultura e BH49i, recém-isolada após infectar hamster) não mostrou diferenças com relação ao perfil de bandas obtido.

5.1.5 Análise estatística do RAPD-PCR e SSR-PCR

A análise estatística dos dados demonstrou não haver diferença nas proporções médias de bandas compartilhadas entre as amostras de *L. major* e *L. major-like* ($p < 0,05$). Quando se comparou as médias das proporções de bandas compartilhadas das amostras com cada um dos iniciadores, não se observou diferença significativa ($p < 0,05$).

5.2 Estudo das cepas de *L. major-like*: BH49 e BH121

5.2.1 Comportamento em meio de cultura – Curvas de crescimento

Ambas as cepas BH49 e BH121 cresceram em meio de Grace pH 6,5 e demonstraram crescimento similar tanto entre si quanto em comparação com a cepa 5ASKH de *L. major* utilizada como padrão de referência. Detectou-se pequena diferença no número de parasitos com relação ao crescimento apresentado pelas duas cepas de *L. major-like* em comparação com a cepa FN. Todas as cepas apresentaram uma fase estacionária de crescimento bem definida após o quarto dia de crescimento e atingiram um crescimento maior que 1×10^7 parasitos (FIG. 17).

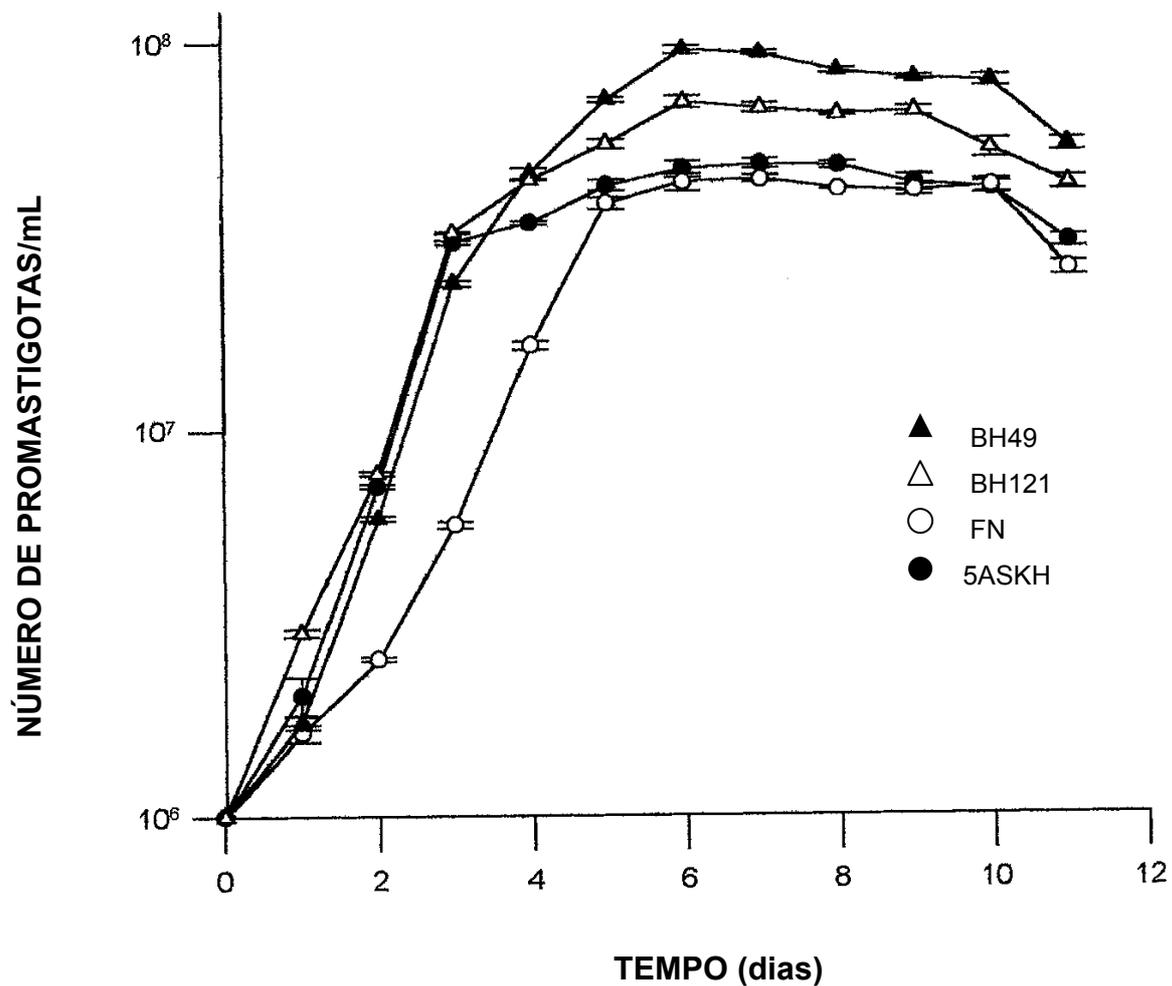


FIGURA 17 – Curva de crescimento “in vitro” das amostras de *L. major*-like BH49 e BH121 e das amostras *L. major* FN e 5ASKH utilizadas como referência. Cada ponto representa a média de duas contagens de promastigotas em meio de Grace pH 6,5 incubadas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os pontos representam a média e o desvio padrão ($X \pm DP$) de dois experimentos realizados em duplicata.

5.2.2 Testes de infecciosidade em camundongo BALB/c

A cepa BH121, assim como em hamster, também não foi capaz de infectar camundongo BALB/c. As cepas BH49 e FN foram capazes de infectar camundongo BALB/c, sendo que para ambas as cepas os animais desenvolveram lesões progressivas que não se curaram durante o período de acompanhamento, apresentando elevada carga parasitária (dados não mostrados).

A cepa BH49 infectou 80% dos camundongos inoculados, com lesões que começaram a aparecer a partir da sexta semana de inoculação. Não foram observadas a presença de metástase, nem visceralização nos camundongos inoculados com esta cepa. Os animais foram sacrificados na décima semana após a inoculação e não foi detectada metástase e nem amastigotas no baço e fígado.

A cepa FN infectou 100% dos animais, com a lesão aparecendo na primeira semana, sendo que na sexta semana já se observava a presença de úlceras e necroses na pata dos animais infectados, o que impossibilitou a continuação das medidas. Todos os animais foram sacrificados, na sexta semana, sendo o baço e fígado examinados para pesquisa de amastigotas, o que revelou a ocorrência de visceralização nestes animais, visto que ambos os órgãos pesquisados encontravam-se parasitados (dados não mostrados).

A FIGURA 18 mostra o curso da infecção desenvolvida pelos camundongos BALB/c. O grupo dos animais inoculados com a cepa FN apresentou lesões maiores ($p \geq 0,5$) e com maior variação na medida das patas, quando comparado com o grupo de animais infectados com a cepa BH49, o que ocasionou maior valor de desvio padrão na curva obtida para amostra FN.

Na FIGURA 19 pode-se observar a presença de lesão na pata direita de alguns dos animais infectados com as amostras FN e BH49, assim como amastigotas da cepa BH49.

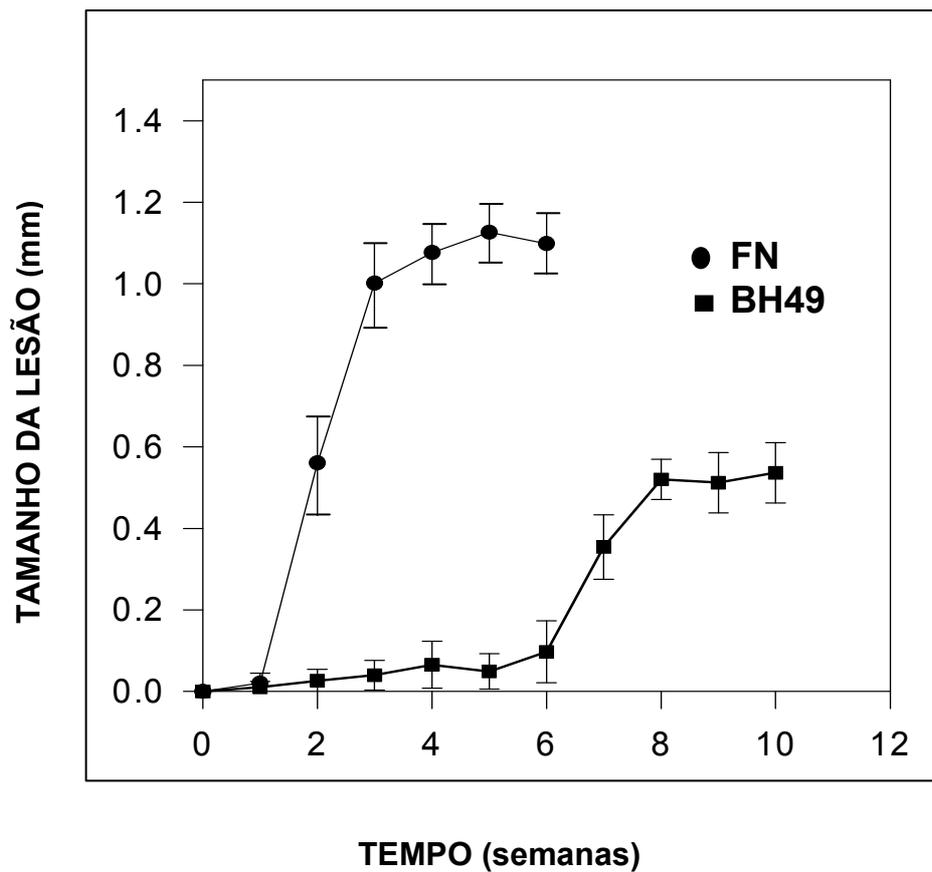


FIGURA 18– Curso da infecção em camundongos BALB/c inoculados com 1×10^6 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. major*-like, cepa BH49 em comparação com a cepa FN de referência. Cada ponto representa a média do tamanho da lesão de 5 animais e as barras representam os desvios padrões.

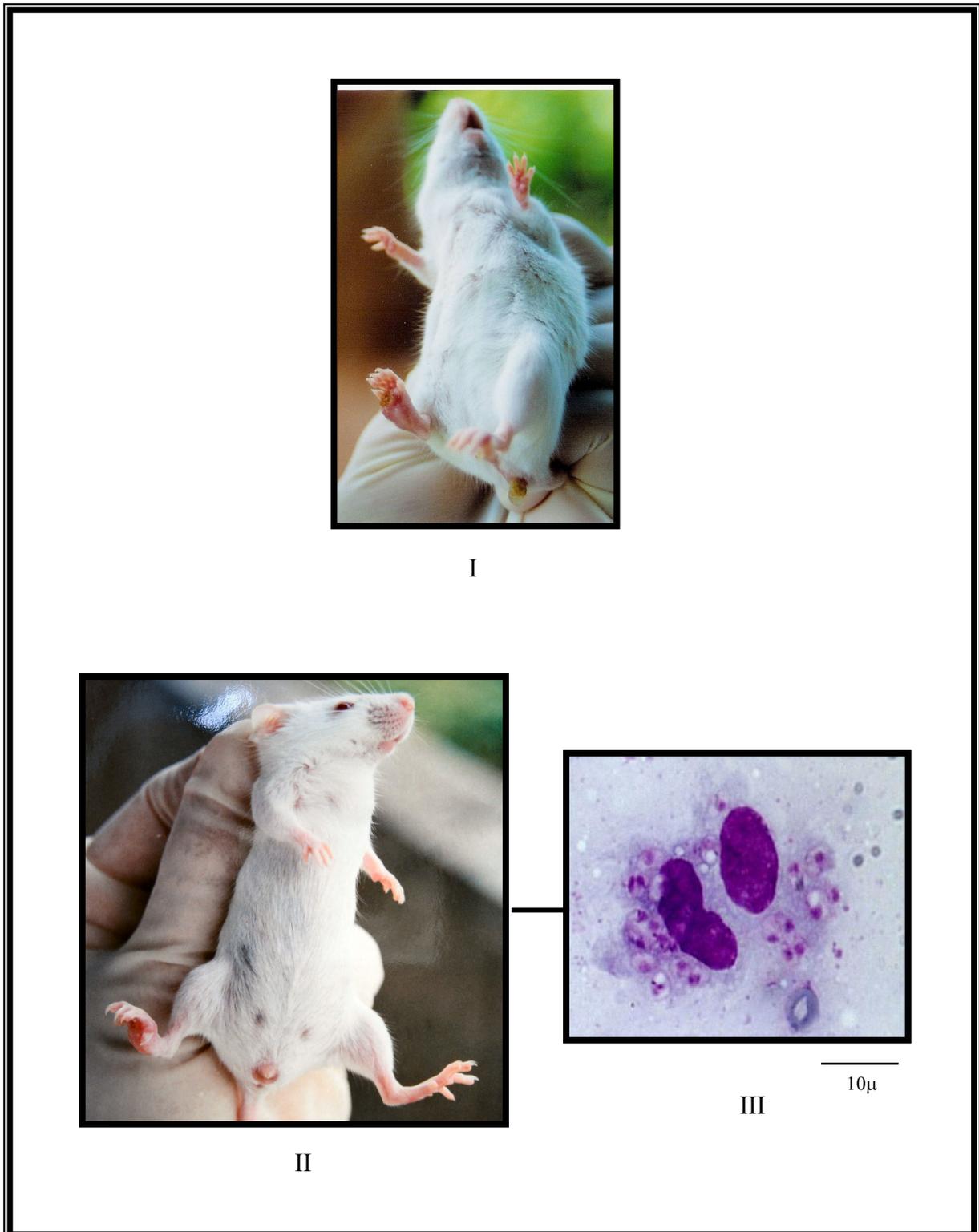


FIGURA 19 – Lesões nas patas de BALB/c inoculadas com 1×10^6 promastigotas na fase exponencial de crescimento. I - Lesão na pata direita de um animal inoculado com a cepa FN mostrando ulceração já na sexta semana de inoculação, II – Lesão na pata direita de um animal inoculado com a cepa BH49 na sexta semana mostrando ausência de ulceração e III - formas amastigotas da cepa BH49 presentes na pata (Coloração Giemsa, aumento 1000X).

5.2.3 Seleção, clonagem e sequenciamento de cDNAs diferencialmente expressos

5.2.3.1 Obtenção de populações de cDNA específicos

Utilizamos a técnica de SSH para identificar cDNAs diferencialmente expressos nas amostras de *L. major*-like - BH49 e BH121, as quais apresentaram padrão de infecciosidade diferente para camundongo BALB/c. A FIGURA 20 mostra o perfil eletroforético de fragmentos de cDNA específicos obtidos para as duas amostras após a primeira amplificação, utilizando o iniciador 1 (PCR 1) e após a segunda amplificação utilizando a Nested-PCR com os iniciadores 1 e 2R (PCR 2), os quais promovem a amplificação exponencial das moléculas tipo e, ou seja, aquelas que apresentam os dois adaptadores (1 e 2R) ligados em cada uma das extremidades e que representam cDNAs diferencialmente expressos.

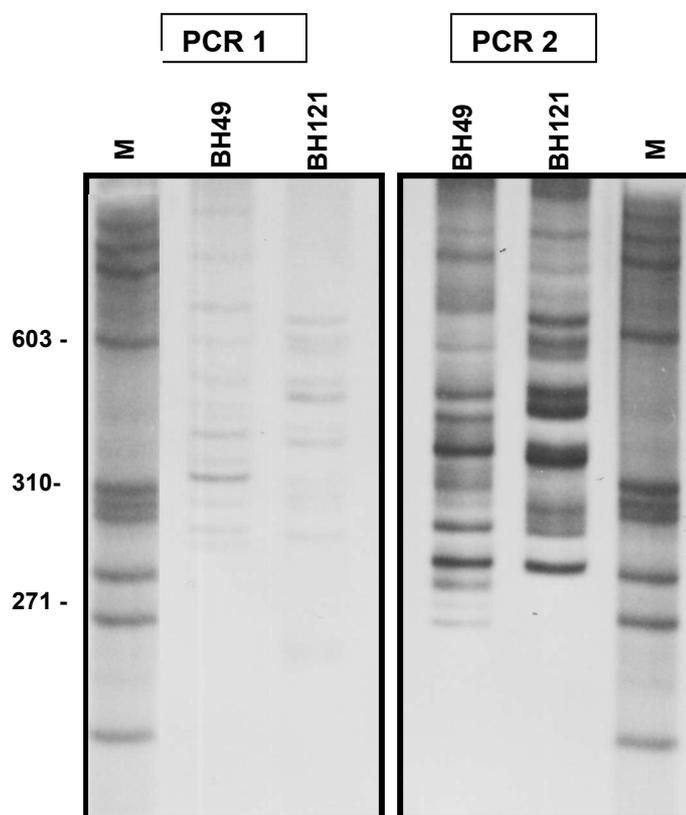


FIGURA 20 – Gel de poliacrilamida 5% corado pelo nitrato de prata mostrando os produtos da reação de PCR 1 e da reação de PCR 2 das amostras BH49 e BH121 após a subtração. M – ϕ X174.

A FIGURA 21 mostra os produtos da PCR 2 aplicados em gel de agarose e a diferença no padrão de bandas antes e depois do processo de subtração (canaletas 1 e 2 para o cDNA da amostra BH49 e canaletas 4 e 5 para a amostra BH121) indica que o processo foi bem sucedido. Quatro populações de cDNAs foram produzidas pela técnica SSH a partir das amostras de *L. major*-like (cepas BH49 e BH121) depois do processo de subtração. Em um processo de subtração bem sucedido, o padrão de bandas apresentado pelo DNA de uma determinada célula ou tecido antes do processo de subtração deve ser diferente daquele observado após a realização do mesmo.

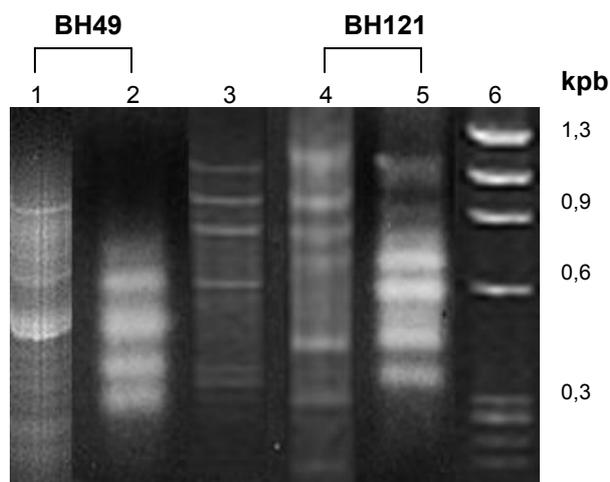


FIGURA 21- Gel de agarose a 1% em TBE 1X, corado com brometo de etídeo (0,1 μ g/mL) representando os produtos da segunda reação de PCR. As canaletas 1 e 2 correspondem aos cDNAs da amostra BH49 antes e depois do processo de subtração, respectivamente. A canaleta 3 representa o controle positivo fornecido pelo "Kit" que consiste em uma mistura de DNAs de ϕ X174 digeridos pela enzima de restrição *Hae* III, submetidos a um processo bem sucedido de subtração. Nas canaletas 4 e 5 estão os cDNAs da amostra BH121 antes e depois do processo de subtração, respectivamente. Canaleta 6, marcador de massa molecular ϕ X174 DNA/*Hae* III.

5.2.3.2 Isolamento, clonagem e sequenciamento dos cDNAs diferencialmente expressos

O perfil de bandas obtido após a reação de subtração para cada amostra utilizada pode ser observado na FIGURA 21. Para a amostra BH49 foram observadas aproximadamente 5 bandas diferencialmente expressas. Já para a amostra BH121 observou-se aproximadamente 8 bandas. Os DNAs destas bandas foram purificados e clonados conforme descrito na seção 4.4.5. De cada sequência clonada foram selecionadas colônias brancas para confirmação da presença do inserto e posterior purificação do DNA plasmidial. A FIGURA 22 mostra os produtos da reação de PCR utilizando os iniciadores 1 e 2R e DNA plasmidial obtido a partir de colônias bacterianas.

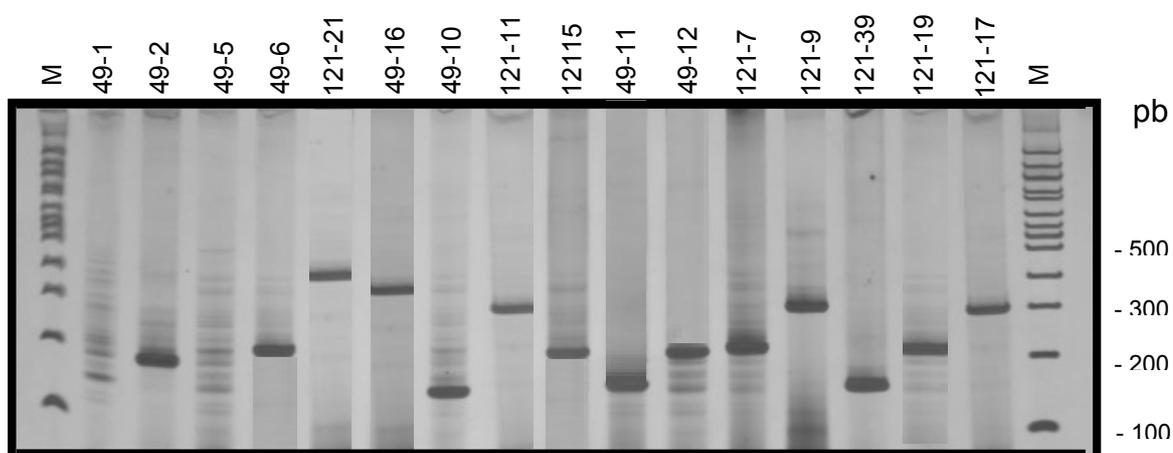


FIGURA 22 – Gel de poliacrilamida 5% corado pelo nitrato de prata mostrando os produtos da PCR realizada com colônias bacterianas utilizando os iniciadores 1 e 2R. M – marcador de massa molecular 100pb.

Os DNAs plasmidiais foram isolados e os tamanhos dos insertos foram confirmados através de reações de digestão utilizando a endonuclease de restrição *Eco* RI (dados não mostrados). Os clones que apresentaram inserto foram avaliados quanto a sua integridade em gel de agarose 1% e encaminhados para reações de sequenciamento.

Todos os cDNAs obtidos foram totalmente sequenciados e suas sequências analisadas por comparação com sequências já descritas em bancos de dados de domínio público (BLASTN e BLASTX do NCBI e Omniblast do Instituto Sanger, ExpASy Proteomics Server).

5.2.3.3 Proteínas possivelmente codificadas pelos cDNAs

A tabela 5 apresenta a caracterização dos clones obtidos dos fragmentos subtraídos e a identificação das possíveis proteínas correspondentes. Foram obtidas um total de 9 sequências que mostraram homologia significativa com genes conhecidos de *Leishmania* sp (IVENS et al., 2005).

TABELA 5: Identificação das possíveis proteínas codificadas pelos cDNAs específicos de cada uma das cepas de *L. major*-like.

Clone	Acesso no Genbank	Tamanho (pb)	Localização (Nº cromossomo)	Proteína homóloga	F/P ^a	Similaridade (%)	Identidade (%)	Valor de E
49-2	XP843260.1	180	<i>L. major</i> cr 35	Proteína hipotética conservada	60/680	100	100	1e-12
49-10	CP000078.1	115	<i>L. major</i> cr 2	Região flanqueada por: - Galactosiltransferase-3, beta-fosfoglicano-1,3 - Histona h4	-	92	92	4e-37
49-16	AL390629.1	282	<i>L. major</i> contig	Alfa-hemolisina	-	89	89	3e-20
49-28	CAJ03159.1	428	<i>L. major</i> cr 29	Proteína hipotética conservada	141/270	99	99	1e-72
121-6	XP847826.1	467	<i>L. major</i> cr 29	Proteína hipotética da região endomembrana proteína 70	155/680	99	98	1e-84
121-9	CAJ08960.1	255	<i>L. major</i> cr 36	Proteína hipotética conservada	84/1055	100	100	5e-42
121-19	XP843135.1	182	<i>L. major</i> cr 35	Proteína L30 - 60 S ribossomal	60/104	100	100	1e-25
121-21	CAJ09547.1	360	<i>L. major</i> cr 36	Proteína hipotética conservada	120/670	100	100	1e-63
121-39	XP843296.1	118	<i>L. major</i> cr 35	Proteína L36 - 60 S ribossomal	38/105	100	100	4e-15

^a - F/P= Número de aminoácidos do fragmento/ Número de aminoácidos da proteína homóloga.
Valor de E= Corresponde à possibilidade de que o alinhamento tenha ocorrido por acaso. Alinhamentos com alta identidade apresentam valor de E igual ou próximo de zero.

5.2.3.4 Análises por RT-PCR

Para confirmar se os cDNAs selecionados pela técnica de SSH são exclusivos de uma das cepas de *L. major*-like estudadas, reações de RT-PCR foram realizadas a partir do mRNA extraído das cepas BH49 e BH121. Para a PCR, iniciadores específicos foram sintetizados baseando-se na sequência codificante de cada cDNA selecionado. As sequências dos iniciadores utilizados nesta etapa estão mostradas no QUADRO 6. Os resultados obtidos na RT-PCR estão mostrados na figura 23.

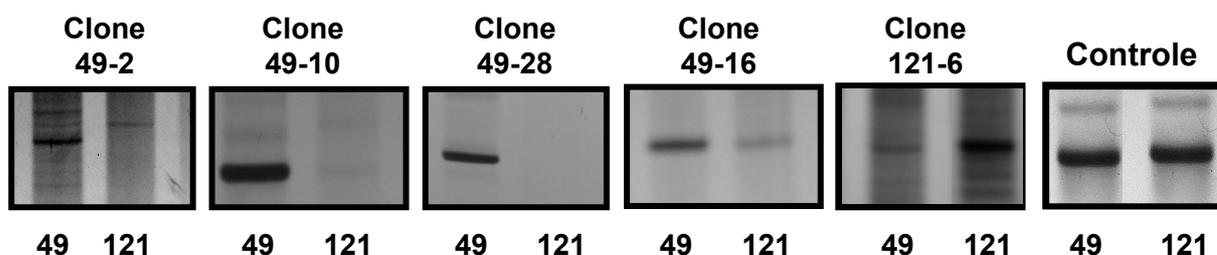


Figura 23- Gel de poliacrilamida 5% corado pela prata, mostrando os amplicons gerados pela técnica de RT-PCR para cada um dos clones selecionados a partir das cepas BH49 e BH121. Foram aplicados 5 μ L do produto da PCR de cada amostra. Clone 49-2, proteína hipotética; clone 49-10, região flanqueada pelo gene da galactosiltransferase-3, beta-fosfoglicano-1,3 e da histona H4; clone 49-28, proteína hipotética; clone 49-16, alfa-hemolisina e clone 121-40, proteína hipotética de membrana. Como controle foi utilizado um par de iniciadores para região conservada do kDNA de *Leishmania* sp.

Como pode ser observado pela figura 23, dos 9 genes diferencialmente expressos, cinco foram confirmados pela RT-PCR, sendo quatro da cepa virulenta (BH49) e um da cepa avirulenta (BH121).

DISCUSSÃO

6 Discussão

6.1 Estudo das amostras de *L. major*-like isoladas no Brasil

As formas tegumentares de leishmaniose no continente americano, agrupadas na síndrome genericamente chamada de Leishmaniose Tegumentar Americana ocorrem em uma vasta extensão deste continente, onde são causadas por espécies pertencentes aos dois subgêneros: *Leishmania* (SAF'JANOVA, 1982) e *Viannia* (LAINSON & SHAW, 1987).

As modificações dos ecótopos naturais, provocadas pelo homem induziram alterações na eco-epidemiologia da LTA com o surgimento de novas situações epidemiológicas. Estas mudanças, assim como o *status* imune, falhas no tratamento e resistência a drogas, são fatores de risco para re-emergência e expansão geográfica da doença. Excetuando-se a co-infecção Leishmania-HIV, estes fatores não são sistematicamente monitorados e sua interação é pobremente estudada e entendida. O conhecimento das espécies que ocorrem em uma dada área, isto é, a identificação e caracterização dos parasitas, que são pré-requisitos essenciais para estudos epidemiológicos, formam a única base firme para um melhor entendimento da patologia, quimioterapia, profilaxia e controle das leishmanioses. Ultimamente, vários estudos têm sido voltados para caracterização de amostras de *Leishmania* detectadas em remanescentes de focos antigos e também em locais onde antes não eram encontradas.

As várias espécies de *Leishmania*, que podem infectar o homem, apresentam diferenças quanto à forma clínica, na sua virulência e na resposta aos agentes quimioterápicos. Dessa forma, a identificação correta dos parasitos isolados do homem, animais reservatórios e vetores é considerada essencial em todos os

aspectos da pesquisa em leishmanioses. Os estudos sobre identificação e classificação de *Leishmania* são relevantes e consistentes com as prioridades estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde que definiu: “Um conhecimento taxonômico acurado é fundamental na prática, desde que a expansão das informações concernentes ao parasito e à doença é possível somente, quando novos fatos podem ser relacionados a parasitos adequadamente caracterizados e classificados” (WHO, 1984). Portanto, o conhecimento de dados biológicos, bioquímicos e moleculares torna-se fundamental para o estabelecimento de critérios epidemiológicos e clínicos a serem inferidos e utilizados com relação ao parasito e a doença estabelecida.

LAINSON & SHAW (1968) preconizaram o emprego de características do comportamento dos parasitos “in vitro” e “in vivo” para estabelecer as bases de caracterização biológica de *Leishmania*. Atualmente, muitos métodos estão sendo utilizados na tentativa de melhor caracterizar estes parasitos. Embora, novas técnicas bioquímicas, incluindo o sequenciamento do genoma, forneçam os mais diretos e absolutos meios para classificar os organismos, deve-se ainda agrupar os dados bioquímicos com outras formas de expressão fenotípica das espécies de *Leishmania* nos hospedeiros, tais como a manifestação clínica, a distribuição da doença e o comportamento biológico dos parasitos.

As metodologias empregadas, em estudos de caracterização de qualquer organismo, apresentam vantagens e desvantagens em sua utilização. A escolha de uma determinada técnica depende basicamente dos objetivos que se pretende alcançar. Neste trabalho, a escolha das técnicas utilizadas se baseou em dados da literatura que mostravam a aplicabilidade das mesmas aos nossos objetivos. Nosso objetivo principal com este estudo foi o de contribuir para o conhecimento dos

parasitos que circulam no Brasil e conseqüentemente para o melhor entendimento da epidemiologia da LTA, sem a intenção precípua de realizar análises filogenéticas ou evolutivas.

Em geral, os estudos que incorporam ambos dados biológicos e moleculares levam a uma melhor compreensão e interpretação da diversidade biológica, que aqueles que só focalizam apenas uma destas características. Nós associamos aos parâmetros biológicos, parâmetros de biologia molecular e bioquímicos na caracterização das cepas estudadas.

Desde os estudos iniciais de LAINSON & SHAW (1970), o desenvolvimento de *Leishmania* na pele do hamster tem sido utilizado como um critério para identificar e caracterizar parasitos isolados de casos humanos e animais no Novo Mundo (SHAW & LAINSON, 1976; LAINSON et al., 1986; 1989; 1990; SILVEIRA et al., 1987; KREUTZER et al., 1991; YOSHIDA et al., 1993).

O crescimento de *Leishmania* em animais de laboratório permite definir duas características desses parasitos: o tropismo e a velocidade do crescimento, os quais são importantes como parâmetros básicos de caracterização biológica (LAINSON e SHAW, 1972). A caracterização utilizando esses parâmetros constitui os passos iniciais daqueles que querem caracterizar e identificar *Leishmania*, sendo de grande utilidade nos estudos biológicos desses parasitos.

Depois de isoladas de lesões de formas tegumentares humanas e apenas uma de cão, as cepas de *Leishmania* utilizadas neste trabalho foram cultivadas em meio NNN/LIT e criopreservadas. Posteriormente, duas delas (cepas BH49 e BH121, escolhidas para serem estudadas mais profundamente) foram passadas para o meio quimicamente definido MD29 (MELO et al., 1985), mantidas durante várias passagens neste meio, quando então foram criopreservadas. Em conjunto com

quatro amostras de *L. major* oriundas de pacientes que se infectaram no Iraque, todas as amostras foram, inicialmente, avaliadas quanto ao comportamento na pele de hamster (*Mesocricetus auratus*).

A capacidade de *Leishmania* se estabelecer com sucesso no hospedeiro mamífero está ligada a vários fatores dependentes do hospedeiro e do parasito propriamente dito. Em relação ao parasito, esta capacidade parece estar ligada, dentre outras características, à sua forma evolutiva.

De acordo com CHANG et al. (1985) e WILSON et al. (1979), as formas amastigotas são, em geral, mais infectantes do que as promastigotas. Porém, no nosso experimento trabalhamos com promastigotas provenientes da fase estacionária de crescimento em cultura, as quais, como demonstrado por GIANNINI (1974) são mais infectantes para hamsters que aquelas da fase logarítmica.

As promastigotas da fase estacionária apresentam maior resistência à lise pelo complemento do soro humano normal (FRANKE et al., 1985) e há vários marcadores moleculares capazes de discriminar entre promastigotas infectantes e não infectantes (DORAN & HERMAN, 1981; NOLAN & HERMAN, 1985; CHAUDHUIR & CHANG, 1988).

Em nossos experimentos, excetuando-se a cepa BH121, todas as outras amostras foram infectantes para os hamsters. As infecções foram feitas inoculando-se, via intradérmica no focinho dos animais, promastigotas da fase estacionária, com a utilização de seringa. A inoculação de animais através do uso de seringa provoca um ambiente altamente favorável à proliferação dos parasitos devido à abundância de macrófagos que invadem a área traumatizada (LAINSON & SHAW, 1987).

WILSON et al. (1979) estudando o estabelecimento da infecção de cepas de *L. braziliensis* e *L. mexicana* em hamster mostraram que a via de inoculação tem

influência no estabelecimento de lesões cutâneas. A capacidade de produzir períodos curtos de incubação utilizando-se a via de inoculação intradérmica foi superior à via subcutânea. Por esta razão, utilizamos a via intradérmica para a inoculação dos animais.

Embora já tenha sido demonstrado grande variação no período de incubação em hamsters infectados com *Leishmania* sp. (ZELEDÓN et al., 1969; WALTON et al., 1977), o período de incubação das cepas estudadas foi de poucas semanas, variando de 4 a 6 semanas, resultado semelhante aos encontrados por Soliman (2005). Pode ser que este fato tenha ocorrido devido à utilização do inóculo, quando as cepas estavam na quarta passagem “in vitro”.

Todas as amostras apresentaram comportamento semelhante, tanto entre si, como também quando comparadas com as cepas de referência de *L. major* (FN), causando lesões nodulares pequenas no ponto de inoculação, com tendência à ulceração depois de duas semanas.

A pesquisa de metástases em outros pontos diferentes daquele de inoculação, revelou que a grande maioria das cepas estudadas não foi capaz de desenvolver metástase, nem visceralização, pois não foram encontradas amastigotas nas vísceras (baço e fígado) e medula óssea; exceto a cepa BH70, que não ocasionou lesão no ponto de inoculação, mas apresentou amastigotas no local. Esta cepa desenvolveu nos animais inoculados um quadro de visceralização e nos animais sacrificados, após 10 semanas, observamos ascite, edema, hepatoesplenomegalia e amastigotas nas vísceras, como mostrado na FIGURA 4. Duarte et al. (1988) utilizaram a cepa BH70 num estudo de comportamento biológico em hamster em comparação com uma cepa de *L. chagasi* mostrando diferença no comportamento histopatológico de lesões caudadas no baço e no fígado pelas duas cepas.

Soliman (2005), estudando o comportamento de amostras de *L. major* em hamsters (*Mesocricetus auratus*) observou que 61,7% dos animais infectados desenvolveram lesões cutâneas restritas ao ponto de inoculação, enquanto que o restante dos animais (38,3%) desenvolveram lesões cutâneas em locais distantes do ponto de inoculação ou metástases, tais como orelhas e nariz.

A metástase na pele do hamster é um evento raro em animais infectados por *L. braziliensis* (LAINSON & SHAW, 1972; KAHL et al., 1991), mas ela ocorre mais frequentemente nos animais infectados com espécies do grupo *L. mexicana* (LAINSON & SHAW, 1987).

Poucos estudos documentaram a disseminação transitória ou esporádica de amastigotas de *L. major* em locais distantes do ponto de inoculação em hamsters (STENGER et al., 1996; NICOLAS et al., 2000) e a possível tendência à visceralização (SOLIMAN, 2005).

O estudo desenvolvido por Soliman (2005), confirmou através da pesquisa de amastigotas em esfregaços corados pelo Giemsa e por reações de PCR, a persistência e a disseminação de amastigotas de *L. major*, para locais distantes do ponto de inoculação (sangue, baço e fígado) em hamsters que apresentaram lesões cutâneas disseminadas.

Em nosso estudo, a ausência tanto de metástases como a visceralização pode ser devida à curta duração dos experimentos, uma vez que quando o processo de ulceração se instalava, os animais eram sacrificados. A visceralização tem sido observada sempre no início da infecção, sobretudo nos animais inoculados com *Leishmania* do complexo *braziliensis*. Ela é transitória e os parasitos tendem a desaparecer com o desenvolvimento da infecção no ponto de inoculação. Já as metástases demoram mais tempo para aparecer e tendem a permanecer até a morte

do animal. Metástases em hamster são mais comuns às infecções por *Leishmania* do complexo mexicana (LAINSON & SHAW, 1987). Pode ser que nossos experimentos, o tempo de observação dos animais tenha sido muito longo para detectar visceralização e muito curto para detecção de metástases.

Apenas a cepa BH70 causou visceralização afetando baço, fígado e medula óssea e levando ainda a presença de ascite e edema nos animais. A cepa BH70 constitui a única cepa estudada isolada de leishmaniose cutânea canina. Embora Grevelink & Lerner (1996) tenham documentado que parasitas causadores de leishmaniose cutânea não invadem as vísceras em humanos, os resultados encontrados por Soliman (2005) contradizem tal proposição e sugerem uma possível tendência à visceralização da *L. major*. Outros autores têm mostrado espécies de *Leishmania* que causam formas tegumentares, causando forma visceral no homem (BARRAL et al., 1986) e ao contrário, espécies de *Leishmania* que causam formas viscerais causando lesões cutâneas (NOYES et al., 1997; BELLI et al., 1999). Fatores como a resposta imune do hospedeiro, a espécie do parasito e também a espécie do hospedeiro infectado têm importante papel na persistência dos parasitos e na susceptibilidade dos diferentes animais infectados.

É universalmente aceito que o padrão ouro para caracterizar e identificar *Leishmania* é a análise de isoenzimas. A técnica tem sido utilizada em estudos taxonômicos de *Leishmania* e diversos autores demonstraram que, entre as espécies distintas, há um considerável grau de diversidade enzimática e que, entre os membros do mesmo complexo, era observada uma variabilidade significativamente menor, ou até mesmo não detectável (ALJEBOORI & EVANS, 1980; AL-TAQI & EVANS, 1978; BRAZIL, 1978; GRIMALDI JR et al. 1991;

KREUTZER et al. 1987; LAINSON et al. 1981; MILES et al. 1980; PETERS et al. 1981; SCHNUR et al. 1981; MOMEN et al., 1987).

Uma grande vantagem apontada por Andrews & Chilton (1999), em relação aos estudos isoenzimáticos, é que vários locos podem ser examinados em grande número de amostras em um tempo menor e com custos mais baixos. Entretanto, a nosso ver, uma limitação da técnica é a necessidade que os parasitos sejam mantidos em meio de cultura para a obtenção de um grande número (da ordem de 10⁹) para a realização desses estudos.

Em nosso estudo, para todos os sistemas enzimáticos utilizados, as amostras apresentaram eletromorfos bem definidos, idênticos entre si e idênticos ao padrão observado para as amostras de *L. major* utilizadas como referência (5ASKH e JIZLH118) e também para as amostras de *L. major*, provenientes do Velho Mundo incluídas no estudo. Essas amostras foram diferentes das outras espécies de *Leishmania* sp. utilizadas como padrão de referência (PH8, M379, M1176, LS94 e M2903).

As enzimas utilizadas no estudo foram escolhidas segundo descrição relatada em trabalhos anteriores (SALIBA et al., 2004; MARCO et al., 2006) e segundo sugestão do Dr. David A. Evans, autor da metodologia utilizada neste trabalho (EVANS, 1989).

Os resultados obtidos com a eletroforese de enzimas nos levou a designar as amostras estudadas como *L. major*-like, em virtude da similaridade encontrada com o zimodema das amostras de *L. major* de referência. Outros autores já haviam descrito na América cepas semelhantes à *L. major* (HASCHIGUCHI et al., 1991; KATAKURA et al., 1993; SHAW, 1994) e a denominação *L. major*-like foi

primeiramente dada por Momen et al. (1985) as cepas fenotipicamente semelhantes à *L. major*.

O próximo passo foi então estudar as amostras geneticamente, utilizando as técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR, a procura de marcadores genéticos que pudessem, em associação aos dados biológicos e bioquímicos, caracterizar as amostras de *L. major*-like com maior precisão.

Os dois métodos baseados em PCR (RAPD-PCR e SSR-PCR) também apresentaram resultados que evidenciaram similaridade entre as amostras de *L. major*-like e *L. major*, incluindo as duas amostras de *L. major* utilizadas como padrão de referência (5ASKH e FN).

O perfil de bandas gerado pelas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR foi utilizado na construção de fenogramas pelo método UPGMA. A distância genética entre todas as amostras foi pequena (menor que 1), indicando a similaridade entre as espécies estudadas. Os genomas já anotados e descritos para *Leishmania* mostram que, mesmo as diferentes espécies, se apresentam muito semelhantes (PEACOCK et al., 2007).

A análise por ambas as técnicas agrupou as amostras de *L. major*-like juntamente com as amostras de *L. major*, incluindo no mesmo grupo as amostras de *L. major* de referência, com 100% de suporte pelo *bootstrap*, detectados pelo fenograma consenso, o qual agrupou o perfil obtido para todas as amostras, com todos os iniciadores utilizados nas duas diferentes técnicas.

Na técnica de SSR-PCR, o iniciador CAA(CT)₆ mostrou um grau de polimorfismo um pouco maior que o iniciador (CA)₈RY. Campos et al. (2002) e Ferreira et al (2004) usaram essa mesma técnica para estudar a variabilidade genética de populações de *Biompharia glabrata* e cepas de *Toxoplasma gondii*

respectivamente, e também obtiveram maior polimorfismo com o iniciador CAA(CT)₆. Este iniciador amplifica parte dos microsátélites, assim como a região entre os microsátélites, enquanto que o iniciador (CA)₈RY amplifica somente a região localizada entre os microsátélites. O que poderia explicar a maior variabilidade observada com este iniciador.

A técnica de RAPD foi utilizada, com sucesso, por Motazedian et al., (1996) para distinguir as principais espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (*L. tropica*, *L. major* e *L. infantum*), como também para estudar amostras de *Sauroleishmania*, provenientes do Irã. A ocorrência de hibridização entre amostras de *L. braziliensis* e *L. panamensis/L. guyanensis*, isoladas de casos humanos no Equador, foi evidenciada através da aplicação das técnicas de eletroforese de enzimas e RAPD, sendo observada uma concordância nos resultados das duas técnicas (BAÑULS et al., 1997). Bañuls et al. (1999) observaram novamente a concordância nos resultados das técnicas de eletroforese de enzimas e RAPD, ao estudarem o *status* filogenético da cepa de referência Friedlin de *L. major* em relação a um painel de espécies de *Leishmania*.

Em nosso estudo também detectamos a concordância dos resultados da eletroforese de enzimas e as técnicas baseadas em PCR (RAPD-PCR e SSR-PCR), na caracterização das amostras das *Leishmaniae* estudadas. Através dos resultados obtidos, foi possível observar, pela associação dos parâmetros avaliados - métodos biológicos, bioquímicos e moleculares – que as amostras isoladas por nós, no Brasil, são muito semelhantes à *L. major*, espécie característica do Velho Mundo. Gomes et al. (1995) estudando as relações genéticas entre amostras de *L. braziliensis* de diferentes áreas do Brasil mostraram que a variabilidade genética entre amostras

isoladas no Pará e em Minas Gerais foi maior que a observada por nós entre *Leishmania major*-like e *L. major*.

Amostras de *L. major*-like foram originalmente denominadas por Momen et al. (1985) de “*Brazilian Leishmania* (Tipo III)” , quando através da análise do perfil isoenzimático foram indistinguíveis da cepa de referência de *L. major*, característica do Velho Mundo. Posteriormente, amostras de *L. major*-like foram também isoladas no Equador (HASHIGUSHI et al., 1991), no Peru (SHAW, 1994), na Venezuela, e também em diferentes regiões do Paraguai (YAMASAKI et al., 1994). Na maior parte destes estudos foram a eletroforese de enzimas e a reatividade com anticorpos monoclonais, as técnicas capazes de detectarem as similaridades existentes entre as amostras isoladas e a cepa de *L. major*.

Na maioria dos trabalhos envolvendo a caracterização de amostras de *L. major*-like, quando utilizada a análise do perfil de restrição do kDNA (esquizodemas), foi encontrado menor nível de similaridade entre as amostras, caracterizadas previamente por zimodemas e sorodemas como *L. major*-like e a cepa de referência de *L. major*. Embora, esta observação possa ser justificada, em parte, pela heterogeneidade existente entre as regiões de minicírculos presentes no kDNA de *Leishmania* sp., estas amostras podem também representar novas espécies. Como descrito por Katakura et al. (1993) o cariótipo das amostras de *L. major*-like isoladas no Equador apresentou-se diferente do cariótipo de *L. major*, o que indica que as amostras de *L. major*-like do Novo Mundo podem diferir da *L. major* do Velho Mundo com relação a ambas, organização do DNA do cinetoplasto e do DNA cromossomal.

Apesar da origem dos parasitos caracterizados como *L. major*-like no Novo Mundo permanecer obscura, vale considerar que os mesmos podem ocorrer de forma autóctone no Novo Mundo, como sugerido por Hashigushi et al. (1991).

Algumas explicações poderiam ser utilizadas para justificar a presença dos parasitos semelhantes à *L. major* no Novo Mundo, como:

- i) os pacientes dos quais foram isoladas as amostras adquiriram a infecção em áreas endêmicas de *L. major*. Porém, para as nossas amostras caracterizadas como *L. major*-like, nenhum dos indivíduos dos quais se isolou os parasitos, viajou para fora do Brasil anteriormente. A cepa BH70 por nós isolada, por exemplo, foi proveniente de um caso de leishmaniose canina da região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais.

Quatro cepas de *L. major*, utilizadas no nosso estudo, foram isoladas a partir de indivíduos que se infectaram no Iraque, região endêmica de *L. major*. A história pregressa destes pacientes foi especialmente estudada: No final da década de 70 e início dos anos 80, a construtora Mendes Júnior, empresa de construção civil, brasileira, com sede em Minas Gerais, foi a empresa contratada para a construção da ferrovia Baghsah-Akashat, da rodovia Expressway e de uma estação de bombeamento de água do rio Eufrates (Projeto Sifão) no Iraque, fruto de uma prestação de serviços brasileiros, oferecidos ao Iraque em decorrência de um desequilíbrio na balança comercial Brasil-Iraque, existente na época. Tal situação demandou, como descrito pela própria empresa Mendes Júnior, um complexo de planejamento logístico de pessoas, acomodações, hospital, escolas, supermercados e clubes no Iraque. Em meados da década de 80, as obras foram concluídas e os trabalhadores brasileiros e suas famílias voltaram ao Brasil. Algumas dessas pessoas, incluindo mulheres e crianças voltaram ao país de origem apresentando lesões de leishmaniose cutânea. Em 1985, quatro desses casos, tiveram o parasito isolado e caracterizado por nós como *L. major* (dados não mostrados).

Embora estes indivíduos, infectados no Iraque, representassem possíveis focos de introdução deste parasito no Brasil, o que poderia explicar a origem das amostras de *L. major*-like encontradas em nosso país e possivelmente em outros países sulamericanos, quatro, do grupo de amostras de *L. major*-like, por nós caracterizado, foram isoladas anteriormente ao período de regresso dos trabalhadores brasileiros (dados confirmados pela construtora Mendes Júnior). A amostra BH49 foi isolada no ano de 1971, as amostras BH70 e BH121 no ano de 1973 e a amostra BH122 no ano de 1982. Portanto, a origem destas quatro amostras, não pode ser atribuída ao retorno dos indivíduos que se infectaram por *L. major* no Iraque.

- ii) Provável contaminação em laboratório. Para nós, esta hipótese é inviável, devido ao rigoroso controle com que as cepas foram isoladas e mantidas em nosso laboratório. Estas amostras foram obtidas uma a uma, isoladas, mantidas e criopreservadas separadamente. Ademais, além de utilizarmos somente duas cepas de *L. major*, estas não são normalmente cultivadas em nosso laboratório, mas sim criopreservadas. Além disso, as amostras de *L. major*-like estudadas não são idênticas às amostras de *L. major* de referência, como mostrado em nossos resultados de infecção em animais experimentais, RAPD-PCR e SSR-PCR.
- iii) Introdução da *L. major* no Brasil, assim como ocorrido para *L. infantum*, devido a determinados fatores, como por exemplo, a colonização pelos europeus e a vinda de escravos africanos acompanhados de seus cães e ainda, a chegada de imigrantes ou roedores do Velho Mundo (MOMEN et al., 1985). Este é um fator real

que poderia ser considerado como causa da origem de amostras similares a *L. major* no continente americano. O parasito, depois de introduzido ao local, teria se adaptado aos vetores e hospedeiros existentes aqui, estabelecendo, assim, um ciclo de transmissão indígena.

A figura 24 mostra a distribuição de amostras de *L. major*-like em países da América do Sul. As localidades de 1 a 9 referem-se a amostras de *L. major*-like relatadas em estudos anteriores: as localidades 1, 2-5, 6 -7, e 8 e 9 referem-se às amostras de *L. major*-like relatadas por Grimaldi et al (1989), Momen et al., (1985) e Deane & Grimaldi (1985), Hashiguchi et al., (1991), e Yamasaki et al., (1994), respectivamente. As localidades 10 (Goiás-GO) e 11 (Vale do Rio Doce-MG) referem-se às amostras de *L. major*-like isoladas e estudadas no presente trabalho.

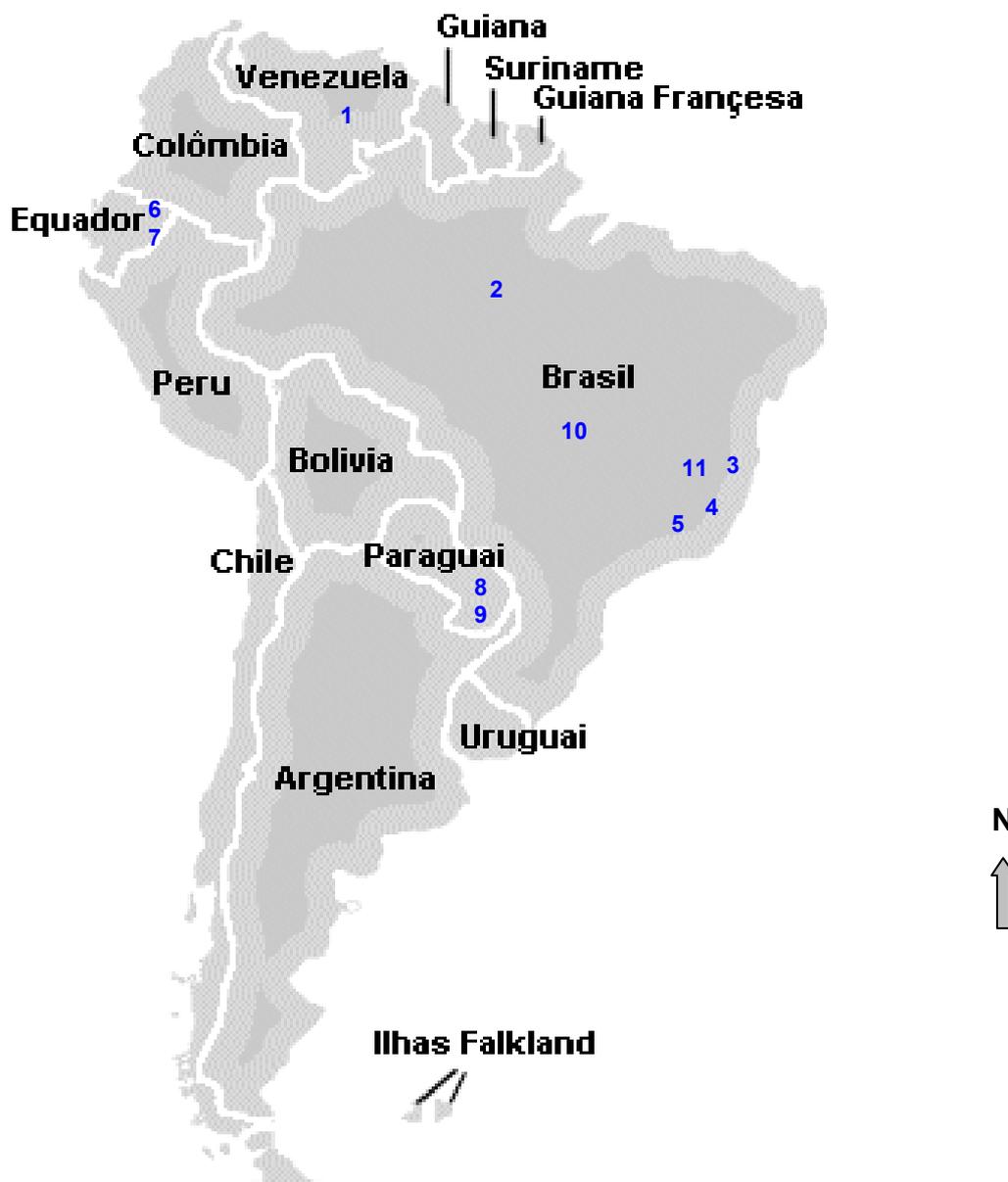


FIGURA 24 – Distribuição de *L. major*-like na América do Sul. As localidades incluídas no mapa correspondem àquelas citadas em trabalhos anteriores utilizados como referencial teórico para este estudo: 1- Grimaldi et al (1989); 2, 3, 4 e 5 - Momen et al., (1985) e Deane & Grimaldi (1985); 6 e 7 - Hashiguchi et al., (1991); 8 e 9 - Yamasaki et al., (1994) e 10 e 11 – amostras estudadas no presente trabalho.

Estudos para determinar o padrão de infecção das cepas de *L. major*-like (BH49 e BH121) em *Lutzomyia longipalpis* foram realizados, entretanto, a maioria dos insetos não resistiu à infecção. Aqueles que sobreviveram apresentaram apenas poucas promastigotas confinadas ao intestino médio (dados não mostrados).

Segundo Shaw (2003), os vetores e hospedeiros dessa espécie no Brasil permanecem indeterminados.

A conclusão com os trabalhos até o momento realizados é que amostras de *L. major-like* estão presentes em várias áreas do Novo Mundo (Venezuela, Equador, Brasil, Peru e Paraguai) e portanto, a existência desta espécie como agente causador da leishmaniose tegumentar deve ser considerada em estudos de identificação de *Leishmania* sp. isoladas no Novo Mundo, bem como em estudos de investigação epidemiológica de LTA.

6.2 Estudo das amostras de *L. major-like*: cepas BH49 e BH121

Como já mencionado duas das cepas de *L. major-like* foram utilizadas por Mayrink et al. (1979) no desenvolvimento da vacina Anti-LTA e também em kits para diagnóstico de leishmaniose visceral canina (BARBOSA DE DEUS et al., 2002) e foram por nós estudadas com relação ao crescimento “in vitro”, “in vivo” e em técnicas bioquímicas e moleculares.

As duas cepas foram estudadas com relação ao comportamento em meio de cultura. De fato, a cinética do crescimento de *Leishmania* em meios de cultura tem trazido importantes informações sobre estes parasitos. As promastigotas provenientes de meios de cultura têm sido as formas mais utilizadas em estudos bioquímicos, imunológicos, de biologia molecular e testes de drogas “in vitro”.

Em meio de cultura, as amastigotas isoladas dos tecidos de mamíferos se transformam em promastigotas dentro de 24 a 48 horas dependendo do meio de cultura utilizado e, em seguida, o processo de multiplicação é iniciado. Embora o meio de cultivo para o desenvolvimento de *Leishmania* “in vitro” possa variar, a temperatura apropriada ao desenvolvimento das formas promastigotas deve ser

mantida entre 21 a 28°C e o pH ótimo para o crescimento deve ser geralmente próximo ao pH neutro ou ligeiramente alcalino: 6,5 a 7,5 (MELO, 1982; BATES, 1994).

Ambas as cepas foram capazes de crescer no meio de Grace, pH 6,5 e apresentaram comportamento similar tanto entre si quanto com a amostra de *L. major* de referência utilizada (cepa 5ASKH), apresentando uma fase estacionária de crescimento bem definida após o quarto dia de crescimento e atingindo um crescimento maior que 1×10^7 parasitos. Os dados obtidos com o crescimento em meio de cultura (curvas de crescimento) dessas cepas serviram de base para o estudo do comportamento das mesmas em animais de laboratório (fase estacionária) e das técnicas moleculares (fase exponencial de crescimento, item 4.3.3.1).

Durante o estudo do comportamento em hamster, observamos que estas duas amostras demonstraram um comportamento diferenciado, embora mostrassem geneticamente semelhantes, como detectado pelas técnicas de RAPD e SSR-PCR, para aquelas regiões analisadas e tenham apresentado o mesmo perfil isoenzimático.

Quando isoladas, estas amostras foram criopreservadas e não infectaram animais de laboratório, incluindo hamster. Estas cepas foram passadas para meio quimicamente definido - MD29 (Melo et al., 1985) e após inúmeras passagens neste meio, a cepa BH49, que antes não infectava animais de laboratório, passou a infectar hamster (*Mesocricetus auratus*) e a cepa BH121, continuou sendo não infectante para esses animais (dados não mostrados).

Muitos pesquisadores já descreveram que subcultivar *Leishmania* sp. pode levar a uma redução na infecciosidade do parasito (SEMPREVIVO et al., 1981;

NOLAN & HERMAN, 1985). A perda da infecciosidade varia com o meio de cultura e com o tipo de ensaio utilizado (NEAL, 1983).

A perda da infecciosidade pode ser devida, em parte, à seleção de subpopulações avirulentas de promastigotas capazes de crescer mais rapidamente em cultura (NOLAN & HERMAN, 1985). A transformação de amastigota em promastigota também está associada a mudanças na infecciosidade (CHANNON et al, 1984), atividades enzimáticas (MALLINSON & COOMBS, 1986), propriedades antigênicas (JAFFE & McMAHON-PRATT, 1988), massa mitocondrial, conteúdo de citocromo e carboidratos de superfície (WILSON & PEARSON, 1984).

Sabemos que o tipo de meio de cultura pode afetar o índice de crescimento de *Leishmania* sp. Os meios complexos, por conterem sangue, soro ou seus derivados, podem variar em sua composição química e no metabolismo das células nele cultivadas (MELO, 1982). Já os meios quimicamente definidos, por não conterem macromoléculas e serem pobres em nutrientes poderiam estimular a diferenciação das promastigotas em formas metacíclicas, favorecendo a infecciosidade dos parasitos (MELO, 1982).

Para infectar os camundongos BALB/c utilizamos as duas amostras estudadas na fase estacionária de crescimento. Segundo Doran & Herman (1981) e Sacks et al. (1985) a maior infecciosidade das promastigotas ocorre na fase estacionária de crescimento "in vitro", quando trabalharam com diferentes espécies de *Leishmania*.

Segundo SACKS & PERKINS (1984), na fase estacionária de crescimento, estão as promastigotas metacíclicas, que nos meios de cultivo, resultam da diferenciação de formas promastigotas não infectantes da fase log, devido sobretudo à escassez de nutrientes encontrada no meio de cultura durante a fase estacionária.

Nossos resultados confirmaram a diferença no comportamento da cepa BH49, depois de ter sido cultivada em meio quimicamente definido, com relação à infecção de BALB/c. Ambas as cepas foram novamente testadas quanto à infecciosidade para hamster (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c, sendo que a cepa BH121 não foi capaz de infectar esses animais. Já a cepa BH49 infectou 100% dos hamsters e 80% dos camundongos BALB/c inoculados, causando lesões no ponto de inoculação, que se iniciaram na sexta semana após a infecção, sem a presença de metástase ou visceralização durante o período do experimento. A infecção por *L. major* em camundongos BALB/c, geneticamente susceptíveis a infecção, tem sido mostrada, e é dependente de vários fatores que influenciam o desenvolvimento da resposta celular efetiva com diferenciação de linfócitos T para o tipo Th1 (MAHMOUDZADEH-NIKNAM et al. 2007).

Estudos já revelaram que o ciclo de vida de *Leishmania* sp. inclui estágios não infectantes e infectantes durante o desenvolvimento das promastigotas (GIANNINI, 1981; WOZENCRAFT & BLACKWELL, 1987), tanto nos hospedeiros invertebrados, como em culturas axênicas (SACKS & PERKINS, 1985), e que a metaciclogênese de *Leishmania* sp., pode ser considerada o principal fator para determinar a infecciosidade desses parasitos (SILVA & SACKS, 1987).

Silva & Sacks (1987) mostraram que o grau de metaciclogênese durante o crescimento, entre diferentes cepas e clones de *L. major*, pode variar drasticamente e que estas diferenças podem influenciar as propriedades de virulência das cepas. Estes autores enfatizaram a dificuldade em se obter conclusões sobre virulência de diferentes cepas de *Leishmania*, baseando apenas na utilização de promastigotas obtidas de cultura.

Nós investigamos a presença de amastigotas nos animais infectados, porém não quantificamos a infecção, visto que o objetivo do estudo nesse aspecto era confirmar o comportamento das duas cepas com relação a sua infecciosidade para animais de laboratório.

Como as duas cepas apresentaram perfil de infecciosidade diferente para camundongos BALB/c, que são altamente susceptíveis à *L. major* (MAHMOUDZADEH-NIKNAM et al. 2007) e dada a semelhança da *L. major*-like com esta espécie, decidimos utilizar uma metodologia que demonstrasse a expressão diferencial de genes, que pudessem estar envolvidos na infecciosidade. Para isto, foi utilizada a técnica de SSH.

6.2.1 Supressão por Hibridização Subtrativa

A Supressão por hibridização subtrativa está sendo amplamente utilizada como ferramenta para identificação de genes diferencialmente expressos. A validade desta técnica e os resultados por ela apresentados reforçam o fato de que a hibridização subtrativa é efetiva em evidenciar e identificar genes implicados com a infecciosidade. Janke e colaboradores (2001), encontraram 22 genes específicos para a cepa patogênica 536 de *Escherichia coli*, quando comparada com a cepa não patogênica K12-MG1655, e também, Akopyants et al (1998), estudaram genes diferencialmente expressos em cepas patogênicas de *Helicobacter pylori*.

Nosso estudo baseado na técnica de SSH foi eficiente em evidenciar nossa abordagem prévia, onde observamos infecciosidade diferente para as cepas BH49 e BH121 para animais de laboratório como modelos experimentais. A técnica mostrou genes diferencialmente expressos que nos permitiram distinguir as duas cepas,

embora não tivéssemos a oportunidade de aprofundar este estudo de modo a permitir a identificação do papel dessas proteínas diferencialmente expressas na infecciosidade. A caracterização funcional de tais genes pode contribuir para o entendimento de mecanismos de infecciosidade utilizados pelo parasito, além de permitir a descoberta de alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas e vacinas contra a leishmaniose.

Neste estudo, utilizamos promastigotas provenientes de cultura das amostras que se encontravam criopreservadas em nosso criobanco. Vale lembrar que as duas amostras estudadas foram obtidas a partir de lesões de casos de leishmaniose cutânea humana, cultivadas em meio de NNN/LIT e posteriormente criopreservadas. Quando estudadas com relação ao comportamento em hamster, observamos que, ao contrário da cepa BH49, a cepa BH121 não era capaz de infectar esses animais. Observação semelhante foi encontrada com ambas as cepas com relação à infecção em camundongos BALB/c que são potencialmente muito susceptíveis à infecção por *L. major*.

A utilização de formas promastigotas neste estudo propiciou o isolamento de material celular com maior pureza. Pelo fato de as células serem cultivadas em meios líquidos acelulares, não ocorre a contaminação com compostos celulares do hospedeiro, o que poderia dificultar a identificação de genes específicos do parasito. Estudos envolvendo a utilização de amastigotas, obtidas diretamente de lesões de animais, mostraram, durante a identificação de genes específicos de *Leishmania* sp., presença de contaminação com genes do hospedeiro conforme citado por Leifso et al. (2007) e Ouakad et al. (2007).

Através da técnica de SSH foi possível a identificação de um total de nove fragmentos de cDNAs, os quais apresentaram alta homologia com genes já

previamente seqüenciados do genoma de *L. major* (IVENS et al., 2005). Dentre os genes diferencialmente expressos identificados, alguns estão envolvidos com processos fisiológicos incluindo metabolismo, tradução, destinação de proteínas, produção de energia, fatores de virulência e outros de funções desconhecidas.

Dos fragmentos de cDNAs obtidos, cinco foram confirmados pela técnica de RT-PCR como diferencialmente expressos entre as duas cepas estudadas. Quatro destes cDNAs foram específicos da cepa BH49, sendo um homólogo à alfa-hemolisina, outro homólogo a um fragmento de cDNA flanqueado pelo gene da galactosiltransferase-3, beta-fosfoglicano-1,3 e o gene da histona H4 e outros dois fragmentos atribuídos a proteínas hipotéticas com funções desconhecidas. O outro fragmento considerado diferencialmente expresso foi encontrado na cepa BH121 e correspondeu a uma proteína hipotética de *Leishmania* que contém o domínio Pfam PF 02990 denominado de proteína de endomembrana 70 (EMP70).

O fragmento de cDNA que apresentou semelhanças com o gene da alfa-hemolisina apresentou maiores níveis de expressão na cepa BH49 quando comparado com a cepa BH121. A alfa-hemolisina caracteriza-se como uma proteína tóxica que apresenta como alvo membranas de células eucariotas, causando aumento da permeabilidade celular. Janke et al. (2001) utilizando a técnica de SSH para comparar a expressão diferencial entre cepas patogênicas e não-patogênicas de *E. coli*, identificaram duas alfa-hemolisinas (Hly) como forte fator de virulência da cepa patogênica.

Em *Leishmania*, as hemolisinas também têm sido caracterizadas (CHAKRAVARTY et al. 1994). Noronha et al., (1996) descreveram uma proteína formadora de poro, com atividade hemolítica, presente em *L. major* e *L. amazonensis*, que induz um aumento da permeabilidade da membrana celular de

células nucleadas, incluindo macrófagos, levando à perda de proteínas citoplasmáticas. Uma outra possibilidade do uso de hemolisinas pelas promastigotas seria como uma forma de obter nutrientes de eritrócitos durante o estágio no intestino do inseto vetor (CHAKRAVARTY et al, 1994). Contudo, a atividade hemolítica dessas proteínas é relatada especialmente pelo dano causado ao hospedeiro infectado, devido à ruptura de macrófagos, sendo dessa forma, consideradas como importante fator na patogenicidade deste parasito.

Outro fragmento de cDNA, diferencialmente expresso na cepa BH49, correspondeu a um fragmento que flanqueia no lado 5' e 3' as regiões codificadoras dos genes da galactosiltransferase-3, beta-fosfoglicano-1,3 e da histona H4, respectivamente. Este fragmento pode, portanto, ser derivado das regiões não traduzidas de um transcrito ou outro.

O gene da galactosiltransferase-3, beta-fosfoglicano-1,3 está situado no cromossomo 2 da *L. major* na região denominada "Galactosyl T", a qual codifica as galactosiltransferases. Esta família de genes inclui as galactosiltransferases, enzimas responsáveis pela transferência de galactose, durante a síntese de oligossacarídeos envolvidos com a formação dos lipofosfoglicanos (LPG). O LPG é a molécula mais abundante da superfície de membrana das promastigotas de *Leishmania* sp. e é considerado, juntamente com a glicoproteína GP63, dentre outras moléculas, os principais fatores de virulência de *Leishmania*.

Mutantes de *L. major* desprovidos de LPG tornaram-se significativamente comprometidos na habilidade em sobreviver nos macrófagos, causar infecção em camundongos e também sobreviver no inseto vetor. Entretanto, quando foram complementados com cosmídeos capazes de induzir a expressão dos genes codificadores de LPG e as enzimas envolvidas no processo, os parasitos foram

capazes de restaurar a expressão de LPG, a virulência e a capacidade de sobreviver no interior de macrófagos (BELKAIRD et al., 1998). O LPG se liga aos receptores CR3 e CR4 e às integrinas da superfície celular dos macrófagos, o que facilita a entrada e a sobrevivência da *Leishmania* na célula hospedeira (BRITTINGHAM et al., 1996; TALAMAS-ROHANA et al., 1990).

Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que as promastigotas da cepa BH121 não foram capazes de infectar macrófagos. Em mais de 10 ensaios realizados, observou-se apenas um macrófago infectado por uma amastigota dessa cepa, enquanto que as promastigotas da cepa BH49 foram capazes de infectar esta célula e manter a infecção (dados não mostrados). O fragmento de cDNA flanqueado pelo gene da galactosiltransferase-3, beta-fosfoglicano-1,3, diferencialmente expresso na cepa BH49, pode ser considerado um fator adicional para diferença no perfil de infecciosidade das duas cepas.

A histona H4 consiste em uma das quatro histonas envolvidas com a formação do *core* dos nucleossomos presentes no DNA de eucariotos, tendo um importante papel na estrutura especializada do cromossomo e no controle da atividade gênica. Embora o gene da histona H4 seja um dos genes mais altamente conservados entre os organismos, Lukes & Maslov (2000) detectaram divergências neste gene em cepas de *Leishmania* e ressaltaram que estas divergências, não esperadas, podem refletir características não usuais dessa importante proteína nos protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida. Imperfeições no estabelecimento da estrutura dos cromossomos devido às histonas podem ativar ou silenciar genes aberrantes e então ocasionar doença.

Dentre os dois fragmentos de cDNAs, obtidos da cepa BH49, com homologia com genes que codificam proteínas com funções ainda desconhecidas,

um situa-se no cromossomo 29 e codifica uma enzima requerida na biossíntese da coenzima Q. A ubiquinona ou coenzima Q é essencial no transporte de prótons e elétrons, participando da cadeia respiratória no processo de fosforilação oxidativa no interior da mitocôndria. Além disso, a coenzima Q forma ligações importantes com uma variedade de desidrogenases atuando durante reações do metabolismo (DO et al., 2001).

O outro fragmento situa-se no cromossomo 35 e corresponde a uma proteína hipotética conservada, mas com função totalmente desconhecida. Com o sequenciamento do genoma de *L. major* em 2005, Ivens e colaboradores demonstraram que dentre os genes codificadores de proteínas do genoma deste parasito, 36% correspondiam a proteínas hipotéticas, com funções não caracterizadas (IVENS et al., 2005). A maioria dos estudos que envolvem a caracterização de genes diferencialmente expressos em *Leishmania* sp. relata a identificação de proteínas hipotéticas (LEIFSO et al., 2007; OUKAD et al., 2007).

Alguns genes com funções desconhecidas podem codificar novas classes de proteínas que determinam a patogenicidade dos parasitos ou ainda contribuem para o grau de severidade da infecção que podem causar, talvez por estarem relacionados ao processo de interação *Leishmania*-macrófago ou na sobrevivência do parasito no interior da célula hospedeira e na virulência do parasito, já que foram encontrados na cepa infectante.

O fragmento de cDNA representado pelo clone 121.6 apresentou-se em maior intensidade na cepa não infectante. A proteína homóloga hipotética pertence ao segmento de proteína da super família das proteínas transmembrana, as quais podem funcionar como canais ou como moléculas transportadoras.

A caracterização funcional dos genes diferencialmente expressos pode contribuir para o entendimento ao nível molecular da patogênese de *Leishmania*. Nossos resultados confirmam estudos anteriores, em que a técnica de SSH foi citada como uma boa ferramenta para identificação rápida de genes diferencialmente expressos entre cepas de uma mesma espécie. Nesta identificação, encontramos tanto genes conhecidos, como outros de função desconhecida, que podem estar relacionados com a infecciosidade dos parasitos, expandindo assim a compreensão sobre a patogênese das leishmanioses. Neste contexto, outros mecanismos também podem ser utilizados pelas *Leishmania*, tanto na interiorização do parasito pelo macrófago, quanto na sobrevivência no seu interior, ou ainda na manutenção da infecção nos hospedeiros mamíferos, havendo necessidade de outros estudos que possam confirmar a importância destas proteínas na patogênese de *Leishmania*. Entretanto, vale ressaltar que a expressão protéica, em *Leishmania*, parece ser regulada por níveis do processo de tradução, estabilidade da proteína ou por mecanismos pós-traducionais, de modo que modificações adicionais nas proteínas podem ser mais importantes no desenvolvimento do parasito do que a regulação da expressão gênica ao nível do RNAm (McNICOLL et al., 2006). De fato, alguns estudos já demonstraram a existência de uma fraca correlação entre a abundância dos transcritos e os níveis da proteína expressa (GYGI et al., 1999; COHEN-FREUE et al., 2007). Sendo assim, a análise proteômica, a nível tanto estrutural quanto funcional, também pode ser de grande relevância para a determinação do papel chave de moléculas envolvidas com a virulência e patogenicidade do parasito.

conclusão

7 Conclusões

➤ Pela associação dos parâmetros avaliados utilizando métodos de biologia celular e molecular, as amostras que estudamos, isoladas no Brasil, são muito semelhantes à *L. major*, espécie característica do Velho Mundo. Por isso, as amostras foram designadas como *L. major-like*,

➤ A eletroforese de enzimas foi eficiente para evidenciar a similaridade entre as amostras de *L. major-like* e as de *L. major*.

➤ As duas técnicas baseadas em PCR (RAPD-PCR e SSR-PCR) também mostraram que as amostras de *L. major-like* são muito semelhantes às de *L. major*. Embora fosse observado pequeno grau de polimorfismo, não ocorreu a formação de grupos distintos para essas amostras.

➤ Amostras de *L. major-like* estão distribuídas pelo Novo Mundo (Venezuela, Equador, Brasil, Peru e Paraguai) e portanto, a existência da *L. major-like* como agente causador da leishmaniose cutânea deve ser considerada em estudos de identificação de *Leishmania* sp. isoladas no Novo Mundo, assim também como em estudos de investigação epidemiológica da LTA,

➤ Os 9 fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos pela técnica de supressão por hibridização subtrativa, possivelmente estão envolvidos com diversos processos fisiológicos incluindo metabolismo, tradução, destinação de proteínas, produção de energia, fatores de virulência e funções desconhecidas.

➤ A RT-PCR confirmou a diferença de expressão de 4 cDNAs na cepa infectante (BH49) sugerindo a possibilidade do envolvimento destas na patogênese de *Leishmania* para animais experimentais, e um cDNA na cepa não infectante

(BH121) relacionada à família de proteínas transmembrana, envolvida possivelmente com o transporte de moléculas,

➤ Nossos resultados confirmam que a técnica de SSH é uma boa ferramenta para identificação de genes diferencialmente expressos entre cepas de uma mesma espécie de *Leishmania*, possibilitando a identificação de genes relacionados com a infecciosidade do parasito, expandindo assim a compreensão sobre a patogênese das leishmanioses.

8 Perspectivas futuras

Diante das limitações de tempo, técnicas e operacionais, alguns aspectos não puderam ser estudados com maior profundidade, como por exemplo, o fato de que nem todos os clones obtidos a partir da técnica de SSH, foram sequenciados.

No entanto, foram abertas perspectivas do estudo ser continuado num futuro próximo a partir dos resultados obtidos no presente trabalho. Vale ressaltá-los:

- Sequenciar e analisar o restante dos clones obtidos com a técnica de SSH;
- Quantificar o nível de expressão dos genes diferencialmente expressos, obtidos nas cepas BH49 e BH121; utilizando a técnica de *Real-Time-PCR*;
- Caracterizar, funcionalmente, as proteínas diferencialmente expressas obtidas pela técnica de SSH;
- Estudar os clones celulares de *L. major-like*, já obtidos em nosso laboratório;
- Investigar a cepa BH70, com relação à expressão diferencial de genes, já que esta cepa demonstrou um comportamento diferenciado para os animais de laboratório;
- Realizar um estudo completo comparando cepas de *L. major-like* isoladas em outros países da América do Sul, a partir de uma colaboração entre todos os pesquisadores que isolaram amostras de *L. major-like* neste continente.

9 Referências Bibliográficas

AI-JAWABREH, A.; SCHNUR, L. F.; NASEREDDIN, A.; SCHWENKENBECHER, J. M.; ABDEEN, Z.; BARGHUTL, F.; KHANFAR, H.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jerico (A'riha) and its environs, a classical focus os *L. major*. *Trop. Med. Int. Health*, v. 9(7), p. 812-816, 2004.

AKOPYANTS, N. S.; FRADKOV, A.; DIATCHENKO, L.; HILL, J. E.; SIEBERT, P. D.; LUKYANOV, S. A.; SVERDLOV, E. D.; BERG, D. E. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 13108-13113, 1998.

AKOPYANTS, N. S.; MATLIB, R. S.; BUKANOVA, E. N.; SMEDS, M. R.; BROWNSTEIN, B. H.; STORMO, G. D.; BEVERLEY, S. M. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 136, p. 71-86, 2004.

ALJEBOORI, T. J.; EVANS, D. A. *Leishmania* sp. In Iraq; electrophoresis isoenzyme patterns: II. Cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 74, p. 178-184, 1980.

ALMEIDA, R.; GILMARTIN, B. J.; McCANN, S. H.; NORRISH, A.; IVENS, A. C.; LAWSON, D.; LEVICK, M. P.; SMITH, D. F.; et al. Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Mol Biochem parasitol*, v. 136, p. 87-100, 2004.

AL-TAQI, M.; EVANS, D. A. Characterization of *Leishmania* sp. From Kuwait by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 72, p. 56-65, 1978.

AMATO, V. S. Treatment of American Tegumentary Leishmaniasis. *Boletim Epidemiológico Paulista*, n. 26, fev., ano 3, 2006.

ANDERS, G. EISENBERGER, C. L., JONAS, F. GREENBLATT, C. L. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, v. 96 (1), 2002.

ANDREWS, R. H.; CHILTON, N. B. Multilocus enzyme electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. *Int J Parasitol*. v. 29(2), p.213-53, 1999.

ANTUNES, C. M.; MAYRINK, W.; MAGALHAES, P. A.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S.; WILLIMAS, P.; LIMA, A. O.; VIEIRA, J. B.; et al. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous Leishmaniasis. *Int J Epidemiol.*, v. 15 (4), p. 572-580, 1986.

ASHFORD, P. R. W., DESJEUX, P., RAAFT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol. Today*, v. 8 (3), p. 104-105, 1992.

ASHFORD, R. W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

ATALAY, A.; CROOK, T.; OZTURK, M.; YULUG, I. G. Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochem. Biophys Res. Commun*, v. 20: 299 (5), p. 839-846, 2002.

AULT, S. K. Pan American health organization's regional strategies framework for addressing neglected disease in neglected populations in Latin America and the Caribbean. *Mem Inst O Cruz*, v. 102 (5), p. 2007.

AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F. P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J. Parasitol.*, v. 85 (2), p. 181-187, 1999.

BACKELJAU, T.; DE BRUYN, J.; DE WOLF, H.; et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics*, v. 11, p. 119-130, 1995.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓNEZ, D. The Pharmacology of *Leishmaniasis*. *Genetics in Pharmacology*, v. 30(4), p. 435-443, 1998.

BAÑULS, A. J., HIDE, M. & TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary species of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol.* v. 29, p. 1137-1147, 1999.

BARBOSA-DE-DEUS, R., DOS MARES-GUIA, M. L.; NUNES, A. Z.; COSTA, K. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C. A. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral *Leishmaniasis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 9(6), p.1361-1366, 2002.

BARRAL, A.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; CARVALHO, E. M. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* v. 35(4), p.732-4, 1986.

BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGÉS, M. *Leishmaniasis: Sex, Lies and Karyotype.* *Parasitol. Today*, v. 8, p. 174-176, 1992.

BATES, P. A. Complete development cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*, v. 108, p. 1-9, 1994.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*, v. 4, p. 601-609, 2004.

BECKMAN, J. S.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. *Genom.* v. 12 (4), p. 627-311, 1992.

BELKAIRD, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania* infected cells. *Eur J Immunol*, v. 28, p. 1369-1400, 1998.

BELLATIN, J. A.; MURRAY, A. S.; ZHAO, M.; McMASTER, W. R. *Leishmania mexicana*: identification of genes that are preferentially expressed in amastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 100, p. 44-53, 2002.

BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous *Leishmaniasis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58(1), p. 102-109, 1998.

BIAGI, F. F. Algunos comentarios sobre las leishmaniasis y sus agents etiologicos. *Leishmania tropica Mexicana*, nueva subespecie. *Medicina (Mexico)*, v. 33, p. 401-406.

BICHICHI, M.; RIYAND, M.; GUESSOUS-IDRISSI, N. Isoenzyme characterization of *Leishmania tropica* in the emerging epide focus of Taza (north Morocco). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 93(1), p. 21-22, 1999.

BONFANTE-GARRIDO, R. New subspecies of *Leishmania* isolated in Venezuela. *X Intern Cong Trop Med Malar.* Manila, Philippines, 1980.

BOSANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous *Leishmaniasis*: history, epidemiology and prospects for control. *Brazilian Journal of Epidemiology*. v.7 (3), 2004.

BRAZIL, R. P. Electrophoretic variation of the enzyme phosphoglucomutase in different strains of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 72, p. 289-291, 1978.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today*, v. 12, p. 444-447, 1996.

CAETANO-ANOLLES, G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl.*, 3(2):85-94, 1993.

CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R. X.; HASHIGUCHI, Y. Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge – A review. *Mem Inst Osw Cruz*, v. 99 (7), p. 663-672, 2004.

CAMPBELL, K.; POPOV, V.; SOONG, L. Identification and molecular characterization of a gene encoding a prote *Leishmania amazonensis* Trp-Asp (WD) protein. *Infect Immun.*, v. 72 (4), p. 2194-2202, 2004.

CHAKRAVARTY, M. C. SHARMA, A. K.; GUPTA, N. PRAKASH, N.; SARAN, R. *Leishmania donovani*: hemolytic activity of promastigotes. *Exp Parasitol*, v. 78, p. 253-258, 1994.

CHANCE, M. L.; SCHNUR, L. F.; THOMAS, S. C. & PETERS, W. The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Aethiopian zoographical region of Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 72, p. 533-542, 1978.

CHANG, K. P.; DUNNE, F.; BRAY, R. S. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. In: *Leishmaniasis* CHANG/BRAY (Ed.) Elsevier Science Publishers BV (Biochemical Division), 490p, 1985.

CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACK-WELL, J. M. A study of the differential respiratory burst amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunol*, v. 53, p. 345-355, 1984.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. Toward na understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longiplapis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96 (26), p. 15155-15160, 1999.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, v. 27, p. 43-52, 1988.

COHEN-FREUE, G.; HOLZER, T. R.; FORNEY, J. D.; McMASTER, W. R. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol*, v. 37, p. 1977-1086, 2007.

CORTAZAR, T. M.; WALKER, J. Genetic manipulation and the study of the protozoan parasite *Leishmania*. *Biomedica*, v. 24 (4), p. 438-455, 2004.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in *Leishmania*. *Tropical Medicine and International Health*, v. 6(11), p. 899-905, 2001.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. JR.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 50, p. 296-311, 1994.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H. I.; GRIMALDI, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrepnum*. *Parasitology Today*, v. 16, p. 142-144, 2000.

DEANE, L. M. ; GRIMALDI, G, Jr. Leishmaniasis in Brazil. CHANG, K. P. ; BRAY, R. S. ; eds. Human Parasitic Diseases. V1Amsterdam : Elsevier, p. 250-252, 1985.

DEDET, J-P. & PRATLONG, F. Taxonomie des *Leishmania* et distribution géographique des leishmanioses. *Ann. Dermatol. Venereol.*, v. 127, p. 421-424, 2000.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 463-469, 1994.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect*, v. Jul;4(9), p. 975-81, 2002.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93 (12), p. 6025-6030, 1996.

DIATCHENKO, L.; LUKYANOV, S.; LAU, Y. F.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, v.303, p.349-80, 1999.

DIRIENZO, J. M.; CORNELL, S.; BOEHRINGER, H. Use of randomly cloned DNA fragments for the identification of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol*. v. 6, p. 88-96, 1991.

DO, T. Q.; HSU, A. Y.; JONASSEN, T.; LEE, P. T.; CLARKE, C. F. A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276 (21), p. 18161-18168, 2001.

DONDJI, B.; DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DUHLINSKA, D. D.; SAME-EKOBO, A.; DEDET, J. P. Characterization of *Leishmania major* causing cutaneous leishmaniasis in northern Cameroon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 92 (6), p. 677-678, 1998.

DORAN, T.; HERMAN, R. Characterization of populations of promastigotes of *Leishmania donovani*. *J Protozool*. v. 28, p. 345-350, 1981.

DUARTE, M. I. S.; LAURENTI, M. D.; ANDRADE Jr, H. F.; CORBETT, C. E. P. Comparative study of the biological behaviour in hamster of two isolates of *Leishmania* characterized respectively as *L. major*-like and *L. donovani*, *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 30 (1), p. 21-27, 1988.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmanioses: towards integrated monitoring. *Trend Parasitol*, v. 22, p. 4-6, 2006.

ERESH, S.; McCALLUM, S. M.; BARKER, D. C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*, v. 109, p. 423-433, 1994.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, M.; CORNUET, J. M. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bambus terresTris*. *Nucleic Acids Res.*, v. 21, p. 1427-1431, 1993.

EVANS, D. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. UNDP/World Bank/WHO Geneva, Switzerland, 1989.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A.; FERREIRA, A.; VIEIRA, V. P.; SANTOS, C. B.; VAREJAO, J. B.; CUPOLILLO, E.; CARVALHO-PAES, L. E.; GRIMALDI, Jr. G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis* in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98 (8), p.1003-1010, 2003.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution*. v. 39, p. 783-791, 1985.

FERNANDES, O.; CATANHO, M. P.; SEGURA, I.; LABRADA, L. A.; DERRÉ, R.; SARAIVA, N.; DEGRAVE, W. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. *J. Parasitol.*, v. 85 (3), p. 563-568, 1999.

FERNANDES, O.; MURTHY, V. K.; KURATH, U.; DEGRAVE, W.; AMPBELL, D. A. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 66, p. 261-277, 1994.

FLOCH, H. *Leishmania tropica guyanensis* n. ssp., cause of cutaneous *Leishmaniasis* in the Guinanas and Central America. *Publ Inst Pasteur Guyane Frlnini*. v. 15 (328), p. 1-4, 1954.

FOX, S. A.; LOH, S.; THEAN, A. L.; GRLEPP, M. J. Identification of differentially expressed genes in murine mesothelioma on lines of differing tumorigenicity using suppression subtractive hybridization. *Biochim. Biophys Acta*, v. 5(3), p. 237-244, 2004.

FRANKE, E. D.; MCGREEVY, P. B.; KATZ, S. P.; SACKS, D. L. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *J Immunol*, v.134, p. 2713-2718, 1985.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Apresenta dados sobre a leishmaniose no Brasil. Disponível em:<www.funasa.gov.br>. Acesso 07 jan. 2003.

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

GERARD, G.F.; FOX, D.K.; NATHAN, M.; D'ALESSIO, J.M. Reverse transcriptase. The use of cloned moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA, *Mol Biotechnol.*, v.8, n.1, p.61-77, 1997.

GIANNINI, M. S. Effects of promastigotes growth phase, frequency of subculture and host age on promastigotes-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *J Protozool*, v. 21, p. 521-525, 1974.

GIANNINI, M. S.; D'ALESSANDRO, P. A.; GARCIA, C. R.; SARAIVA, E. M. Failure of hamster macrophages to discriminate between infective and noninfective promastigotes of *Leishmania donovani* during attachment in vitro. *Infect Immunol*, v. 34(2), p. 629-632, 1981.

GODFREY, D. G. & KILGOUR, V. Enzyme eletrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, v. 70 (3), p. 219-224, 1976.

GOMES R. F., MACEDO A. M., PENA, S. D., MELO, M. N. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol.*, v. 80(4), p.681-7, 1995.

GOMES, M.A., SILVA, E.F., MACEDO, A. M., VAGO, A.R., MELO, M.N. LSS-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. *Parasitol.*, v.144, p. 517-520, 1997.

GOMES, M.L., MACEDO, A.M., PENA, S.D., CHIARI, E. Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Trop.* 69(2):99-109, 1998.

GONTIJO C.M., PACHECO, R.S., OREFICE, F., LASMAR, E., SILVA, E.S., MELO, M.N. Concurrent cutaneous, visceral and ocular Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(5), p.751-3, 2002.

GONTIJO, C.M.F. 2000. Leishmaniose Tegumentar em Minas Gerais: Estudos moleculares de amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos. UFMG. 140 p. (Tese, Doutorado, Departamento de Parasitologia, ICB - UFMG).

GONZALEZ, A. C.; THOMAS, M. C.; MARTINEZ-CARRETERO, E.; CARMELO, E.; LOPEZ, M. C.; VALLADARES, B. Molecular and immunological characterization of L14 ribosomal protein from *Leishmania braziliensis*. *Parasitology*, v. 128 (Pt 2), p. 139-147, 2004.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*, v. 33, p. 1027-1034, 2003.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, v. 34, p. 257-272, 1990.

GRIMALDI JR, G., McMAHON-PRATT, D. Leishmaniasis and its etiological agents in the New World: An overview. In: Tsieh Sun (ed). *Progress in clinical Parasitology*, v. 2, p.73-118, 1991.

GRIMALDI, Jr. G. & McMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of new World *Leishmania* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 37-42, 1996.

GRIMALDI, Jr. G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the New World. *Am J Trop Hyg*, v. 41 (6), p. 687-725, 1989.

GRIMALDI, Jr. G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; McMAHONS-PRATT, D.; BARRET, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, with mammals and sandflies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v. 44, p. 645-661, 1991.

GUERRA, J. A.; RIBEIRO, J. A.; COELHO, L. IL.; BARBOSA, M. G.; PAES, M. G. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad Saúde Publica*, v. 22 (11), p. 2319-2327, 2006.

GUIZANI, I.; VAN EYS, G. J. J. M.. ISMAIL, R. B.; DELLAGI, K. Use of recombinant DNA probes for species identification of Old World *Leishmania* isolates. *Am. J. Trop. Med. Hig.*, v. 50, p. 632-640, 1994.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

HAMADA, H., PETRINO, M.G. & KAKUMAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 79:6465-6469, 1982.

HANAHAN, D.; JESSEE, J.; BLOON, F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*, v. 204, p. 63-113, 1991.

HANDMAN, E.; JARVIS, H. M.; MITCHELL, G. F. *Leishmania major*: identification of stage-specific antigens and antigens shared by promastigotes and amastigotes. *Parasite Immunol*, v. 6 (3), p. 223-233, 1984

HAO, Z.; KASUMBA, I.; LEHANE, M. J.; GIBSON, W. C.; KWON, J.; AKSOY, S. Tsetse immune responses and trypanosome transmission: Implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 98, p. 12648-12653, 2001.

HASHIGUCHI, Y.; GOMEZ, E. A.; CORONEL, V. V.; MIMORI, T.; KAWABATA, M. FURUYA, M. NONAKA, S.; TAKAOKA, H.; ALEXANDER, B.; QUIZHPE, A. M. et al. Andean Leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major*-like parasites. *Am J Trop Med Hyg*, v. 44 (2), p. 205-217, 1991.

HERWALDT, B. L. *Leishmaniasis*. *The Lancet*, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
HILLIS, D. M.; HUELSENBECK, J. P. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analysis. *J. Hered.*, v. 83, p. 189-195, 1992.

HOLTZ, Jr., G. G.; BEACH, D. H. Categorization of Old World *Leishmaniasis* by cyclopropane fatty acid content of cultured promastigotes. In: Chance, M. L. & Walton, B. C. (eds.). *Biochemical Characterization of Leishmania*. UNDP/WORLD BANK/WHO, p. 197-204, 1982.

HOLZER, T. R.; McMASTER, W. R.; FORNEY, J. D. Expression profiling by whole-genome inter-species microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 146, p. 198-218, 2006.

HU, N.; MESSING, J. The making of strand-specific M13 probes. *Gene*, v.17, p. 271-277, 1982.

HUFTON, S. E.; MOERKERK, P. T.; BRANDWIJK, R.; DE BRUINE, A. P.; ARENDS, J. W.; HOOGENBOOM, H. R. A profile of differentially expressed genes in primary colorectal cancer using suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett.*, v. 463 (1-2), p. 77-82, 1999.

IVENS, A. C.; BLACKWELL, J. M. The *Leishmania* genome comes of age. *Parasitol. Today*, v. 15 (6), p. 225-231, 1999.

IVENS, A. C.; PEACHOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; et al. The genome of the Kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, v.309, july, 2005.

JACOBSON, D. P.; SLUTLKY, G. M.; GREENBLAT, C. L.; SCHNUR, L. F. Surface reaction of *Leishmania* I. Lectin-mediated agglutination. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 76, p.45-52, 1982.

JAFFE, C. L.; McMAHONTRATT, D. The identification of membrane glycoconjugates in *Leishmania* species. *J Parasitol*, v. 74, p. 548-561, 1988.

JANKE, B.; DOBRINDT, U.; HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G. A subtractive hybridisation analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* k-12 strain MG1655. *FEMS Microbiology letters*, v. 199, p. 61-66, 2001.

JOSHI, M. B.; ROGERS, M. E.; SHAKARIAN, A. M.; YAMAGE, M.; AL-HARTHI, S. A.; BATES, P. A.; DWYER, D. M. Molecular characterization, expression, and in vivo analysis of LmexCht1: the chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*. *J Biol Chem*, v. 280(5), p. 3847-61, 2005.

KAHL, L. P.; BYRAM, J. E.; DAVID, J. R.; COMERFORD, S. A.; VON LICHTENBERG, F. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; comparative pathology of golden hamster infected with isolated from cutaneous and mucosal lesions of patient residing in Três Braços, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v.44, n. 2, p. 218-232, 1991.

KATAKURA, K.; MATSUMOTO, Y.; GOMEZ, A.;L. E.; FURUYA, M.; HASHIGUCHI, Y. Molecular Karyotype characterization of *Leishmania panamensis*, *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*-like parasites: agents of cutaneous *Leishmaniasis* in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 48 (5), p. 707-715, 1993.

KILLICK-KENDRICK, R. Biology of *Leishmania* in plebotomid sandflies. In: *Biology of the Kinetoplastida*. London, v.2, p. 396-460, 1979.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 65 (1), p. 37-42, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 66 (1), p. 71-74, 1991.

KNIO, K. N.; BAYDOUN, E.; TAWK, R.; NUWAYRI-SALTI, N. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Lebanon and Syria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 63 (1-2), p. 43-47, 2000.

KREUTZER, M; LEMESRE, J. L.; DARCY, F.; KUSNIERZ, J. P.; CAPRON, A. SANTORO, F. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000 dalton surface antigen. *J Innumol*, v.138, p. 299-305, 1987.

KREUTZER, R. D.; CORREDOR, A.; GRIMALDI, G. JR.; GROGL, M.; ROWTON, E. D.; YOUNG, D.G.; MORALES, A.; MCMAHON-PRATT, D.; GUZMAN, H.; TESH, R. B. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 44 (6), p.662-675, 1991.

KUANG, W. W.; THOMPSON, D. A.; HOCH, R. V.; WEIGEL, R. J. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acid Res.*, v. 26 (4), p. 1116-1123, 1998.

KWEIDER, M.; LEMESRE, J. L.; DARCY, F.; KUSNIERZ, J. P.; CAPRON, A.; SANTORO, F. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65.000 dalton surface antigen. *J. Immunol.*, v. 138, p. 299-305, 1987.

LAINSON R.; BRAGA, R. R.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A.; SILVEIRA, F. T. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 64(3), p. 200-7, 1989.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American *Leishmaniasis*. In: *Biology of the Kinetoplastida*. London: *Acad Press*. v. 2, p. 1-116, 1979.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. New York: Academic Press, v. 1, cap. 1, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis, incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (MANGABEIRA, 1941) as the vector in the lower Amazonian basin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 62, p. 385-395, 1968.

LAINSON, R. & SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso state, and observation on two distinct strains of leishmania isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 64, p. 654-667, 1970.

LAINSON, R. The American Leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.77 (5), p. 569-596, 1983.

LAINSON, R., MILES, M. A., SHAW, J. J. On the identification of viscerotropic leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. v. 75, p. 251-253, 1981.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). *Annale Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 63 (2), p. 134-145, 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Y. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* LAINSON. R.; SHAW, J. J. *Ann Parasitol Hum Comp*, v65, p. 282-284, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R.; RYAN, L.; PÓVOA, M. M.; ISHIKAWA, E. A. Y. A Leishmania e as leishmanioses. In: Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, v.1, p. 259, 1986.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Brit. Med. Bull.*, v. 28 (1), p. 44-48, 1972.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol*. v. 42, p. 525-550, 1997.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N.; MURRAY, A.; McMASTER, R. Genomic and proteomic expression analysis os *Leishmania* promastogote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol*, v. 152, p. 35-46, 2007.

LUKES, J.; MASLOV, D. A. Unexpectedly high variability of the histone H4 gene in *Leishmania*. *Parasitol Res*, v. 86 (3), p. 259-261, 2000.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; KIAEI, S. S.; IRAVANI, D. *Leishmania tropica* infection, in comparison to *Leishmania major*, induces lower delayed type hypersensitivity in BALB/c mice. *Korean J Parasitol*, v. 45(2), p.103-9, 2007.

MALLINSON, D. J.; COOMBS, G. H. Molecular characterization of the metacyclic forms os *Leishmania*. *IRCS Medica Science*, v.14, p. 557-558, 1986.

MARCO, J. D.; BHUTTO, A. M.; SOOMRO, F. R.; BALOCH, J. H.; BARROSO, P. A.; KATO, H.; UEZATO, H.; KATAKURA, K.; KORENAGA, M.; NONAKA, S.; HASHIGUCHI, Y. Multlocus enzyme electrophoresis and cytochrome B gene sequencing-based identification of *Leishmania* isolates from different foci of cutaneous leishmaniasis in Pakistan. *Am J Trop Med Hyg*, v. 75 (2), p. 261-266, 2006.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWISER, I.; JAFFE, C. L.; BECK, H. P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical sample PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism anlysis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41 (7), p.3147-3153, 2003.

MARTINEZ, E.; THOMAS, M. C.; ALONSO, V.; CARMELO, E.; GONZALEZ, A. C.; DEL CASTILLO, A.; VALLADARES, B. Cloning and molecular characterization of the cDNA encoding histone from *Leishmania braziliensis*. *J. Parasitol.*, v. 88 (1), p. 199-203, 2002.

MARTINS, A. V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. American sanflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 195 p., 1978.

MARZOCHI, M. C. A & MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral *Leishmaniasis* in Brazil – Emerging anthroozoonosis and possibilites for their control. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 10 (supl. 2), p. 359-375, 1994.

MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol*, v. 190, p. 37-42, 2001.

MAYRINK, W.; DA COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; MELO, M. N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA, A.; MICHALICK, M. S.; WILLIAMS, P. A field trial of a vaccine against American dermal *Leishmaniasis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 4, p. 385-387, 1979.

McNICOLL, F.; DRUMMELSMITH, J.; MULLER, M.; et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v. 6, p. 3567-3581, 2006.

McNICOLL, F.; DRUMMELSMITH, J.; MULLER, M.; et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v. 6, p. 3567-3581, 2006.

MEDINA, R.; ROMERO, J. Estudio clínico y parasitológico de una nueva cepa de *Leishmania*. *Arch Venez Patol Parasitol Méd*, v. 3, p. 298-326, 1959.

MELO, M. N.; AZEVEDO, H. P.; ROITMAN, I.; MAYRINK, W. A new defined medium for cultivating *Leishmania* promastigotes. *Acta Tropica*, v. 42, p. 137-141, 1985.

MENDOZA-LEON, A.; HAVERCROFT, J. C.; BARKER, D. C. The RFLP analysis of the β -tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitol.*, v.11, 1995.

MILES, M. A.; POVOA, M. M.; SOUZA, A. M.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania*, with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 74, p. 243-352, 1980.

MILES, M.A., LAINSON, R., SHAW, J.J. POVOA, M. & SOUZA, A.A. *Leishmaniasis* in Brazil. XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *Leishmania braziliensis braziliensis* and *Leishmania braziliensis guyanensis* - aetiological agents of cutaneous *Leishmaniasis* in the Amazonian Basin Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75: 524-539, 1981.

MILES, M.A.; POVOA, M. M.; SOUZA, A. M.; LAINSON, R. & SHAW, J. J. Some methods for the enzymic characterization of Latin-America *Leishmania*, with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. v. 77, p. 283-284, 1980.

MOMEN, H. PACHECO, R. S.; CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR. G. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. *Biol. Res.*, v. 26, p. 249-255, 1993.

MOMEN, H., GRIMALDI JR., G., PACHECO, R.S., JAFFE, C.L., MCMAHON PRATT, D. & MARZOCHI, M.C.A. Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34:1076-1084, 1985.

MOMEN, H., SALLES, C.A., GRIMALDI, G. JR., SILVA, A.R., MIRANDA, M.G.R. & CIBULSKIS, R. Numerical zymotaxonomy of the New World *Leishmania*. Proc. III Simp. Venezolano de Leishmaniasis. Lara, Barquisimeto, Venezuela, p. 1-3, 1987.

MORGAN, U. M.; CONSTANTINE, C. C.; GREENE, W. K.; THOMPSON, R. C. RAPD (Random Amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 87, p. 702-705, 1993.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions; multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin. Cell. Biol.*, v. 4, p. 315 - 322, 1993.

MOTAZEDIAN, H., NOYES, H., MAINGON, R. *Leishmania* and *SauroLeishmania*: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates. *Exp. Parasitol.*, 83(1):150-4, 1996.

MOTAZEDIAN, H.; NOAMANPOOR, B.; ARDEHALI, S. Characterization of *Leishmania* parasites isolates from provinces of the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr. Health*, v. 8 (2-3), p. 338-344, 2002.

Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol.* v. 44(2), p. 495-503, 2006.

MYLER, P. J.; SISK, E.; McDONAGH, P. D.; MARTINEZ-CALVILLO, S.; SCHNAUFER, A.; SUNKIN, S. M.; YAN, S.; MADHUBALA, R.; IVENS, A.; STUART, K. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 28 (5), p. 527-531, 2000.

NEAL, R. A.; HALE, C. A. A comparative study of the susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*, v. 87, p. 7-13, 1983.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 76(10), p. 5269-5273, 1979.

NEOUMINE, N. I. *Leishmaniasis* in the Eastern Mediterranean Region. *Eastern Mediterranean Health Journal*, v. 2 (1), p. 94-101, 1996.

NICOLAS, L.; SIDJANSKI, S.; COLLE, J. H.; MILON, G. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph mode: a study with laboratory mice. *Infect Immunol*, v. 68, p.6561-6566, 2000.

NIGRO, J. M.; BAKER, S. J.; PREISINGER, A. C.; JESSUP, J. M.; HOSTETTER, R.; CLEARY, K.; BIGNER, S. H.; DAVIDSON, N.; BAYLIN, S.; DEVILLE, P. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*, v. 342, p. 705-708, 1989.

NOLAN, T. J.; HERMAN, R. Effects of long-term in vitro cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. *J Protozool*, v. 32, p. 70-75, 1985.

NORONHA, F. S. M.; RAMALHO-PINTO, J.; HORTA, M. F. Cytolytic activity in the genus *Leishmania*: Involvement of a putative pore-forming protein. *Infection and Immunity*, Oct, p. 3975-3982, 1996.

NOYES, H.; CHANCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; MAINGON, R. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp Parasitol.*, v. 85(3), p.264-73, 1997.

OCHESENREITHER, S.; KUHLS, K.; SCHAAR, M.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. OLIVEIRA, R.P., MACEDO, A.M., CHIARI, E., PENA, S.D.J. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitology Today*, v. 13, p.196-200, 1997.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). A common language for the physical mapping of the human genome. *Science*, v. 248, p.1434-1435, 1994.

OUAKAD, M.; CHENIK, M. Gene expression analysis of wild *Leishmania major* isolates: identification of genes preferentially expressed in amastigotes. *Parasitol Res*, v. 100, p. 255-264, 2007.

OUMEISH, O.Y. Cutaneous Leishmaniasis: a historical perspective. *Clin. Dermatol.*, v. 17 (3), p. 249-254, 1999.

PACHECO, R.S., LOPES, U.G., MOREL, C.M., GRIMALDI JR., G., MOMEM, H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: *Leishmania Taxonomy et Phylogenese. Applications Eco-epidemiologiques*. Rioux, J.A. ed., 57-65, IMEEE, Montpellier, 1986.

PAUL, J. Cell and tissue culture. 4 ed. Edinburg: Livingstone, 1972, 430p.

PEACOCK, C. S. SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*, v. 39 (7), p. 839-847, 2007.

PENA, S. D. J. & NUNES, A. C. DNA-POP and DNA-PATTER, two simple computer programs for population studies and paternity analysis with DNA fingerprintings. *Fingerprinting News*, v. 2, p. 7-8, 1990.

PENA, S. D.; BARRETO, G.; VAGO, A. R.; De MARCO, L.; REINACH, F. C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 91(5), p.1946-1949, 1994.

PETERS, W.; CHANCE, M. L.; CHOWDHURY, A. B., KALRA, J. L.; SRIVASTAVA, L.; SHNUR, L. F. The identity of some stocks of *Leishmania* isolated in Índia. *Ann Trop Med Parasit*, v. 75, p. 247-249, 1981.

PIMENTA, J.R. Caracterização molecular de cepas de *Leishmania* utilizadas como padrões de referência pela Organização Mundial de Saúde. Dissertação de Mestrado, UFMG. 1998.

PIMENTA, P. F.; MODI, G. B.; PEREIRA, S. T.; SHAHABUDDIN M. SACKS, D. L. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitol.* v. 115, p. 359-369, 1997.

QUIJADA, L.; SOTO, M.; REQUENA, J. M. Genomic DNA macroarrays as a tool for analysis of gene expression in *Leishmania*. *Exp Parasitol*, v. 111 (1), p. 64-70, 2005.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia Longipalpis*. *Parasitol*, v. 124, p. 495-507, 2002.

ROSSI, V., WINCKER, P., RAVEL, C., BLAINEAU, C., PAGES, M., BASTIEN, P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol Biochem Parasitol.*, v.65(2), p.271-82, 1994.

RUNCIMAN, D.; ZANN, R. A.; MURRAY, N. D. A W-chromossome linked marker for gender identification in the zebra finch. *Animal Genetics*, v. 30, p. 66-67, 1999.

SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania*. *Science*, v. 223, p. 1417-1419, 1984.

SACKS, D. L. & SILVA, R. P. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J Immunol.*, v. 139, p. 3099-3106, 1987.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol*, v. 69, p. 100-103, 1989.

SACKS, D. L.; HIENY, S.; SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol*, v. 105, p. 564-569, 1985.

SAF'JANOVA, V. M. Serological comparison if leptomonad strains isolated from sandflies with *Leishmania tropica* and leptomonads from reptiles (in Russian). *Meditinskaya Parazitologiya Moskva*. Appud: LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. New York: Academic Press, p. 686-695, 1982.

SALIBA, E. K.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; SALEH, S. A.; KHOURY, O. Y.; OUMEISH, O. Y.; BATAYNEH, O.; AI-ORAN, R. Identification of *Leishmania* strains from Jordan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 98 (7), p.677-683, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd edition, cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. Fundação de ensino e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia, Belo Horizonte, 221 p., 1998.

SANCHEZ, J. L., DINIEGA, B. M., SMALL, J. W., MILLER, R. N., ANDUJAR, J. M., WEINA, P. J., LAWYER, P. G., BALLOU, W. R., LAVELACE, J. K. Epidemiologic investigation of outbreak of cutaneous *Leishmaniasis* in a defined geographic focus of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 47(1), p. 47-54, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN, COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 74 (12), p. 5463-5467, 1977.

SANT'ANNA, M. R.; ARAUJO, J.G.; PEREIRA, M. H.; PESQUERO, J.L.; DITAIUTI, L.; LEHANE, S. M.; LEHANE, M. J. Molecular cloning and sequencing of salivary gland-specific cDNAs of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera:Reduviidae). *Insect. Mol. Biol.*, v. 11 (6), p. 585-593, 2002.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J. & EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet*, v. 90, p. 655-656, 1993.

SAXENA, A.; LAHAV, T.; HOLLAND, N.; AGGARWAL, G.; ANUPAMA, G.; HUANG, Y.; VOLPIN, H.; MYLER, P. J.; ZILBERSTEIN, D. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem parasitol*, v. 152, p. 53-65, 2007.

SAXENA, A.; WORTHEY, E. A.; YAN, S.; LELAND, A.; STUART, K. D.; MYLER, P. J. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friendlin procyclics and metacycles using DNA microarray analysis. *Mol Biochem parasitol*, v. 129, p.103-114, 2003.

SCHALLING, H. D.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnostic and control of Leishmaniasis and parasite identification. *Trop. Med. Int. Health*, v. 7 (8), p. 641-651, 2002.

SCHNUR, L. F.; CHANCE, M. L.; EBERT, F.; THOMAS, S. C.; PETERS, W. The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasit*, v. 75, p. 131-144, 1981.

SCHNUR, L. F.; NASEREDDIN, A.; EISENBERGER, C. L.; JAFFE, C. J.; EL FARI, M.; AZMI, K.; ANDERS, G. K.; KENDRICK, M.; LILLICK-KENDRICK, R.; DEDET, J. P.; TRATLONG, F.; KANAAN, M.; GROSSMAN, T.; JACOL, R. L.; SCHONIAN, G.; WARBURG, A. Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from Judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 70 (4), p. 364-372, 2004.

SCHNUR, L.F., CHANCE, M.L., EBERT, F., THOMAS, S.C. & PETERS, W. The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.75, p.131-144.,1982.

SCORZA, J. V.; MEDINA, R.; PEREZ, H.; HERMANDEZ, A. G. Leishmaniasis in Venezuela. CHANG, K. P.; BRAY, R. S.; eds. Human Parasitic Diseases, v.1 Amsterdam: Elsevier, 284-291, 1985.

SCORZA, J. V.; VALERA, M.; de SCORZA C.; CARNEVALI M.; MORENO E.; LUGO-HERNANDEZ, A. A new species of *Leishmania* parasite from the Venezuelan Andes region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 73(3), p.293-298, 1979.

SEMPREVIVO, L. H.; YUSUF, J. N.; HONIGBERG, B. H. Changes in growth rate and infectivity of *Leishmania donovani* subjected to various laboratory procedures. *Z. Parasitenkd.*, v. 65, p. 43-51, 1981.

SHAW, J. J. New world *Leishmaniasis*: the ecology of Leishmaniasis and the diversity of *Leishmania* species in Central and South America. In: J. Farrel, ed. World Class Parasites *Leishmania*, 4. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2003.

SHAW, J. J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Inst Oswaldo Cruz*, v. 102 (5), p. 541-547, 2007.

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

SHAW, J. J.; LAINSON, R.; McMAHON-PRATT, D.; DAVID, J. R. Serodeme of *Leishmania braziliensis* complex. In: Rioux, J-A. (ed). *Leishmania*. Taxonomy and Phylogeny. Montpellier. IMEE, p. 179-183, 1986.

SHAW, J. J.; LAINSONI, R. Leishmaniasis in Brazil: XI. Observations on the morphology of *Leishmania* of the *braziliensis* and *mexicana* complexes. *J Trop Med Hyg*, v. 79, n. 1, p. 9-13, 1976.

SHIN, S. W.; PARK, S.; PARK, D.; KIM, M. G.; KIM, S. C.; BREY, P. T.; PARCK, H. Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hypantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 28, p. 827-837, 1998.

SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigotes virulence and attenuation. *Infect Immun*, v. 55, p. 2802-2806, 1987.

SILVA-LOPEZ, R. E.; GIOVANNI-De-SIMONE. *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis: purification and characterization a promastigote serine protease. *Exp. Parasitol.*, v. 107 (3-4), p. 173-182, 2004.

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A.; SOUZA, A. A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous *Leishmaniasis* among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n. sp. A new *Leishmania* parasite of man in the Amazon region, *Parasite*, v. 9(1), p. 43-50, 2002.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100 (5), p. 525-534, 2005.

SILVEIRA, F. T.; SHAW, J. J.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. Dermal *Leishmaniasis* in the Amazon region of Brazil: *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Para. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.82 (2), p.289-91, 1987.

SINGH, N.; CURRAN, M. D.; MIDDLETON, D.; RASTOGI, A. K. Characterization of kinetoplast DNA minicircles of an Indian isolate of *Leishmania donovani*. *Acta Trop.*, v. 73 (3), p. 313-319, 1999.

SMITH, J. J.; SCOTT-CRAIG, J. S.; LEADBETTER, J. R.; BUSH, G. L.; ROBERTS, D. L.; FULBRIGHT, D. W. Characterisation of random amplified polymorphic comments of the use RAPD products in phylogenetic anlysis. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v. 3, p. 135-145, 1994.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. *Numerical taxonomy*. San Francisco, USA, W. H. Freeman, 1973.

SOLIMAN, M. F. M. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in syrian hamsters. *Acta Trop*, v. 97, p. 146-150, 2005.

- SOTO, M.; QUIJADA, L.; LARRETA, R.; IBORRA, S.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M. *Leishmania infantum* possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. *Parasitology*, v. 127 (Pt 2), p. 95-105, 2003.
- SPIELMANN, T.; BECK, H. P. Analysis of stage-specific transcription in *Plasmodium falciparum* reveals a set of genes exclusively transcribed in ring stage parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 111, p. 454-458, 2000.
- STENGER, S.; DONHAUSER, N. M.; THURING, H.; ROLLINGHOF, M.; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*, v. 183, p. 1501-1514, 1996.
- STIERHOF, Y. D.; BATES, P. A.; JACOBSON, R. L.; ROGERS, M. E.; SCHLEIN, Y.; HANDMAN, E.; ILG, T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur. J. Cell Biol.*, v. 78 (10), p. 675 – 689, 1999.
- TALAMÁS-ROHANA, P.; WRIGHT, S. D.; LENNARTZ, M. R.; RUSSELL, D. G. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150, 95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol*, v. 144 (12), p. 4817-4824, 1990.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, v.17 (16), p. 6463-6471, 1989.
- TAUTZ, D., RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.*, v. 25 (10):4127-38, 1984.
- TAVARES, C. C.; GRIMALDI, G. JR. & TRAUB-CSEKO, Y. M. Molecular karyotype analysis and mapping of housekeeping genes to chromosomes of selected species complexes of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, p. 477-486, 1992.
- TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol*. v. 47(2), p. 47-61, 2001.
- THOMAS, M. C.; MARTINEZ-CARRETERO, E.; CARMELO, E.; GONZALEZ, A. C.; VALLADARES, B. Molecular characterization of the *Leishmania braziliensis* L6 ribosomal protein. *J. Parasitol.*, v. 90 (4), p. 908-913, 2004.

TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.*, 36:47-115, 1995.

TIBAYRENC, M., NEUBAUER, K., BARNABE, C., GUERRINI, F., SKARECKY, D., AYALA, F.J. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v.90 (4), p.1335-9, 1993.

TOHOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; MARTINI-DUMAS, A.; SERRES, E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 68, p. 107-108, 1993.

TURCO, S. J. The *Leishmanial* lipophosphoglycan, a multifunctional molecule. *Exp. Parasitol.* v. 70, p. 241, 1988.

VAGO, A.R., ANDRADE, L.O., LEITE, A.A., D'AVILA REIS, D., MACEDO, A.M., ADAD, S.J., TOSTES, S. JR, MOREIRA, M.C., FILHO, G.B., Pena, S.D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.*, v. 156(5), p.1805-1809, 2000.

VAGO, A.R., MACEDO, A.M., OLIVEIRA, R.P., ANDRADE, L.O., CHIARI, E., GALVÃO, L.M., REIS, D., PEREIRA, M.E., SIMPSON, A.J., TOSTES, S., PENA, S.D. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.*, v.149(6), p. 2153-9, 1996.

VAN DER PEER, Y.; DER WACHTER, R. Treecon for Windows, a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.*, v. 10, p. 569-570, 1994.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. *Brasil Médico*, v. 25, p. 411, 1911.

VIEIRA, J. B.; LACERDA, M. M.; MARDEN, P. D. National reporting of *Leishmaniasis*: the brazilian experience. *Parasitology Today*, v. 6, p. 339-340, 1990.

VOLPINI, A.C., AZEREDO PASSOS, V.M., ROMANHA, A.J. Attempt to differentiate *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. *Parasitol. Res.* 87(12): 1056-9, 2001.

WALKER, J.; VASQUEZ, J. J.; GOMEZ, M. A.; DRUMMELSMITH, J.; BURCHMORE, R.; GIRARD, I.; OUELLETTE, M. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, v. 146 (1), p. 64-73, 2006.

WALTERS, L. L.; MODI, G. B.; CHAPLIN, G. L.; TESH, R. B. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 41 (3), p.295-317, 1989.

WALTON, B. C.; INTERMILL, R. W.; HAJDUK, M. E. Differences in biological characteristics of three *Leishmania* isolates from patients with espundia. *Am J Trop Med Hyg*, v. 26, p. 850-855, 1977.

WEBER, J.L. & MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, v.44(3), p.388-96, 1989.

WILKERSON, R. C.; PARSONS, T. J.; ALBRIGHT, D. G.; KLEIN, T. A.; BRAUN, M. J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera, Culicidae, Anopheles). *Insect Mol Biol*, v. 1, p. 205-211, 1993.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.L. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.*,18: 6531-6535, 1990.

WILSON, H. R.; DIECKMANNI, B. S.; CHILDS, G. E. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*; experimental cutaneous infections in a golden hamster. *Exp Parasitol*, v. 47, p. 270-283, 1979.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Stage-specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. *Infect Immunol*, v. 46, p. 128, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis Available <<http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm>> 23/10/2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). TDR diseases/Diseases current portfolio Available < <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm>> 30/12/2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the *Leishmaniasis*. Tech. Rep. Ser, 793. World Health organization Committee, Geneva, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. Home Page on The World Wide Web available from <www.who.ch/programmes/cdt/diseases/leis/leishmain.htm>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. Home Page on The World Wide Web available from <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Leishmaniasis. Tech Rep Ser, 701 – Geneva, WHO, 1984, 140p.

WOZENCRAFT, A. O.; BLACKWELL, J. M. Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of *Leishmania donovani*: correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3-mediated attachment to host macrophages. *Immunology*, v. 60(4), p. 559-563, 1987.

WRAXALL, B. G. & CULLIFORD, B. J. A thin-layer starch gel method for enzyme typing of bloodstrains. *J. Forensic Sci. Soc.*, v. 8 (2), p. 81-82, 1968.

WU, K. S.; JONES, R.; DANNEBERGER, L.; SCOLNIK, P. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acid Res.*, v. 22 (15), p. 3257-3258, 1994.

WYLER, D. J.; SYPEK, J. P.; McDONALD, J. A. In vitro parasite monocyte interactions in human *Leishmaniasis*; possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect. Immunity*, v. 49, p. 305-311, 1985.

YAMASAKI, H.; AGATSUMA, T.; PAVON, B.; MORAN, M.; FURUYA, M.; AOKI, T. *Leishmania* major-like parasite, a pathogenic agent of cutaneous *Leishmaniasis* in Paraguay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 51 (6), p. 749-757, 1994.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease MSP or GP63; of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, function. *Mol Biochem Parasitol*, v. 132, p. 1-16, 2003.

YOSHIDA, E. L. A.; CUBA-CUBA, C. A. PACHECO, R. S.; CUPOLILLO, E.; TAVARES, C. C.; MACHADO, G. M. C.; MOMEN, H.; GRIMALDI, Jr. G. Description of a *Leishmania (Leishmania) forattinii* sp. N., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 3, p. 397-406, 1993.

YOUNG, R. A.; DAVIS, R. W. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 80, p. 1194-1198, 1983.

ZELEDÓN, R. *Leishmaniasis* in the Caribbean Islands. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 653, p. 154-160, 1992.

ZELEDON, R.; BLANCO, E.; DE MONGE, E. Comparative experimental infections with Costa Rica strains of *Leishmania braziliensis* (Viannia, 1911). *Acta Trop*, v. 26, p. 136-155, 1969.

ZHANG, W. W.,; MATLASHEWSKI, G. In vivo selection for *Leishmania donovani* miniexon genes that increase virulence in *Leishmania major*. *Mol Microbiol*, v. 54(4), p.1051-62, 2004.

ZHANG, W. W.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; AREVADO, J.; NDAO, M.; WARD, B.; et al. Development of a genetic assay to distinguish between *Leishmania viannia* species on the basis os isoenzyme diferences. *Clinic Infec Dis*, v. 42 (6), p. 801-809, 2006.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, v. 20, p.176-183, 1994.

ZUFFEREY, R.; MEN MAMOUN, C. *Leishmania major* expresses a single dihydroxyacetone phosphate acyltransferase localized in the glycosome, important for rapid growth and survival at high cell density and essential for virulence. *J Biol Chem*, v. 281 (12), p. 7952-7959, 2006.

10 ANEXOS

ANEXO 1 – Preparo dos meios de cultura e soluções utilizadas.

Meio de NNN (NOVY, McNEAL E NICOLLE)

Base sólida:

Ágar “Oxoid”	14 g
Cloreto de sódio (NaCl)	6 g
Água destilada	1000 mL

Dissolve-se o NaCl na água, adiciona-se o ágar e aquece-se a mistura sob vapor fluente até a completa difusão. Distribui-se a mistura em frascos Erlenmeyers, na quantidade de 85mL por frasco e estereliza-se a gelose obtida em autoclave por 20 minutos a 120°C. A solidificação ocorre à temperatura ambiente e no momento de utilizá-la funde-se em banho-maria a 100°C. À mistura resfriada, adiciona-se sangue de coelho desfibrinado por agitação em frasco com pérolas de vidro, na proporção de 15%. Depois de misturar homogeneamente, o meio foi distribuído em tubos de ensaio 18 x 150mm. A fase líquida do meio foi constituída de meio LIT, sendo que para cada tubo foi adicionado 3mL do meio NNN e 2mL do LIT. Após a distribuição do meio, os tubos foram armazenados à 4°C.

Meio de LIT (“Liver Infusion Tryptose”), modificado

Meio líquido complexo idealizado por laeger e referido pela primeira vez por Camargo (1964). A partir desta data passou a ser extensivamente utilizado principalmente para o cultivo de *Trypanosoma cruzi* (Fernandes & Castellani, 1966;

Chiari, 1971). O LIT foi utilizado no cultivo de *Leishmania*, em combinação com o meio NNN, funcionando neste caso como fase líquida deste meio. Sua composição e preparação são apresentadas a seguir:

Glicose	2,0g
KCl	0,4g
NaCl	4,0g
Na ₂ HPO ₄	8,0g
Triptose	5,0g
Infuso de fígado	5,0g
Hemina	50,0mg
Gentamicina	10,0mg
Água destilada q.s.p.	1000mL

As modificações consistiram em substituir a hemoglobina por hemina, preparação do meio a partir de soluções estoques de sais e glicose e na substituição do soro bovino por soro fetal bovino na mesma proporção usada no meio LIT original. O meio é preparado misturando 250mL da solução estoque dos sais (NaCl, KCl e Na₂HPO₄), 4 X concentrada, com a triptose e a hemina (solução estoque com 2,5 mg/mL). O pH é ajustado para 7,4 utilizando NaOH 1M. A solução é homogeneizada em agitador magnético e filtrada em papel de filtro. A glicose é adicionada (solução 40% p/v) e o infuso de fígado dissolvido em água destilada. O volume é completado para 900mL, em seguida, o meio é autoclavado e distribuído em frascos, onde é adicionado antibiótico e soro fetal bovino (10%).

Meio α -MEM (Minimum Medium – Alpha Medium)

O meio α -MEM (GIBCO) é preparado dissolvendo-se 10,2 g do produto industrializado em um litro de água destilada. O meio é filtrado em sistema de filtração de pressão positiva, com membrana esterelizante Milipore de 0,22 μ .

Tampão Fosfato

Solução A: KH_2PO_4 (M/15) = 9.078 g + 1000 mL H_2O destilada

Solução B: Na_2HPO_4 (M/15) = 11.876 g + 1000 mL H_2O destilada

pH	Solução A (mL)	Solução B (mL)
5,8	9,2	0,8
6,0	8,8	1,2
6,2	8,15	1,85
6,4	7,38	2,62
6,6	6,4	3,6
6,8	5,0	5,0
7,0	4,0	6,0
7,2	2,8	7,2
7,4	2,0	8,0
7,6	1,3	8,7
7,8	0,88	9,12
8,0	0,5	9,5

Utilizar 10mL (Solução A + B) para cada 90mL de água destilada, de acordo com as proporções acima.

Solução Salina Tamponada (Phosphate Buffer Solution – PBS) 10X

NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	2,56g
Na ₂ HPO ₄	11,78g
NaCl	87,60g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000mL

Adicionar o fosfato de sódio monobásico e o dibásico em 850 mL de água destilada. Acrescentar o NaCl, ajustar o pH para 7,2 – 7,4 e completar o volume para 1000 mL. Conservar em geladeira. Na ocasião da utilização fazer a diluição 1:10 em água destilada.

Solução Salina com Antibióticos

Antibióticos:

Estreptomicina	1g
Penicilina G potássica cristalina	5000000U

Diluição e uso:

Estreptomicina: Diluir o conteúdo do frasco em 5mL de água destilada e utilizar 1mL para 1 litro.

Penicilina: Diluir o conteúdo do frasco com 10mL de água destilada e utilizar 1mL para 1 litro.

Utilizar para pré-tratamento do material de biópsia de lesão, acrescido a PBS, na concentração de :

Estreptomicina	50 a 100ug/mL
Penicilina	200 a 500U/mL

Conservação: separar em alíquotas de 1mL e estocar à -20°C.

Solução de Paul (Isoton) – Paul, 1972

Ácido cítrico	10,5 g
NaCl	7,0 g
Formol P. A.	5,0mL
H ₂ O destilada q.s.p.	1000mL

Filtrar em papel de filtro. Armazenar à temperatura ambiente.

ANEXO 2- Sistemas de revelação de enzimas.

Enzimas	Abreviação	Tampão de Reação	Substratos	Coenzimas 10 mg/ml	Ativadores	Enzimas de Ligação	Métodos de Visualização
Glicose-fosfo-isomerase (E. C. 5.3.1.9)	GPI	0,15 M Tris/HCl pH7,4 (12mL)	1mL de glicose- fosfato (10mg/mL)	0,6mL NADP	0,1M MgCl ₂ (2mL)	G6PD 100u/mL 100µL	*2mL MTT **2mL PMS ***20mL ágar
6- Fosfo-glico-desidrogenase (E. C. 1.1.1.43)	6-PGDH	0,15M Tris/HCl pH7.4 (12mL)	6-fosfo-gluconato (10mg/ml)	0,6mL NADP	0,1M MgCl ₂ (2mL)	-	*2ml MTT **2ml PMS ***20 ml ágar
Esterase (E.C.3.1.1.1)	ES	0,1M PO ₄ pH7.4 (14mL)	1mg de 4- metilumbeliferil butirato Acetona	-	-	-	Papel-filtro UV
Superóxido Dismutase (E.C.1.15.2.2)	SOD	0,1M PO ₄ pH8.0 (18,8mL)	0,25mg riboflavina	-	200mM EDTA (0,2mL) 0,6mg Riboflavina	1mL NBT ⁺ (5mg/mL)	20mL de ágar (incubação especial)
Manose Fosfato Isomerase (E. C. 5.3.1.8)	MPI	0,15M Tris/HCl pH7.4 (12mL)	10mg de manose- fosfato	0,6mL NADP	0,1M MgCl ₂ (2mL)	G6PD 100u/mL 200µL GPI (Tipo III) 16µL	*2mL MTT **2mL PMS ***20 mL ágar
Nucleotidase (E. C. 3.2.2.1)	NH	0,05M PO ₄ pH7.4 (16mL)	2mg inosina	-	-	0,13 xantina oxidase	*2mL MTT **2mL PMS ***20 mL ágar

* MTT – Metiltiazol tetrazol, 5 mg/mL

** PMS – Metossulfato de fenosina, 2 mg/mL

*** Ágar 1,2%

Incubação especial – Incubar a 37°C no escuro por 1 hora minutos. Em seguida, expor a uma fonte luminosa uniforme (as bandas aparecerão contra um fundo azul)

+NTB–Nitroblue tetrazolium

