

JANAINA SOUSA CAMPOS ALVARENGA

Estudo da variabilidade genética inter e
intra-específica de
Leishmania (Leishmania) chagasi
(Cunha & Chagas, 1937) e
Leishmania (Leishmania) infantum
(Nicolle, 1908)

Tese de doutorado apresentada ao
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: Imunologia e Biologia Molecular

ORIENTADORA
Dra. Maria Norma Melo

CO-ORIENTADORA
Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

2007

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e da Comunidade Económica Europeia (LeisEpiNetSA).

*Dedico esse trabalho à minha FAMÍLIA: Léo e Pedro,
Mãe, Pai e Mary.
Sem o amor, a dedicação e o apoio de vocês
eu não teria conseguido.*

*“Cada um terá que dar conta da inutilidade
voluntária da sua existência.”*

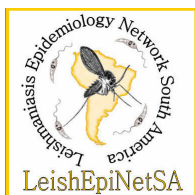
Allan Kardec

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa do seu coordenador Dr. Pedro Marcos Linardi, pelo exemplo de profissionalismo, competência e dedicação em conduzir os trabalhos e ainda pela oportunidade de crescimento e aprendizado científico.

À querida Sumara, secretária da Pós-Graduação. Obrigada por toda a paciência, atenção, disponibilidade e boa vontade em ajudar sempre. Obrigada pela acolhida e por toda a gentileza ao longo deste trabalho. A você todo meu carinho e gratidão.

À todos os professores do Departamento de Parasitologia que, direta ou indiretamente, muito contribuíram para minha formação.



AGRADECIMENTOS

Norma, não seria capaz de exprimir toda minha admiração, respeito e gratidão em tão poucas linhas. Vou limitar-me a um MUITO OBRIGADA! Obrigada pela paciência, pela orientação e preocupação constantes, obrigada por me fazer crescer não apenas como pesquisadora, mas também como pessoa. Obrigada pelos ricos, agradáveis e descontraídos momentos de convivência, pelas palavras de incentivo. Sua bondade, dedicação, ética e competência fazem de você uma pessoa única e especial a quem dedico essa conquista. OBRIGADA POR TUDO!

À Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo (Celinha), por estar sempre presente e por ter me recebido de forma tão amável e doce. Obrigada pela orientação, entusiasmo e disponibilidade constantes. Obrigada pelas sensatas conversas, pelas correções, pelo exemplo de organização e dedicação.

À Comunidade Econômica Européia (LeisEpiNetSA), na pessoa do Coordenador Michael A. Milles, pela competente coordenação do grupo e financiamento do projeto.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro.

À Dra. Lenea Maria Campino, da Universidade Nova de Lisboa, Portugal, por toda colaboração e por gentilmente nos ter fornecido as amostras de *L. infantum*.

À professora Marilene Marques Suzan Michalick, pela agradável convivência durante todo esse tempo e também pelas valiosas contribuições.

Ao professor Marcos Pezzi Guimarães, por ter gentilmente disponibilizado o laboratório para a realização das reações de PCR.

À professora Maria Aparecida Gomes por ter disponibilizado o laboratório para a realização de algumas técnicas moleculares.

À professora Daniela Bartholomeu pela simpatia, competência, paciência e disponibilidade.

À professora Annamaria Ravara Vago, do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, pela competência, acolhida, disponibilidade, atenção e doçura. Obrigada por me permitir aprender uma nova técnica.

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

À Soraia pela agradável convivência, por toda a contribuição, apoio, competência e empenho na solução de problemas, às vezes desanimadores. Não vou esquecer a sua imensa ajuda e colaboração durante todos esses anos. Obrigada pelas dicas finais de apresentação do trabalho. À você toda minha gratidão.

À Rosângela (Rô) pelos descontraídos momentos de convivência, por todo o auxílio técnico e psicológico, apoio e determinação na solução de problemas. Pela presença constante em momentos de apuros. Com você aprendi que não podemos ceder aos inexplicáveis problemas da Biologia Molecular. Muito Obrigada!

À Rosálida Lopes pelo apoio técnico, disponibilidade e agradável convivência.

À doce Cíntia pela amizade, simpatia, disponibilidade e eterna boa vontade em ajudar. Por toda contribuição e dicas nos diferentes experimentos. Obrigada pelos ricos momentos.

À Larinha, pela simpatia, presteza, entusiasmo e boa vontade. Foi muito bom conhecer e conviver com você.

Aos companheiros de jornada Belinha, Sidney, Raul, Michele, Geane, Andréa, Eliane, Eloísa por todos os momentos de convivência. Por compartilharem das mesmas dúvidas e angústias e pelas palavras de incentivo.

À minha querida e inseparável AMIGA Ângela. Obrigada por você existir....Sem você essa longa caminhada e muitos outros momentos da minha vida seriam mais difíceis. Você faz parte desse trabalho, dessa conquista. Obrigada pelas longas e incontáveis horas de "terapia", por ter se tornado, ao longo destes 13 anos de convivência a outra irmã que eu não tive. Obrigada pela paciência, por saber falar exatamente aquilo que preciso ouvir. Por compartilhar comigo de toda apreensão e angústia nestes momentos finais.

Ao meu grande amor, Léo. Obrigada pelo amor, paciência, compreensão, cumplicidade e amizade. Obrigada por me aturar de forma heróica durante a fase final deste trabalho. Obrigada pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis, por acreditar em mim, por me fazer uma pessoa melhor, por ser a minha outra metade. Obrigada pela ajuda na árdua tarefa de conferir as referências. Você é um exemplo de bondade e de caráter. Te amo sempre. Amo a nossa família.

Ao meu amado Pedro (Pepê). Meu filho, descobri o quanto a vida é linda e importante depois que você passou a fazer parte dela. Você ilumina os meus dias e irradia amor e ternura. Obrigada por permitir minhas horas de "ausência" mesmo estando muitas vezes em casa. Obrigada por esse sorriso lindo e pelo abraço apertado que muitas vezes foram o alívio de toda a tensão e uma verdadeira injeção de energia. Te amo....Te amo....

À minha doce e adorada MÃE. Você sempre acreditou que era possível chegar lá. Me fez perceber que devemos sempre aproveitar todas as oportunidades que a vida nos oferece. Obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio, incentivo, por cuidar tão bem do meu tesouro, me permitindo ter tranquilidade para prosseguir. Essa conquista também é sua. Amo Você.

Ao meu querido Pai. Obrigada por ao longo da minha vida, mesmo com todas as dificuldades, ter me proporcionado condições para continuar. Obrigada pelo carinho e amor. Obrigada pela ajuda e cuidados com o Pepê. Pelas idas e vindas ao Colégio Santo Agostinho, nos dias em que não pude fazê-lo. Amo Você.

À minha doce e amada Mary. Você sempre acreditou e apoiou cada nova etapa da minha vida. Obrigada por tudo....pelo amor incondicional, pela amizade eterna, por ter tido a nobreza de aumentar a nossa família. Você é a pessoa que Deus enviou para acalantar a minha alma nos momentos de angústia e para sorrirmos juntas em tantas horas de alegria. Obrigada pelo amor de mãe. Você é a melhor e mais especial irmã-mãe deste mundo. Te amo muito.

Às minhas doces Nath e Juju. Como eu amo vocês! Obrigada por estarem sempre comigo, por fazerem os meus dias mais alegres e coloridos. Por me mostrarem em cada palavra, como as "coisas" podem ser mais simples. Ao meu querido Paulo (Pimpinho), você transformou a nossa vida...trouxe paz, muito amor e carinho que transbordam a cada sorriso seu. Obrigada pela doçura e alegria. A titia ama você.

Ao meu cunhado Jusa. Obrigada pelas dicas preciosas. Por me ensinar a importância da dedicação à vida acadêmica e por valorizar plenamente a ciência.

À “trololós family” Tia Fátima e Cia. Pelos inúmeros momentos agradáveis de convivência. Por acreditarem no verdadeiro sentido da família. Pelo carinho e por acreditarem em mim. Ao meu querido afilhado Rick, motivo de grande orgulho, pela disponibilidade e contribuição.

Ao meu especialíssimo primo Marcelo. Obrigada pela paciência, pela competência. Obrigada por me aturar inúmeras vezes.....obrigada pelo apoio “técnico” imprescindível. Me orgulho muito de você.

Aos queridos Helena, Evaldo, Dine, Arlan pelo apoio e incentivo e em especial ao Lincoln por todas as horas de descontração, por participar, mesmo que indiretamente das angústias e aflições e também pela implicância constante com os almoços no boliche.

À Luli, Tatá, Alice e Ciça, pela alegria e amor incondicionais.

Aos queridos Rosa, Andréa e Lenir pela compreensão, apoio, incentivo e também pelos ricos e agradáveis momentos de convivência.

Às minhas amigas Josy, Edi, Kerlen e Bia, por me aturarem ao longo desta jornada. Por todo carinho, colaboração, incentivo e apoio. Obrigada meninas, adoro conviver com vocês.

Às amigas Iara e Daly por todos os excelentes momentos de convivência, e pela injeção de ânimo nos momentos de fraqueza. Aos queridos: Maria José, Júnia, Tia Lú, Rodrigo, Sérgio, Meire pelas sessões de terapia diárias, pelo apoio e incentivo. Por todos os inigualáveis momentos gastronômicos.

Às queridas Denise, Jana, Flávia pela amizade contruída ao longo destes anos. Por compartilharmos alegrias, frustrações e loucuras diversas. Obrigada pelo apoio e incentivo.

À minha grande amiga Carla, por ter sempre participado das minhas conquistas e também à querida e eterna “Vó” Nilce. Tenho certeza de que mesmo não estando mais aqui, está muito orgulhosa.

Às queridas amigas Dani e Dri, que apesar da distância, se fazem sempre presentes. Obrigada pela doçura, companherismo e cumplicidade. Adoro vocês.

A minha doce e inseparável, Julie. Obrigada por me receber sempre com extrema alegria, pelo amor incondicional e pela companhia nas intermináveis horas de computador.

Às queridas Gigi e Mara pelo carinho e por cuidarem tão bem da nossa família.

A DEUS, sem o qual nada disso seria possível. Obrigada por mais essa oportunidade de crescimento. Obrigada por essa encarnação, oportunidade de trabalho e evolução. Obrigada pela paciência quando às vezes ainda tropeço, por me iluminar e amparar em cada passo dessa longa caminhada. Obrigada por colocar em meu caminho todas essas pessoas tão maravilhosas com as quais pude aprender tanto e crescer.

Resumo

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença potencialmente fatal para o homem, tendo como agentes etiológicos as espécies de *Leishmania* do complexo *L. (Leishmania) donovani*: *L. donovani* e *L. infantum*, ambas no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Apesar de inúmeros estudos realizados sobre as doenças causadas por esses parasitos, a epidemiologia dos vários focos humanos é ainda hoje pobremente conhecida para uma doença da importância e impacto médicos da leishmaniose visceral, não só quanto à sua ecologia, mas com opiniões discordantes quanto ao status taxonômico de alguns destes parasitos. A inclusão de *L. chagasi* no complexo *L. donovani* é amplamente aceita ainda que sua afinidade taxonômica e origem sejam matéria de controvérsia. A utilização de metodologias moleculares veio permitir o desenvolvimento de novas abordagens no estudo da variabilidade genética e a determinação de correlações filogenéticas existentes entre as duas espécies, e dentro de cada uma delas. Alguns trabalhos realizados com as espécies do complexo *L. donovani*, utilizando análises genética e fenética não mostraram distinção entre *L. infantum* e *L. chagasi*. Destaca-se que grande parte dos dados disponíveis na literatura sobre a variabilidade genética de *L. chagasi* em comparação com *L. infantum* foi gerada através da análise de isoenzimas. Contudo nenhum estudo até agora realizado utilizou um número significativo de amostras do Brasil (*L. chagasi*), com poucas passagens *in vitro* e com história clínica bem conhecida, em comparação com amostras de *L. infantum*. O objetivo central do presente trabalho foi avaliar a variabilidade genética inter e intra-específica de amostras *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de casos humanos e reservatórios caninos da Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e da Região do Mediterrâneo, Portugal. No presente estudo foram utilizadas técnicas empregadas na análise de polimorfismos do DNA nuclear (nDNA) e/ou do cinetoplasto (kDNA), utilizados como marcadores genéticos gerados por: amplificação aleatória do DNA polimórfico – RAPD; polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição do kDNA utilizando endonucleases de restrição – RFLP; PCR com iniciadores de repetições de seqüências simples - SSR-PCR e amplificação pela técnica de LSSP-PCR Low-Stringency Single Specific Primer PCR. Essas metodologias já se encontram descritas na literatura e têm sido utilizadas no

laboratório de Biologia de *Leishmania*, do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG em estudos de *Leishmania* sp. e de *L. chagasi* isoladas de reservatórios caninos e de casos humanos mostrando polimorfismo e variantes isoenzimáticas.

Utilizando a técnica de isoenzimas, todas as amostras apresentaram o mesmo perfil frente às diferentes enzimas, indicando pertencer a um mesmo zimodema, com exceção de duas amostras do Brasil (uma de humano e outra de cão) que apresentaram um perfil diferente das demais para duas das enzimas analisadas. Pela utilização das técnicas de RAPD e SSR-PCR observou-se uma separação das amostras em dois *clusters* relacionados ao hospedeiro de origem. Com as técnicas de RFLP e LSSP-PCR essa separação não foi observada, mas pequenos polimorfismos foram detectados. A técnica de sequenciamento evidenciou polimorfismos, algumas vezes associados a origem geográfica ou ao hospedeiro.

Esperamos que os resultados aqui apresentados possam trazer um maior conhecimento da epidemiologia molecular do parasito, levando à melhor compreensão da diversidade e estrutura das populações de *Leishmania* estudadas.

Abstract

Visceral leishmaniasis or kala-azar is a potentially fatal illness for man. Their etiologic agents belong to the *L. donovani* complex: *L. donovani* and *L. infantum*, both in the Old World, and *L. chagasi*, in the New World. Despite of innumerable studies about the diseases caused by these parasites, the epidemiology of the various human focuses of visceral leishmaniasis is still poorly known when its medical importance and impact is taken into account. Little is also known about its ecology since there is not an agreement about the taxonomic status of some of these parasites. The inclusion of *L. chagasi* in *L. donovani* complex is widely accepted although their taxonomic likeness and origin are subject of controversy. The use of molecular methodologies made possible the development of new approaches for studying genetic variability and the determination of phylogenetic correlations between the two species and inside each of them. Some studies (using genetic and phenetic analyses) developed with the species of *L. donovani* complex did not show any distinction between *L. infantum* and *L. chagasi*. Most available literature concerning data on the genetic variability of *L. chagasi* in comparison with *L. infantum* were generated by means analysis of isoenzymes. However, neither of those studies have worked with a significant number of samples isolates from Brazil (*L. chagasi*) with few *in vitro* passages and well known clinical history when compared to samples of *L. infantum*. The principal aim of the work was evaluated of the genetic variability inter and intraspecific of *L. chagasi* and *L. infantum* strains isolated from human cases and canine reservoirs from the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, and from the Mediterranean region, Portugal. At the present study we used techniques directed to the analyses of polymorphisms of the DNA (DNA) and/or kinetoplast DNA (kDNA), used as genetic markers generated by: Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD; Restriction Fragment Length Polymorphism of kDNA using endonucleases of restriction – RFLP; PCR with primers directed to the simple sequence repeat - SSR-PCR and by the LSSP-PCR – Low-Stringency Single Specific Primer PCR technique. We compared our data with the zymodemes results obtained with the same strains by isoenzymatic analysis. The methodologies were used in this work as well as in the literature and have been used in the Laboratory of Biology of *Leishmania*, from the Department of Parasitology, ICB/UFMG in studies of *Leishmania* sp. All the samples present similar isoenzymes

profiles, except two Brazilian samples (one from human case and other from canine reservoir) which present different profile in two enzymes analyzed. We have obtained similar genotypes with RAPD-PCR and SSR-PCR techniques, but both techniques showed the clonal reproduction of samples studied and grouped together in UPGMA phenogram with all the primers used the samples from human and dogs independent of their geographical origins. Similar results were obtained with the samples when the genetic information derives from high-resolution methods, such as RFLP-PCR patterns, LSSP-PCR or DNA sequencing, we observed polymorphisms associated with from geographic origins or type of host in human or canine. These results will hopefully bring greater knowledge of the molecular and genetic epidemiology of the populations, which, in turn, will lead to a better understanding of the diversity and structure of the studied populations of *Leishmania*.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** –Diagrama representativo do resultado da eletroforese das enzimas MDH, ACON, IDH, 6PGD, ME, NH, G6PDH, PEPD, GPI e PGM com as amostras de referência, as amostras isoladas de casos humanos do Brasil e de Portugal (GH) e as amostras isoladas de cães do Brasil e de Portugal (GC). As variantes A e B encontram-se representadas pelas iniciais VA (amostra RR059) e VB (amostra RR066), respectivamente..... 86
- FIGURA 2A** - Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador P14..... 95
- FIGURA 2B** - Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência com o iniciador P14..... 95
- FIGURA 3** - Fenograma das amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador P14... 96
- FIGURA 4A** - Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador L15..... 97
- FIGURA 4B** - Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência com o iniciador L15..... 97
- FIGURA 5** - Fenograma das amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador L15... 98
- FIGURA 6A** - Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador F10..... 99
- FIGURA 6B** - Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência com o iniciador F10..... 99
- FIGURA 7** - Fenograma das amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador F10... 100
- FIGURA 8** - Fenograma consenso das amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com nove iniciadores (B07, M13R, M13F, P14, L15, ILO 872, ILO 875, F10 e R15)..... 101
- FIGURA 9A** - Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador (CA)₈RY..... 107
- FIGURA 9B** - Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador (CA)₈RY..... 107

FIGURA 10 - Fenograma das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com o iniciador (CA) ₈ RY.....	108
FIGURA 11A - Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador CAA(CT) ₆	109
FIGURA 11B - Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador CAA(CT) ₆	109
FIGURA 12 - Fenograma das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com o iniciador CAA(CT) ₆	110
FIGURA 13 - Fenograma consenso das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com dois iniciadores (CA) ₈ RY, CAA(CT) ₆	111
FIGURA 14 - Fenograma consenso das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pelas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR com os iniciadores B07, M13R, M13F, P14, L15, ILO 872, ILO 875, F10, R15, (CA) ₈ RY e CAA(CT) ₆	112
FIGURA 15A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>BglII</i>	116
FIGURA 15B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease.....	116
FIGURA 16 - Fenograma das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição <i>BglII</i>	117
FIGURA 17A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>Ddel</i>	120
FIGURA 17B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>Ddel</i>	120
FIGURA 18 - Fenograma das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição <i>Ddel</i>	121
FIGURA 19A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>HpaII</i>	124

FIGURA 19B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>HpaII</i>	124
FIGURA 20 - Fenograma das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição <i>HpaII</i>	125
FIGURA 21A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>RsaI</i>	128
FIGURA 21B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>RsaI</i>	128
FIGURA 22 - Fenograma das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição <i>RsaI</i>	129
FIGURA 23A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>VspI</i>	132
FIGURA 23B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (<i>L. infantum</i>) e PP75 (<i>L. chagasi</i>), digeridas com a endonuclease <i>VspI</i>	132
FIGURA 24 - Fenograma das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição <i>VspI</i>	133
FIGURA 25 - Fenograma consenso das amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> , isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do <i>Treecon for Windows</i> , com base nos dados gerados pelas técnicas de PCR-RFLP com as endonucleases <i>BglII</i> , <i>DdeI</i> , <i>HpaII</i> , <i>RsaI</i> e <i>VspI</i>	134
FIGURA 26 - Gel representativo dos perfis de LSSP-PCR obtidos pela análise do fragmento de 447pb da região do kDNA de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> amplificado a partir de amostras de DNA genômico de amostras isoladas de pacientes humanos.....	141
FIGURA 27 - Gel representativo dos perfis de LSSP-PCR obtidos pela análise do fragmento de 447pb da região do kDNA de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> amplificado a partir de amostras de DNA genômico de amostras isoladas reservatórios caninos.....	144
FIGURA 28 – Seqüenciamento parcial fragmento de 447pb do minicírculo de kDNA de algumas amostras isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, isoladas no Brasil e em Portugal, após amplificação com os iniciadores MC1 e MC2.....	150

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Amostras de <i>Leishmania chagasi</i> utilizadas no estudo, isoladas de casos humanos e caninos, armazenadas no criobanco de <i>Leishmania</i> do laboratório de Biologia de <i>Leishmania</i> do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG e do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR/FIOCRUZ.....	59
QUADRO 2 - Amostras de <i>L. infantum</i> utilizadas no presente estudo, isoladas de casos humanos e caninos, armazenadas no criobanco de <i>Leishmania</i> da Unidade de Leishmanioses, do Instituto de Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.....	60
QUADRO 3 - Amostras de referência da Organização Mundial de Saúde utilizadas no presente estudo.....	61
QUADRO 4 – Iniciadores aleatórios utilizados nas reações de RAPD-PCR.....	68
QUADRO 5 - Iniciadores utilizados nas reações de SSP-PCR.....	70
QUADRO 6 - Programa de amplificação dos iniciadores utilizados na técnica SSR-PCR...	70
QUADRO 7 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR específica.....	71
QUADRO 8 - Endonucleases de restrição utilizadas na Reação de PCR-RFLP.....	73
QUADRO 9 - Perfis de restrição observados com a endonuclease <i>BglII</i>	115
QUADRO 10 - Perfis de restrição observados com a endonuclease <i>Ddel</i>	119
QUADRO 11 - Perfis de restrição observados com a endonuclease <i>HpaII</i>	123
QUADRO 12 - Perfis de restrição observados com a endonuclease <i>RsaI</i>	127
QUADRO 13 - Perfis de restrição observados com a endonuclease <i>VspI</i>	131
QUADRO 14 - Perfis de restrição obtidos com as diferentes endonucleases para todas as amostras isoladas de casos humanos, do Brasil e de Portugal.....	136
QUADRO 15 - Perfis de restrição obtidos com as diferentes endonucleases para todas as amostras isoladas de reservatórios caninos, do Brasil e de Portugal.....	137
QUADRO 16 - Estabelecimento dos perfis de LSSP-PCR do kDNA de amostras de <i>Leishmania</i> isoladas de pacientes humanos de acordo com o tamanho das bandas principais.	143
QUADRO 17 - Estabelecimento dos perfis de LSSP-PCR do kDNA de amostras de <i>Leishmania</i> isoladas de pacientes humanos de acordo com o tamanho das bandas principais.....	146

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Eletromorfos observados em isolados de <i>Leishmania</i> provenientes do Brasil e Portugal. Isolados humanos.....	84
TABELA 2 - Eletromorfos observados em isolados de <i>Leishmania</i> provenientes do Brasil e Portugal. Isolados caninos.....	85
TABELA 3 - Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15 para as amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> isoladas de casos humanos.....	91
TABELA 4 - Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15 para as amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> isoladas reservatórios caninos.....	92
TABELA 5 - Resumo do número de fragmentos de DNA, entre 250 e 1000pb, de amostras de <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Leishmania infantum</i> isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, detectados por RAPD-PCR, com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15.....	93
TABELA 6 - Resumo do número de fragmentos de DNA, entre 250 e 1000pb, de amostras de <i>Leishmania chagasi</i> e <i>Leishmania infantum</i> isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, detectados por RAPD-PCR, com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15.....	94
TABELA 7 - Resultados obtidos com a técnica de SSR-PCR com os iniciadores (CA) ₈ RY e CAA(CT) ₆ para as amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> isoladas de casos humanos.....	104
TABELA 8 - Resultados obtidos com a técnica de SSR-PCR com os iniciadores (CA) ₈ RY e CAA(CT) ₆ para as amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> isoladas de reservatórios caninos.....	104
TABELA 9 - Resumo do número de fragmentos de DNA, entre 250 e 1000pb, de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, detectados por SSR-PCR, com os iniciadores (CA) ₈ RY e CAA(CT) ₆	105
TABELA 10 - Resumo do número de fragmentos de DNA, entre 250 e 1000pb, de amostras de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, detectados por SSR-PCR, com os iniciadores (CA) ₈ RY e CAA(CT) ₆	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR
µg	Micrograma
µL	Microlitro
α-MEM	Minimum essential medium
BLAST	Basic local alignment search tool
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CPqRR	Centro de pesquisas René Rachou
DAF	DNA <i>Amplification Fingerprinting</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	<i>Ethylene Diamine TetrAcetic Acid</i> : ácido etilenodiamino tetra-acético
EXO	Exonuclease
gp63	Glicoproteína 63
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IMT	Instituto de Medicina Tropical
KCl	Cloreto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>Liver infusion tryptone</i> : infusão de fígado e triptona
LSSP-PCR	<i>Low Stringency Single Primer/PCR</i> : PCR de único iniciador sob baixa estringência
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral Americana
M	Molar
MCAN	Mamífero cão
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHOM	Mamífero homem
mL	Mililitro
MLEE	<i>Multiloci enzyme electrophoresis</i> : Eletroforese de enzimas multilocais
mM	Mili molar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NNN	Meio de cultura Novy McNeal e Nicolle
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline – Solução de fosfato tamponada
PCR	Polimerase Chain Reaction: <i>Reação em cadeia da polimerase</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
RAPD	<i>Ramdomly Amplified polimorphic DNA</i> : Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> : Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucléico
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> : dodecil sulfato de sódio
SSR	Seqüências simples repetidas

STL	Solução tampão de lavagem
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris-EDTA
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
WHO	World Health Organization – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 AS LEISHMANIOSES.....	23
1.2 CICLO DE VIDA DO PROTOZOÁRIO.....	24
1.3 A LEISHMANIOSE VISCERAL.....	26
1.3.1 LEISHMANIOSE VISCERAL POR <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> e <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	28
1.4 IDENTIDADE DO AGENTE ETIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO NOVO MUNDO.....	33
1.5 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS COMO CRITÉRIOS TAXONÔMICOS DE <i>LEISHMANIA</i>	38
1.5.1 ANÁLISE DE ISOENZIMAS	39
1.5.2 MARCADORES BASEADOS NA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE - PCR	41
1.5.2.1 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO – RAPD.....	42
1.5.2.2 PCR ANCORADA A REPETIÇÕES DE SEQUÊNCIAS SIMPLES - SSR-PCR.....	43
1.5.2.3 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO - RFLP.....	46
1.5.2.4 LSSP-PCR.....	47
1.5.3 SEQÜENCIAMENTO DE DNA	49
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	53
3 OBJETIVO	56
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 AMOSTRAS UTILIZADAS.....	58
4.2 AMOSTRAS DE REFERÊNCIA.....	61
4.3 OBTENÇÃO DE MASSA DE PROMASTIGOTAS PARA UTILIZAÇÃO NAS TÉCNICAS MOLECULARES E NOS ESTUDOS ISOENZIMÁTICOS.....	61
4.4 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS EM GEL DE AGAROSE.....	62
4.5 ANÁLISE DOS GÉIS.....	64
4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ESTUDOS MOLECULARES.....	65
4.7 EXTRAÇÃO DE DNA.....	65
4.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	66
4.9 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNAs POLIMÓRFICOS – RAPDs.....	67
4.10 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	69
4.11 PCR ANCORADA A REPETIÇÕES DE SEQUÊNCIAS SIMPLES (SSR-PCR).....	69
4.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ESPECÍFICA.....	71
4.13 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO - RFLP.....	72

4.14 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE RAPD, SSR-PCR E PCR-RFLP E CONSTRUÇÃO DOS FENOGRAMAS	73
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	75
4.16 REAÇÃO DE LSSP-PCR	76
4.17 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO MINICÍRCULO DE κDNA	78
4.18 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS EM BANCO DE DADOS	79
5 RESULTADOS.....	82
5.1 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	82
5.2 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO (RAPD)	87
5.3 SSR-PCR	102
5.4 ANÁLISE ASSOCIADA DOS RESULTADOS OBTIDOS POR RAPD-PCR E SSR-PCR	112
5.5 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO – RFLP	114
ENDONUCLEASE <i>BGL</i> II	114
ENDONUCLEASE <i>DDE</i> I	118
ENDONUCLEASE <i>Hpa</i> II	122
ENDONUCLEASE <i>Rsa</i> I	126
ENDONUCLEASE <i>Vsp</i> I	130
5.6 LOW - STRINGENCY SINGLE SPECIFIC PRIMER PCR - LSSP-PCR.....	139
5.7 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO MINICÍRCULO DE κDNA	147
6 DISCUSSÃO.....	152
6.1 ANÁLISE DE ISOENZIMAS.....	154
6.2 RAPD-PCR.....	157
6.3 SSR-PCR	160
6.4 RFLP-PCR.....	163
6.5 LSSP-PCR.....	166
7 CONCLUSÕES.....	169
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	171
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	174
10 ANEXOS - SISTEMAS DE REVELAÇÃO DE ENZIMAS.....	196

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As transformações demográficas, as mudanças globais no clima, somadas ao fato de que 20% das pessoas vivem em extrema pobreza, com fome e desnutridas, sem saneamento básico e educação, criam condições para o constante surgimento de novas formas de expressão de doenças, já conhecidas anteriormente, e para a emergência de novas doenças. Nesse contexto, as doenças causadas por parasitos representam um grave problema de saúde pública nos países pobres e em desenvolvimento (AULT, 2007). Dentre os inúmeros parasitos de importância médica, destacam-se diferentes espécies do gênero *Leishmania*, protozoário agente de um amplo espectro de doenças, coletivamente referidas como leishmanioses (ALVAR et al., 2006; DUJARDIN, 2006).

1.1 AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses em sua maioria são consideradas primariamente como zoonoses, podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito. São causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS,1903). Atualmente são conhecidas aproximadamente 30 espécies capazes de infectar o homem.

A doença é endêmica em 4 continentes, com prevalência nas áreas de clima temperado à tropical, afetando populações de mais de 88 países (HERWALDT, 1999). A estimativa anual de incidência da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar está em aproximadamente 1,5 a 2 milhões de casos, com

367 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção em todo o mundo (HERWALDT, 1999; CROFT, 2001).

O protozoário é transmitido ao homem pela picada da fêmea do inseto vetor pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae (MARTINS et al., 1978), sendo os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* amplamente distribuídos no Novo e Velho Mundo, respectivamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2003). É conhecida a existência de pelo menos 400 espécies de flebotomíneos nas Américas, das quais cerca de 40 foram relatadas como possíveis vetores de *Leishmania* (LAINSON & RANGEL, 2003).

As manifestações clínicas da infecção variam desde infecções inaparentes ou subclínicas, a um amplo espectro de manifestações envolvendo a pele e mucosas, com lesões sujeitas a diferentes graus de severidade, podendo ainda apresentar-se sob a forma de lesões viscerais graves, muitas vezes fatais (BALANÃ-FOUCE et al., 1998). As formas tegumentares podem ir desde uma lesão cutânea localizada, com cura espontânea, a formas mucosas desfigurantes; na forma visceral, a doença pode manifestar-se de forma sistêmica e generalizada.

As diferentes manifestações clínicas dependem de vários fatores, dentre eles a espécie de *Leishmania* envolvida, sua virulência e aspectos relacionados ao hospedeiro, como *status* imunológico e nutricional, dentre outros.

1.2 CICLO DE VIDA DO PROTOZOÁRIO

O parasito possui ciclo de vida heteroxênico, alternando estádios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados. Além do homem, entre os hospedeiros mamíferos encontra-se grande variedade de espécies como roedores,

edentados (tatu, tamanduá e preguiça), marsupiais (gambás), canídeos e outros primatas (LAINSON & SHAW, 1988).

Lainson & Shaw (1988) propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, considerando, principalmente, o local de desenvolvimento do parasito no inseto vetor. Parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania* se desenvolvem predominantemente, nos intestinos médio e anterior de seus vetores. Este tipo de desenvolvimento é chamado de suprapilárico. Já os parasitos pertencentes ao subgênero *Viannia* incluem uma fase de seu desenvolvimento no intestino posterior antes de migrarem, retornando ao intestino médio abdominal, depois chegando ao intestino médio torácico. Este tipo de desenvolvimento é chamado de peripilárico (LAINSON & SHAW, 1979).

As fêmeas de flebotomíneos necessitam ingerir certa quantidade de sangue para completar seu ciclo gonotrófico. O modo de picar deste inseto é conhecido como telmatofágico. Nos insetos que fazem este tipo de repasto sanguíneo as peças bucais são relativamente curtas e rígidas. Quando estas penetram na pele do hospedeiro, dilaceram-na, cortando os tecidos, incluindo os vasos sanguíneos ali presentes. Desta forma, as fêmeas de flebotomíneos podem se infectar ingerindo formas amastigotas que se encontram livres ou dentro de macrófagos infectados presentes na pele, juntamente com restos celulares e sangue que extravasa dos capilares, vênulas e arteríolas lesados pela picada.

O desenvolvimento de *Leishmania* sp. no tubo digestivo dos flebotomíneos é complexo e ainda não está completamente esclarecido. Sabe-se que o protozoário passa por diversas mudanças morfológicas e fisiológicas, até se diferenciarem, em parte, em formas infectantes para o hospedeiro mamífero, denominadas promastigotas metacíclicas (KILLICK-KENDRICK, 1979; LAINSON &

SHAW, 1988; BATES, 1994; LEHANE, 1997; PIMENTA et al., 1997; TERRA, 2001; ROGERS et al., 2002; BATES & ROGERS, 2004).

As formas promastigotas metacíclicas, não se multiplicam e não se ligam ao epitélio do tubo digestivo dos insetos (KILLICK-KENDRICK, 1990; KILLICK-KENDRICK & RIOUX, 1991). Durante um novo repasto sangüíneo, essas formas podem ser transmitidas a um hospedeiro mamífero susceptível. A transmissão dependerá, principalmente, do número de formas metacíclicas presentes nas regiões mais próximas às peças bucais (faringe e cibário), no momento do repasto sangüíneo.

As formas infectantes são inoculadas na pele do hospedeiro mamífero e são internalizadas por células fagocitárias, principalmente macrófagos, processo este, mediado por receptores (DE ALMEIDA, 2003). Após se transformarem em amastigotas, resistentes à ação das enzimas lisossomais, residem e se multiplicam no interior dos fagolisossomas. A intensa multiplicação dos parasitos dentro dos macrófagos favorece o rompimento da membrana celular e a liberação dos parasitos, os quais infectam rapidamente outros macrófagos, protegendo-se da ação do complemento e de anticorpos, podendo iniciar nova fase de multiplicação.

1.3 A LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que se encontra amplamente distribuída no mundo, afetando 65 países (DESJEUX, 2004) sendo que, 90% dos casos registrados ocorrem em áreas rurais e suburbanas de 5 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo 90% dos casos registrados no Brasil, principalmente na região Nordeste. A ocorrência da LV em uma determinada área depende

basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível (GONTIJO & MELO, 2004).

Como agentes etiológicos da leishmaniose visceral são conhecidas três espécies pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAINSON & SHAW, 1987), que agrupa *Leishmania (L.) donovani* (LAVERAN & MESNIL, 1903), que é agente causador de uma antroponose na Índia e em algumas regiões da África, onde o homem é o único hospedeiro mamífero encontrado infectado, sendo portanto o único reservatório; *L. (L.) infantum* (NICOLE, 1908) encontrada em parte do continente asiático, africano e europeu, sendo agente etiológico de uma zoonose de canídeos silvestres, tendo o cão como reservatório doméstico do protozoário; e *L. (L.) chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937), que é agente causador de uma zoonose no Novo Mundo, de forma semelhante a *L. (L.) infantum*.

Na LV os parasitos possuem um tropismo tecidual, estabelecendo-se primariamente em células do sistema mononuclear fagocitário de órgãos viscerais como baço, fígado, medula óssea e gânglios. A lesão primária na pele é raramente observada, e uma percentagem grande de infecções parecem ser assintomáticas ou auto-resolutivas (JAFFE & GREENBLATT, 1991; MORENO et al., 2006). Na doença ativa, a letalidade é alta, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e em indivíduos com infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana). As estimativas mundiais indicam que cerca de 200 milhões de pessoas encontram-se sob o risco de adquirir leishmaniose visceral e que 500 mil pessoas se infectam a cada ano (WHO, 2003).

1.3.1 LEISHMANIOSE VISCERAL POR *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania (Leishmania) infantum*

O primeiro caso de Leishmaniose Visceral (LV), provavelmente, adquirido no Brasil, foi notificado por Migone (1913) em um paciente proveniente do Mato Grosso e diagnosticado no Paraguai. Em 1934, formas amastigotas foram identificadas em lâminas preparadas a partir de fragmentos de fígado de pacientes que morreram com suspeita de febre amarela, em vários estados do Nordeste e no Pará (PENNA, 1934). Mais tarde, o agente etiológico foi denominado *Leishmania chagasi* por Cunha & Chagas em 1937.

No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos registrados ocorrem em crianças menores de 10 anos. Em alguns focos urbanos estudados existe uma tendência de modificação dos casos, por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também em adultos (SILVA et al., 2001a).

O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em grandes centros urbanos. Considerada, até bem recentemente, como epidemia focal de áreas rurais e pobres do Brasil, a LV apresenta-se em clara expansão para outras regiões rurais indenes e para a periferia de importantes centros urbanos, com taxas de letalidade que chegam a 10%, quando não se institui tratamento adequado (BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

No Brasil, nos últimos 20 anos, as estatísticas oficiais têm registrado progressivo aumento no número de casos da doença, com surtos descritos nas regiões Nordeste, Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul configurando ampla endemicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; KRAUSPENHARI et al. 2007).

A doença é conhecida como Leishmaniose Visceral Americana (LVA) e tem sido assinalada em 20 das 27 unidades da federação, com nítida expansão geográfica e crescente número de casos, resultado de fatores como urbanização acelerada e alterações do meio ambiente (BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; KRAUSPENHARI et al. 2007). A região Nordeste concentrou, na década de 1990-2000, quase 90% dos casos do Brasil. Atualmente esta participação tem diminuído, chegando a 55% seguida pela região Sudeste (21%) e Norte (15,9%) (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A cada ano são notificados cerca de 3500 casos, geralmente, associados à pobreza e à desnutrição infantil (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006). O aumento do número de casos, em outras regiões, tem limitado a queda nas taxas nacionais (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O fenômeno da urbanização da LVA, no Brasil, foi observado pela primeira vez por Deane (1956), porém, a partir das últimas décadas tem sido descrita sua ocorrência em cidades de médio e grande portes (FRANÇA-SILVA et al., 2003). As epidemias ocorridas em Teresina, São Luiz e Belo Horizonte (SILVA et al., 2001b), pelas suas magnitudes, despertaram os órgãos responsáveis pela Saúde Pública para o problema do controle em larga escala.

Duas espécies vetoras até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença no Brasil: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (relevante apenas no estado do Mato Grosso do Sul). A primeira espécie é considerada a principal espécie vetora no Brasil, encontrada em 4 das 5 regiões do país. Nas regiões Norte e Nordeste, *L. longipalpis* era encontrada originalmente nas matas participando do ciclo primário de transmissão da doença. Ao final da década de 80, verificou-se a adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, nas periferias dos grandes centros,

principalmente na Região Sudeste, podendo ser encontrado no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes, e também no intradomicílio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Apesar das medidas de controle, implementadas pelos responsáveis pela Saúde Pública no país, contra a leishmaniose visceral, entramos no século XXI com um aumento do número de casos humanos e caninos e crescente urbanização da doença.

Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, ilustra claramente o processo de urbanização da LV nas cidades brasileiras. Desde 1993, a cidade convive com a leishmaniose visceral, que foi introduzida a partir do município vizinho – Sabará (PROFETA et al., 2001). A proximidade entre as habitações, a alta densidade populacional, a grande susceptibilidade da população à infecção e a adaptação do vetor às moradias urbanas, contribuíram para a rápida expansão da doença no ambiente urbano. De fato, na Região Metropolitana de Belo Horizonte, o percentual de municípios com notificação elevou-se de 6 no biênio 94/95 para 15 no biênio 98/99 (PROFETA et al., 2001).

O Ministério da Saúde registrou no ano de 2006, 359 casos humanos de LV em Minas Gerais, sendo 113 na região metropolitana de Belo Horizonte, com 10 óbitos. No mesmo período foram registrados 8000 casos de leishmaniose visceral canina. Até setembro/2007 já foram registrados 57 casos humanos da doença na Região Metropolitana de Belo Horizonte, com 5 óbitos e o número de cães positivos foi de 9941 (PREFEITURA DE BELO HORIZONTE/SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2007).

Em relação aos reservatórios, o protozoário é encontrado em diversos animais silvestres, quase sempre canídeos como raposas, e roedores. O cão

apresenta-se como importante reservatório doméstico do parasito, sendo que neste animal o período de incubação pode ser de meses a anos.

No Brasil o primeiro caso de LV em cães foi relatado no Ceará por Chagas et al. (1938). Mais tarde Deane (1956) nos seus estudos pioneiros, no Ceará, confirmou o papel do cão como reservatório peridomiciliar, onde constitui a principal fonte de infecção para os flebotomíneos.

A apresentação clínica da LV canina é consequência de interações complexas entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro (SANTOS-GOMES et al., 2002). A doença no cão é de evolução lenta e início insidioso. É uma doença sistêmica, cujas manifestações clínicas são intrinsecamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado.

Inicialmente os parasitos estão presentes no local da picada, posteriormente, ocorre a infecção das vísceras e então se tornam distribuídos através da derme. A alopecia causada pela infecção expõe grandes áreas da pele extensamente parasitada.

Os sinais podem ser variados e particulares para cada cão doente, desde aparente estado sadio, até grave estado terminal (CIARAMELLA et al., 1997). Diante desta grande gama de apresentações clínicas, os cães são classificados em: assintomáticos, aqueles que não apresentam sinais clínicos; oligossintomáticos, aqueles nos quais observa-se perda de peso moderada, lesões de pele discretas e linfadenopatia e, finalmente, os cães sintomáticos que são os que apresentam vários sinais graves da doença, como dermatopatias (perda de pêlos, dermatite furfurácea e úlceras), onicogrifose, ceratoconjuntivite e rigidez dos membros posteriores (MANCIANTI et al., 1988). Ainda segundo estes autores, cerca de 60% de uma população canina infectada apresenta sinais evidentes, sendo o restante,

em sua maioria, casos pré-patentes, cuja infecção pode ou não, evoluir para a fase patente. Pode-se considerar que as formas progressivas de curso crônico e com implicações viscerocutâneas são as mais frequentes.

Na área do Mediterrâneo, as grandes mudanças térmicas entre as massas de ar marítimas e terrestres, têm feito dessa área uma zona extraordinariamente bioclimática. Em diferentes partes dessa região os flebotomíneos vetores aparecem ocupando nichos úmidos, sub-úmidos e semi-áridos nos quais os focos de LV canina têm se desenvolvido progressivamente. O protozoário é encontrado em alguns reservatórios silvestres tais como lobos, raposas, chacais e roedores, sendo que o cão apresenta-se como importante reservatório doméstico, à semelhança da LV que ocorre no Novo Mundo. Na Europa, *L. infantum* é o agente causador das formas: cutânea, visceral e viscerocutânea canina.

Em 1910 foi notificado o primeiro caso de LV em Lisboa, Portugal. A doença é esporádica em vários pontos do país, contudo, são registrados três focos ativos: Alto Douro, que tem uma prevalência de LV canina de 37,8% e 80% dos casos humanos do país, a área metropolitana de Lisboa e a Região de Algarve (DEREURE et al., 1999).

Os casos humanos de LV na bacia do Mediterrâneo estão intimamente associados à co-infecção pelo HIV, bem como a usuários de drogas endovenosas (CAMPINO et al., 2006). Espanha, Itália, França e Portugal concentram 90% dos casos da região sendo que nestes países de 25-70% dos casos de LV são associados com HIV, indicando que a infecção pelo HIV é um fator de risco associado a LV (CRUZ et al., 2006). Dados acumulados ao longo dos anos, em estudos com pacientes HIV positivos, co-infectados com *Leishmania*, têm sugerido uma nova alternativa de ciclo de vida para *L. infantum*, diferente dos ciclos já

conhecidos. Neste caso, o uso da seringa seria a principal forma de infecção entre os usuários de drogas, co-infectados. Este ciclo antroponótico, seria completamente independente do ciclo em que se observa a participação de cães como reservatórios do protozoário (MOLINA et al., 1999).

São nove as espécies vetoras encontradas no Mediterrâneo sendo as mais importantes *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi*. São também citadas como espécies vetoras *P. perfiliewi*, *P. neglectus* e *P. langeroni* (DEREURE et al., 1999).

A sintomatologia observada nos casos humanos e caninos da doença causada por *L. infantum* é muito similar àquela observada em homens e cães infectados por *L. chagasi*.

O diagnóstico da doença causada por ambos parasitos é clínico-epidemiológico, parasitológico, imunológico e pelo uso de técnicas de biologia molecular, de modo semelhante, para ambas as espécies.

Apesar de inúmeros estudos sobre as doenças causadas por estes parasitos, a epidemiologia dos vários focos humanos é, ainda hoje, pobremente conhecida para uma doença da importância e impacto médicos como a leishmaniose visceral, não só quanto à sua ecologia, mas com opiniões discordantes quanto ao *status* taxonômico de alguns destes parasitos.

1.4 IDENTIDADE DO AGENTE ETIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO NOVO MUNDO

A inclusão de *L. chagasi* no complexo *L.(L.) donovani* é amplamente aceita, ainda que sua afinidade taxonômica e origem sejam uma questão polêmica (SHAW, 1994).

Existem controvérsias se o agente etiológico da LVA foi recentemente introduzido no Novo Mundo à época da colonização europeia - e neste caso deveria ser classificado como *L. infantum* - ou se ele teria uma origem antiga, tendo sido introduzido juntamente com os canídeos na América do Sul há vários milhões de anos e deveria ser classificado como *L. chagasi*.

Há várias hipóteses relacionadas com a origem de *L. chagasi*. Em 1979, Lainson & Shaw sugeriram que a leishmaniose visceral da América pudesse ser causada por ambos parasitos *L. chagasi* e *L. infantum*. Lainson et al. (1987) e Lainson (1989) propuseram que mesmo com as grandes semelhanças observadas entre os agentes causadores de LV no Velho e Novo Mundo, *L. chagasi* já existiria muito antes da colonização, uma vez que foram observadas diferenças nos perfis de restrição de kDNA e nas proteínas de superfície de suas promastigotas. Killick-Kendrick et al. (1980) e Rioux et al. (1990), baseados na semelhança entre os perfis enzimáticos de *L. chagasi* e *L. infantum* e no papel do cão como importante amplificador da doença, sugeriram que os parasitos podem ter sido trazidos por cães infectados que acompanhavam os conquistadores portugueses e espanhóis. Nesse caso, a importação deveria ter ocorrido por um longo período, permitindo assim uma seleção de populações do parasito e sua sobrevivência no novo hospedeiro invertebrado (LAINSON & RANGEL, 2005). Outro fato a se considerar é a grande distribuição geográfica da LVA em tão curto espaço de tempo, e ainda, a natureza predominantemente benigna da infecção natural na raposa *Cerdocyon thous*, um canídeo originário da Amazônia, fato que indicaria uma relação antiga parasito-hospedeiro, sugerindo que essa infecção já existia e que foi sendo repassada aos cães, que por serem hospedeiros não adaptados, desenvolveram a doença. Soma-se a esse fato relatos de isolamento do parasito em raposas de regiões não

habitadas, o que faz pensar que o parasito não foi trazido por cães ou humanos, mas já infectavam esses animais (LAINSON & RANGEL, 2003). Lainson e Rangel (2003) e Lainson e Rangel (2005) baseados em diferenças observadas nas técnicas de RFLP e kDNA (JACKSON et al., 1982, 1984) têm usado a nomenclatura *L. L. infantum infantum* e *L. L. infantum chagasi*, sugerindo que a separação taxonômica dos parasitos poderia ser ao nível subespecífico. Por outro lado, Dantas-Torres (2006) acredita que *L. chagasi* e *L. infantum* devem ser consideradas espécies sinônimas, sem que haja mudança no nome ao nível de subespécie, pois isso implicaria em toda uma re-classificação do gênero *Leishmania*. Contudo, segundo Shaw (2006), de acordo com o código da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, os nomes *L. L. infantum infantum* e *L. L. infantum chagasi* seriam absolutamente corretos.

Por outro lado, as técnicas bioquímicas (perfil de isoenzimas), sorológicas (uso de anticorpos monoclonais), e técnicas de biologia molecular têm mostrado que *L. chagasi* e *L. infantum* são muito semelhantes, e que por esta razão alguns autores acreditam que os parasitos constituem uma única espécie com origem recente nas Américas (KILLICK-KENDRICK, 1985; GRIMALDI JR. et al., 1987; RIOUX et al., 1990; MAURÍCIO et al., 2000).

Reforçando essa hipótese, destaca-se ainda que *L. infantum* e *L. chagasi* possuem algumas características em comum, tais como a existência para ambas de canídeos como reservatórios silvestres e domésticos, a prevalência maior da doença em crianças, e, finalmente, a semelhança da doença observada no homem e no cão, do Velho e Novo Mundos.

Alguns estudos têm sido realizados visando a caracterização dos parasitos pertencentes a espécie *L. chagasi* isolados em áreas endêmicas, entretanto nenhum

deles utiliza uma abordagem mais ampla, agrupando os dados de um maior número de amostras isoladas de casos caninos e humanos, em comparação com *L. infantum*.

Atualmente, a disponibilidade de metodologias de análise genética possibilita a obtenção de informações úteis para se estudar a influência da variabilidade genética sobre fatores epidemiologicamente importantes como a infecciosidade, virulência, patogenicidade, imunogenicidade e suscetibilidade à ação de quimioterápicos entre populações de parasitos dentro e entre espécies. Todavia, devido a possíveis influências dos hospedeiros e de fatores ambientais nestas características, é difícil afirmar se estas variabilidades refletem diferenças genotípicas entre tais parasitos.

A utilização de metodologias moleculares permitiram o desenvolvimento de novas abordagens e determinação de correlações filogenéticas existentes entre as espécies e dentro de cada uma delas. Inicialmente, a utilização de enzimas de restrição permitiu a análise de polimorfismo por tamanho de fragmentos de restrição de DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP). A descoberta do processo de amplificação do DNA *in vitro* utilizando uma DNA polimerase – Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI et al., 1988) levou ao surgimento de outras classes de marcadores moleculares. Aliadas às técnicas de clonagem e seqüenciamento de DNA, estas metodologias têm possibilitado um rápido acúmulo de informações sobre a estrutura de genomas eucariotos, incluindo aquele de *Leishmania*.

Trabalhos realizados com as espécies do complexo *L. donovani*, não mostram distinção de *L. infantum* e *L. chagasi*, utilizando-se técnicas de análises genética e fenética. Entretanto, grande parte dos dados disponíveis na literatura sobre a

variabilidade genética de *L. chagasi* em comparação com *L. infantum* foi gerada através da análise de isoenzimas (CUPOLILLO et al., 1984; MOMEN et al., 1987) empregando amostras isoladas no Brasil e poucas amostras da área do Mediterrâneo. Maurício et al. (1999) e Maurício et al. (2000) estudando as relações genotípicas dentro do complexo *L. donovani* através de RAPD, seqüenciamento parcial do gene da gp63, RFLP-PCR e amplificação ITG da gp63 mostraram que *L. chagasi* e *L. infantum* são geneticamente indistinguíveis e formam um grupo monofilético dentro do complexo, o que segundo os autores, sugere a introdução recente de *L. chagasi* no Novo Mundo.

Nenhum dos estudos até agora realizados utilizou um número significativo de amostras de *L. chagasi* com poucas passagens *in vitro* e com uma história clínica bem conhecida e documentada, em comparação com *L. infantum*. É sabido que amostras com incontáveis passagens *in vitro* e que circulam entre vários laboratórios, devido principalmente a problemas de seleção, de adaptação e mesmo contaminação, podem não ser verdadeiramente representativas dos parasitos que circulam em alguns ciclos de transmissão (GRIMALDI et al., 1982).

As técnicas moleculares fornecem um método objetivo de determinar similaridades entre parasitos. Estudos de evolução molecular tem mostrado que quando populações são geograficamente separadas, seus genomas começam a divergir. A taxa exata de evolução genômica de *Leishmania* não é conhecida. Entretanto, se *L. chagasi* é autóctone e de origem antiga no continente americano, era de se esperar que os isolados deste parasito apresentassem ambos, diversidade genética, como refletido em alelos polimórficos, e divergência genômica de *L. infantum*.

1.5 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS COMO CRITÉRIOS TAXONÔMICOS DE *Leishmania*

Leishmania é provavelmente o gênero de protozoário que contém o maior número de espécies patogênicas para o homem. Esse fato tem despertado um grande interesse dos taxonomistas em desenvolver e utilizar métodos de tipificação que sejam capazes de identificar diferentes espécies e até mesmo cepas dentro das espécies.

Com o grande avanço das técnicas de biologia molecular, novas metodologias estão sendo aplicadas nos estudos de genética e epidemiologia molecular, na tentativa de melhor caracterizar os parasitos deste gênero. A introdução destas técnicas na rotina dos laboratórios de pesquisa, tem contribuído de forma significativa para o conhecimento de características intrínsecas de *Leishmania* que não são modificadas ou influenciadas por fatores dos hospedeiros e do meio ambiente.

Dentro desse contexto foram desenvolvidas abordagens baseadas em critérios bioquímicos/moleculares e imunológicos que incluem: análise de fator de excreção (SCHNUR, 1982); eletroforese de isoenzimas (KREUTZER et al.; 1987; RIOUX et al.; 1990; THOMAZ-SOCCOL et al.; 1993; CUPOLILLO et al.; 1994); análise de carboidratos de superfície por aglutinação com lectinas (SCHOTELIUS, 1982; SCHOTELIUS & GONÇALVES, 1982); análise da composição lipídica (HOLTZ & BEACH, 1982); reatividade de anticorpos monoclonais com antígenos espécie-específico do parasito (McMAHON-PRATT & DAVID, 1981; McMAHON-PRATT et al.; 1986; SHAW et al.; 1986; GRIMALDI et al., 1987; GRIMALDI & McMAHON-PRATT, 1996); análise da densidade de flutuação do DNA do cinetoplasto e do núcleo (CHANCE et al., 1973, 1977); análise do perfil de restrição do kDNA

(BARKER et al., 1982; LOPES et al., 1984; PACHECO et al., 1986); hibridização com sondas moleculares espécie-específica (WIRTH & McMAHON-PRATT, 1982; JACKSON et al., 1984; BARKER et al., 1986a; GUIZANI et al., 1994); cariotipagem molecular (RIOUX, 1986; PAGÈS et al., 1989; TAVARES et al., 1992); análise de diferentes regiões do genoma, por seqüenciamento ou polimorfismo gerado por enzimas de restrição – RFLP (BERVELEY et al., 1987; GUEVARA et al., 1992; FERNANDES et al., 1994; MENDOZA-LEON et al., 1995); polimorfismo pela amplificação aleatória de DNA polimórfico – RAPD (BHATTACHARYA et al., 1993; TIBAYRENC et al., 1993; GOMES et al., 1995) e reação em cadeia da polimerase de baixo rigor – Low-Stringency Single Specific Primer – PCR (LSSP – PCR) (PENA et al., 1994).

1.5.1 ANÁLISE DE ISOENZIMAS

A análise de polimorfismos presentes em isoenzimas metabólicas constitui uma das primeiras metodologias a ser utilizada, e universalmente aceita como um método padrão para caracterizar e identificar *Leishmania*. 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, há uma variabilidade significativamente menor, ou até mesmo não detectável (AL-TAQI & EVANS, 1978; ALJEBOORI & EVANS, 1980; BRAZIL, 1978; MILES et al., 1980; LAINSON et al., 1981; PETERS et al., 1981; SCHNUR et al., 1981; KREUTZER et al., 1987; MOMEN et al., 1987).

Apesar dos padrões isoenzimáticos representarem uma variação fenotípica, a sua utilização em estudos de genética de populações baseia-se na premissa de que eles refletem diretamente a variabilidade dos genes envolvidos na síntese das enzimas. Há, entretanto, contradições dentro desta visão consensual. O mesmo genótipo pode apresentar mudanças drásticas no padrão de zimodema de acordo com pressões ambientais, como por exemplo, a variação no meio de cultivo do parasito. Variações isoenzimáticas podem ser vistas entre formas evolutivas de *Leishmania*, ou em uma única cepa do parasito mantida sob diferentes condições de cultivo (GRIMALDI et al., 1982). Outros trabalhos têm demonstrado uma importante correlação entre resultados obtidos pelo uso de marcadores isoenzimáticos, com outros marcadores moleculares, fazendo com que a hipótese de plasticidade fenotípica resultante, por exemplo, de variações ambientais seja enfraquecida (TIBAYRENC, 1995).

De um modo geral, a técnica é considerada bastante sensível e possui conveniência de que cada variante enzimática seja considerada na prática como um genótipo e cada eletromorfo (banda eletroforética) como um alelo. Porém, dois organismos não podem ser considerados idênticos apenas por possuírem a mesma migração para uma ou duas enzimas. Interpretações incorretas são evitadas aumentando-se o número de enzimas estudadas, portanto, o número de caracteres observados (ROMANHA, 1982).

A semelhança entre *L. chagasi* e *L. infantum* é baseada em grande parte nos dados disponíveis na literatura sobre a variabilidade genética interespecífica gerada através da análise de isoenzimas (CUPOLILLO et al., 1984; MOMEN et al., 1987; TOLEDO et al., 2002). Em *L. infantum* há um considerável polimorfismo enzimático com pelo menos 29 zimodemas, dos quais 25 são encontrados em humanos

(CHICHARRO et al., 2002; MARTIN-SANCHEZ, 2004), com uma distribuição geográfica heterogênea através da Bacia do Mediterrâneo. O zimodema MON 1 é o mais comumente encontrado no homem e no cão, e alguns autores têm mostrado um alto grau de variabilidade genética dentro deste zimodema (DESJEUX, 1991; BAÑULS et al., 1999; GALLEGO et al., 2001; BULLE et al., 2002; PRATLONG et al., 2004).

Em relação a *L. chagasi* isolada no Brasil, Momen et al. (1993) estudando mais de 100 amostras isoladas de diferentes áreas e de diferentes hospedeiros, utilizando 18 locos enzimáticos, observou o mesmo perfil isoenzimático, o qual foi idêntico ao da amostra de referência da WHO de *L. infantum* MHOM/TN/80/IPT1, isolada na Europa. Apesar de incluir um número grande de amostras originárias da América, o estudo incluía apenas uma cepa de referência isolada na Tunísia há mais de 20 anos.

1.5.2 MARCADORES BASEADOS NA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE - PCR

O advento da tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) em meados da década de 80 representou um importante marco para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer ser vivo.

Com a possibilidade de realização automatizada da reação (SAIKI et al., 1985) diversas técnicas baseadas na PCR foram descritas. Essas técnicas têm possibilitado mostrar diversidade genética dentro de populações e têm permitido uma melhor definição das relações filogenéticas dentro das espécies (GOMES et al., 1995; CHICHARRO et al., 2002; TOLEDO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002).

1.5.2.1 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO – RAPD

As estratégias de amplificação aleatória como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990), AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) (WELLSH & MCCLELLAND, 1990) e DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) (CAETANO ANOLES et al., 1991) utilizam oligonucleotídeos aleatórios para reconhecer sítios específicos, porém desconhecidos no genoma, muitos dos quais são polimórficos. O que diferencia estas técnicas é basicamente o tamanho dos iniciadores, o rigor de amplificação e o procedimento usado para avaliação dos perfis de amplificação. Essas estratégias são baseadas na amplificação de numerosos locos aleatórios de DNA, quando iniciadores de seqüências arbitrárias suficientemente curtas são usados.

O RAPD, assim como a análise de isoenzimas 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 a análise de zimodemas e pode ser usado para complementá-la e para refinar o quadro da diversidade genética dentro de cada subdivisão de uma espécie (TIBAYRENC, 1995).

Alguns pesquisadores têm empregado a técnica de RAPD para identificar polimorfismo genético inter e intra-específico em parasitos do gênero *Leishmania* (POGUE et al., 1995; NOYES et al., 1996).

Em trabalho anterior desenvolvido no Laboratório de Biologia de *Leishmania* – ICB/UFMG foi mostrado que o RAPD ao lado da “impressão digital de DNA” (*fingerprinting*), poderiam constituir importantes ferramentas para estudos filogenéticos e taxonômicos para *Leishmania*. Por exemplo, foram detectadas diferenças quanto ao grau de heterogeneidade, aparentemente correlacionadas com

aspectos eco-epidemiológicos, entre cepas distintas de *L. braziliensis* isoladas em diferentes regiões do Brasil (GOMES et al., 1995).

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.

Em relação às espécies do complexo *L. donovani* alguns estudos já foram realizados com as duas espécies do Velho Mundo, *L. donovani* (MAURÍCIO et al., 1999) e *L. infantum* (DIAKOU & DOVAS, 2001; HANAFI et al., 2001; HIDE et al., 2001; TOLEDO et al., 2002; CHICHARRO et al., 2002; ZEMANOVÁ et al., 2004; BOTILDE et al., 2006). Entretanto, são poucos os trabalhos que comparam cepas de *L. chagasi* com *L. infantum* (MAURÍCIO et al., 2000; HIDE et al., 2001).

1.5.2.2 PCR ANCORADA A REPETIÇÕES DE SEQÜÊNCIAS SIMPLES - SSR-PCR

Os genomas eucariotos são densamente povoados de seqüências repetidas, sendo algumas mais complexas (minisatélites) e outras mais simples (microsatélites) (HAMADA et al., 1982; TAUTZ & RENZ, 1984). Os microsatélites 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 microsatélites ou SSR - seqüências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*) que são seqüências de DNA que possuem unidade de repetição pequena, de no máximo 6pb, e comprimento total que geralmente não excede 200pb. A distribuição ampla e aleatória dos SSR, associada à sua utilização via PCR, permite “a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto”

(FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), sendo considerados marcadores úteis para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações.

Microssatélites já foram descritos em *Leishmania* (ROSSI et al., 1994). Estes autores identificaram 3 tipos de seqüências 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.

Apesar de já terem sido descritos microssatélites contendo todas as combinações de nucleotídeos, as repetições (CA)_n, em particular, são especialmente abundantes em todos os eucariotos, com um número de cópias estimado de 50.000 a 100.000 elementos por genoma haplóide (STALLINGS et al., 1991).

Zietkiewicz et al. (1994), desenharam iniciadores complementares a estas regiões, inserindo uma âncora purina-pirimidina na extremidade 5' ou 3' do iniciador, o que reduziu o número de possíveis alvos de anelamento dos iniciadores e, conseqüentemente, aumentou a especificidade da reação, impedindo o anelamento do iniciador dentro da própria repetição, sendo assim estudado o polimorfismo inter microssatélites. Esses autores denominaram essa técnica de SSR-PCR e obtiveram excelentes resultados, em vários organismos, quando utilizaram o iniciador (CA)₈RY ancorado na extremidade 3', em condições de alta estringência. Com isso, os

polimorfismos observados devem-se a variações, como inserções e deleções, nessas regiões.

Oliveira et al. (1997) modificaram a técnica de SSR-PCR com a utilização do iniciador (CA)₈RY sem marcação radioativa. Os autores utilizaram essa técnica no estudo da variabilidade intra-específica de *L. braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni* e demonstraram que os padrões obtidos foram comparáveis aos da AP-PCR, com a vantagem do aumento da reprodutibilidade dos padrões, em decorrência da utilização de condições de alta estringência, eliminando o aparecimento de falsas bandas. 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 polimorfismos genéticos semelhantes para ambas as técnicas.

A amplificação do DNA utilizando o segmento com as repetições inter-microsatélites foi empregada no laboratório de Biologia de *Leishmania* (ICB/UFMG) para estudos com diferentes espécies de *Leishmania* do Novo e do Velho Mundo (PIMENTA et al., 1997; 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) também empregaram a técnica de SSR-PCR para estudar espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose tegumentar no Novo Mundo. Ochsenreither et al. (2006) demonstraram que os locos que contém microsatélites na família Trypanosomatidae são estáveis em condições de laboratório e podem ser usados com segurança para demonstrar variabilidade genética intra-específica.

Alguns autores estudando cepas de *L. infantum* da área do Mediterrâneo observaram que há um alto polimorfismo entre as cepas e que microsatélites

podem ser utilizados com sucesso para caracterização de *L. infantum* que exibem diferentes características epidemiológicas (BULLE et al., 2002; BOTILDE et al., 2006; OCHSENREITHER et al., 2006).

Até onde nos foi possível procurar, não foram encontrados na literatura trabalhos que tenham utilizado a técnica de SSR-PCR no estudo de variabilidade genética de *L. chagasi* em comparação com *L. infantum*. Desta forma, espera-se que a SSR-PCR ofereça uma alternativa metodológica para o estudo de variabilidade genética dessas espécies.

1.5.2.3 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO - RFLP

A técnica de PCR-RFLP baseia-se na amplificação pela PCR de qualquer região do genoma e a subsequente digestão desse fragmento com diversas enzimas de restrição, que são capazes de reconhecer e clivar a fita dupla da molécula de DNA em sítios específicos. Alguns autores já utilizaram esta metodologia em estudos de variabilidade em *Leishmania*. Chicharro et al. (2002) num estudo de epidemiologia molecular de *L. infantum* de humanos e cães utilizaram a PCR-RFLP, com iniciadores que amplificavam regiões do minicírculo de kDNA do complexo *L. donovani*. Estes autores foram capazes de distinguir as cepas procedentes do ciclo artificialmente antroponótico, que ocorre via seringa entre usuários de droga, do ciclo zoonótico envolvendo cão/homem. Morales et al. (2001) e Morales et al. (2002) utilizando os mesmos iniciadores, discriminaram pela PCR-RFLP amostras de *L. infantum* que foram isoladas de pacientes co-infectados com HIV que apresentavam recidivas ou reinfecções. Cortes et al. (2006) utilizando a técnica de RFLP,

demonstraram a existência de heterogeneidade genética em amostras de *L. infantum* isoladas de diferentes hospedeiros de Portugal.

A maior parte dos autores que utilizaram esta metodologia para identificação molecular de espécies de *Leishmania* ou para estimar similaridade genética entre espécies, empregou iniciadores para os genes da gp63. Victoir et al. (1998) observaram um extenso polimorfismo entre as espécies do subgênero *Viannia* e concluíram que o PCR-RFLP apresenta uma importante vantagem operacional, por permitir caracterizar pequenas quantidades de DNA dos parasitos, empregando iniciadores específicos, e que existe uma alta plasticidade genética dos genes da gp63. Guerbouj et al. (2001) estudaram por RFLP o polimorfismo do gene gp63 e a estrutura populacional das espécies do complexo *L. donovani*.

Um estudo utilizando a técnica de RFLP-PCR para comparação de *L. infantum* e *L. chagasi* foi realizado por Maurício et al. (2001). Esses autores detectaram semelhança entre estas espécies, sugerindo que sejam consideradas uma única espécie, e que os resultados obtidos com a metodologia de RFLP correlacionam com aqueles observados na análise de isoenzimas.

1.5.2.4 LSSP-PCR

O método de Low-Stringency Single Specific Primer – PCR (LSSP-PCR) ou reação em cadeia da polimerase de baixo rigor, utilizando um único iniciador específico, é uma técnica que detecta variação na seqüência de DNA, sendo simples, rápida, muito sensível, além de informativa (PENA et al. 1994).

Na sua execução, fragmentos de DNA alvo previamente amplificados por PCR são submetidos a uma segunda amplificação sob condições de baixa estringência, utilizando-se ainda, concentrações elevadas de Taq DNA polimerase e

apenas um dos iniciadores, específico para uma das extremidades do fragmento analisado.

As condições prevalentes na reação favorecem a ligação específica do iniciador à sua seqüência complementar, também permitindo sua ligação inespecífica, seqüência dependente, a regiões diversas no interior do fragmento. Quando os produtos da reação são analisados eletroforeticamente, um *fingerprint* de fragmentos de DNA é obtido, o qual reflete a seqüência da região analisada (PENA et al., 1994; BARRETO et al., 1996).

O LSSP-PCR pode ser considerado como uma impressão digital de DNA, que focaliza os polimorfismos existentes em um único segmento gênico.

A LSSP-PCR tem sido empregada em abordagens distintas em estudos de variação de seqüência de DNA, e é tão sensível que pode detectar modificações em uma única base, fornecendo a “assinatura” do gene estudado e oferecendo uma alternativa ao seqüenciamento do fragmento analisado (PENA et al., 1994).

Esta metodologia foi utilizada por Vago et al. (1996) e Vago et al. (2000) para caracterizar *T. cruzi*, diretamente de tecidos infectados, pela análise da região variável do DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) deste parasito. Os autores traduziram o polimorfismo intraespecífico na seqüência de nucleotídeos do minicírculo de kDNA em uma “assinatura de kDNA” específica e altamente reprodutível. Os resultados indicaram que as assinaturas de kDNA obtidas pelo LSSP-PCR, sobretudo aquelas originadas de parasitos presentes em tecidos infectados, constituem uma nova ferramenta para o estudo da epidemiologia molecular da doença de Chagas.

A técnica foi também usada na análise de cepas *Entamoeba histolytica* isoladas do Brasil e foram observados dois grupos geneticamente distintos de

parasitos, correspondendo às cepas isoladas de pacientes sintomáticos e assintomáticos (GOMES et al., 1997), que provavelmente corresponde a *E. histolytica* e *E. dispar*.

Esta metodologia foi ainda utilizada, para confirmar se a mesma cepa de *L. braziliensis* era responsável pelas manifestações oculares e viscerais de leishmaniose, observada em um paciente transplantado renal (GONTIJO et al., 2002).

Assim, com base nas propriedades apresentadas pelo LSSP-PCR, julgamos ser essa técnica aplicável no estudo de variabilidade genética de *L. chagasi* e *L. infantum*.

1.5.3 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

A técnica de seqüenciamento tem sido aplicada e explorada em busca de maiores informações sobre a seqüência 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 Seqüenciamento do genoma deste parasito, o – *Leishmania Genome Network* (LGN), que visou o seqüenciamento do genoma da cepa de referência *Leishmania major* Friedlin (IVENS & BLACKWELL, 1999), comumente utilizada em estudos de seqüenciamento (MYLER et al., 2000). Em 2005, o genoma deste parasito foi completamente seqüenciado e toda a seqüência de DNA, assim como as proteínas preditas se tornaram disponíveis ao acesso público (IVENS et al., 2005).

O Projeto Genoma de *Leishmania* veio acumulando informações acerca da estrutura e organização genômica deste parasito e se concentra agora no seqüenciamento, 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 seqüências e estruturas do genoma e, mais recentemente, aqueles baseados na tônica funcional devem estar permeados pela preocupação com as particularidades genéticas desse organismo. A determinação de seqüências 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 seqüência do DNA de *Leishmania*, diversos estudos relacionados à análise da expressão gênica e proteômica se desenvolveram em torno desse parasito, muitos deles, focalizando principalmente a expressão diferencial nos diferentes estádios durante o ciclo de vida de *Leishmania* (SAXENA et al., 2003; AKOPYANTS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; COHEN-FREUE et al., 2007; LEIFSO et al., 2007; OUAHAD et al., 2007; SAXENA et al., 2007).

O seqüenciamento do genoma de *Leishmania* ampliou as estratégias de estudo com relação aos genes de virulência, sobrevivência intracelular e resistência à drogas, bem como a validação funcional de proteínas, específicas do parasito, como novos alvos para quimio e imunoterapia (CORTAZAR & WALKER, 2004).

Os fatores que influenciam a variabilidade clínica da leishmaniose visceral, não estão inteiramente elucidados, mas provavelmente a variação genética de ambos, hospedeiro e parasito é importante neste contexto.

Espera-se que os dados genéticos resultantes deste estudo, obtidos em diferentes níveis de resolução, possam contribuir para mostrar a variabilidade intra-específica e interespecífica destes parasitos.

Assim, a pesquisa de polimorfismos genéticos intraespecífico de *L. chagasi* e *L. infantum* pode potencialmente levar a um melhor entendimento da epidemiologia molecular da doença.

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

As leishmanioses são, em sua maioria, zoonoses que acometem, atualmente, milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, as leishmanioses apresentam-se em franca expansão geográfica, com um número crescente de casos.

A leishmaniose visceral, além de apresentar-se em processo de expansão geográfica para áreas indenes, encontra-se também em crescente urbanização. Na Região Metropolitana de Belo Horizonte, onde a incidência da doença humana e canina tem aumentado em vários municípios, a epidemiologia da LV tem sido estudada sob vários aspectos, tais como a avaliação de métodos diagnósticos para a infecção humana e canina, a caracterização bioquímica e molecular dos parasitos isolados e o levantamento da fauna de flebotomíneos.

Os fatores que influenciam a variabilidade clínica da leishmaniose visceral, não estão inteiramente elucidados, mas provavelmente as variações genéticas de ambos, hospedeiro e parasito são importantes neste contexto. Assim, a pesquisa de polimorfismos genéticos intra-específicos e interespecíficos de *L. chagasi* e *L. infantum* pode potencialmente levar a um melhor entendimento da epidemiologia molecular da doença.

Apesar de vários estudos realizados sobre a epidemiologia em diferentes focos no Brasil e pela importância e impacto médicos, a doença ainda é pobremente entendida em áreas urbanas, como Belo Horizonte. Assim, o presente estudo teve como objetivo a investigação de variabilidade genética entre amostras das duas espécies, isoladas no Brasil e na Europa, utilizando marcadores moleculares, bem como a discussão de suas possíveis implicações nos ciclos de transmissão envolvendo o homem e o cão.

Neste trabalho foram estudados marcadores genéticos em *L. chagasi* e *L. infantum*, na tentativa de verificar a ocorrência de diversidade genética inter e intra-específica, utilizando-se amostras isoladas, bem documentadas e criopreservadas nas primeiras passagens após isolamento.

Espera-se somar conhecimentos, para um melhor entendimento da complexa interação dos parasitos com os hospedeiros vertebrados no contexto urbano de transmissão e contribuir no esclarecimento da epidemiologia da doença com os dados genéticos obtidos em diferentes níveis de resolução.

OBJETIVOS

3 OBJETIVO

Estudar a variabilidade genética inter e intra-específica de *L. chagasi* e *L. infantum*, empregando-se amostras recém-isoladas de casos humanos e de reservatórios caninos, utilizando-se diferentes técnicas bioquímicas e de biologia molecular.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Analisar polimorfismos de DNA nuclear e/ou do cinetoplasto utilizando-se marcadores genéticos gerados por: RFLP, RAPD, SSR-PCR, LSSP-PCR e análise isoenzimática.

3.1.2 Determinar as relações fenéticas entre as amostras utilizando a taxonomia numérica.

3.1.3 Investigar a existência de correlação entre os marcadores encontrados e os zimodemas das amostras dentro das espécies *L. chagasi* e *L. infantum*, visando contribuir no esclarecimento da questão se tais espécies são sinônimas ou não.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS UTILIZADAS

Foram utilizadas amostras de *L. chagasi* isoladas de casos humanos e de reservatórios caninos provenientes da Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras de *L. infantum* do Velho Mundo foram originárias de casos humanos e de reservatórios caninos da Região do Alto Douro (Portugal).

O isolamento das amostras foi feito utilizando-se meio NNN (Novy, McNeal & Nicolle)/LIT, posteriormente foram transferidas para o meio α -MEM (Minimum Essential Medium; Gibco BRL - USA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino e armazenadas no Banco de cepas da Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa e dos Laboratórios de Biologia de *Leishmania* –ICB/UFMG e Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ – Belo Horizonte, MG.

Nos QUADROS 1 e 2 estão listadas as amostras escolhidas aleatoriamente para o presente estudo nos bancos de cepas de *Leishmania* da Unidade de Leishmanioses do Instituto de Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, Portugal; do Laboratório de Biologia de *Leishmania*, Departamento de Parasitologia – ICB/UFMG e Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ – Belo Horizonte, MG.

Todas as amostras foram isoladas durante a realização de projetos que foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa Humana e de Animais, nas Instituições de origem.

Amostras de casos humanos	Código internacional
BH 46	MHOM/BR/1970/BH 46
RR072	MHOM/BR/2001/RR072
RR055	MHOM/BR/1998/RR055
RR059	MHOM/BR/1996/RR059
RR071	MHOM/BR/2001/RR097
RR050	MHOM/BR/1996/RR050
RR053	MHOM/BR/1998/RR053
RR058	MHOM/BR/1996/RR058
RR057	MHOM/BR/1999/RR057
RR054	MHOM/BR/1998/RR054
Amostras de reservatórios caninos	Código internacional
RR070	MCAN/BR/2000/RR087
RR065	MCAN/BR/1996/RR065
BH401	MCAN/BR/2002/BH401
RR061	MCAN/BR/1996/RR061
RR069	MCAN/BR/1996/RR069
BH402	MCAN/BR/2002/BH402
BH403	MCAN/BR/2002/BH403
BH400	MCAN/BR/2002/BH400
BH406	MCAN/BR/2002/BH406
RR066	MCAN/BR/1996/RR066

QUADRO 1 – Amostras de *Leishmania chagasi* isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, armazenadas nos criobancos de *Leishmania* do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG e do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR/FIOCRUZ - MG.

Amostras de casos humanos	Código internacional
IMT 245	MHOM/PT/1998/IMT245
IMT 144	MHOM/PT/1998/IMT144
IMT 242	MHOM/PT/1998/IMT242
IMT 248	MHOM/PT/1999/IMT248
IMT 249	MHOM/PT/1999/IMT249
IMT 224	MHOM/PT/1996/IMT224
IMT 233	MHOM/PT/1997/IMT233
IMT 225	MHOM/PT/1997/IMT225
IMT 226	MHOM/PT/1997/IMT226
IMT 234	MHOM/PT/1997/IMT234
Amostras de reservatórios caninos	Código internacional
IMT 254	MCAN/PT/1998/IMT242
IMT 229	MCAN/PT/1997/IMT229
IMT 256	MCAN/PT/1999/IMT256
IMT 262	MCAN/PT/2000/IMT 262
IMT 339	MCAN/PT/2003/IMT339
IMT 321	MCAN/PT/2003/IMT321
IMT 322	MCAN/PT/2003/IMT322
IMT 326	MCAN/PT/2003/IMT326
IMT 319	MCAN/PT/2003/IMT319
IMT 320	MCAN/PT/2003/IMT320

QUADRO 2 – Amostras de *Leishmania infantum* isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, armazenadas no criobanco de *Leishmania* da Unidade de Leishmanioses, do Instituto de Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

4.2 AMOSTRAS DE REFERÊNCIA

Como padrões de referência foram utilizadas 05 amostras da Organização Mundial de Saúde (UNDP/WORLD BANK/WHO, 1990) e que são mantidas criopreservadas no Laboratório de Biologia de *Leishmania* (ICB/UFMG) – (QUADRO 3).

Amostras de referência	Código internacional
PH8 – <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	IFLA/BR/1968/PH8
M2903 - <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
PP75 - <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	MHOM/BR/1974/PP75
IPT1 - <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/TN/1980/IPT1
DD8 - <i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	MHOM/IN/1980/DD8

QUADRO 3 – Amostras de referência da Organização Mundial de Saúde utilizadas no estudo.

4.3 OBTENÇÃO DE MASSA DE PROMASTIGOTAS PARA UTILIZAÇÃO NAS TÉCNICAS MOLECULARES E NOS ESTUDOS ISOENZIMÁTICOS

Para obtenção do número suficiente de parasitos ($\cong 10^{10}$ parasitos), as amostras foram descongeladas e cultivadas em meio α -MEM (*Minimum Essential Medium*; Gibco BRL) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino estéril, acrescido de antibiótico (Penicilina 50U/mL), sob temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O número de parasitos foi expandido por meio de repiques sucessivos em Erlenmeyers de 25mL, 50mL e 125mL respectivamente. A massa de células foi obtida na fase exponencial de crescimento quando os parasitos foram contados em Câmara de Neubauer e então transferidos para tubos FALCON de 50mL. Parte das culturas foram utilizadas para estudos isoenzimáticos e outra parte para estudos moleculares.

Para as análises isoenzimáticas as culturas foram lavadas em Solução Tampão de Lavagem (STL – NaCl 0,85% adicionada de 0,01M de EDTA, pH 8,0) por duas vezes a 3.800g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 5mL da STL. Após a segunda lavagem, nas mesmas condições anteriores, o material foi então suspenso em 1,5mL da STL e transferido para tubos de criopreservação (NUNC 1,8mL). Foi feita uma nova lavagem conforme descrito anteriormente e então parte do sobrenadante foi desprezada sendo deixada apenas quantidade suficiente para cobrir o sedimento. Os tubos foram estocados em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização. Antes da última lavagem foi feita contagem do número de promastigotas para cada amostra utilizando-se Câmara de Neubauer. O número final de parasitos foi calculado de acordo com a fórmula Número de parasitos por mL = média aritmética de duas contagens X 10⁴ (fator de correção da câmara de Neubauer) x diluição utilizada.

4.4 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS EM GEL DE AGAROSE

O estudo isoenzimático das amostras foi realizado por eletroforese em gel de agarose, segundo técnica descrita por Momen & Salles (1985). Foram utilizados 10 sistemas enzimáticos:

1. ACON (1) Aconitato hidratase (Enzyme Commission Number 4.2.1.3)*
2. G6PDH (1) Glicose –6-fosfato-desidrogenase (E.C. 1.1.1.49)
3. GPI (2) Glicose-fosfato-isomerase (E.C. 5.3.1.9)
4. IDH (1) Isocitrato desidrogenase (E. C. 1.1.1.42)
5. MDH (1) Malato desidrogenase (E. C. 1.1.1.37)
6. ME (1) Enzima málica (E. C.1.1.1.40)
7. NH (2) Nucleotidase (E.C. 3.2.2.1)

8. PEP D (2) Peptidase (L. prolina) (E. C. 3.4.13.9)
9. PGM (2) Fosfo-gluco-mutase (E.C. 1.4.9.1)
10. 6PGD (2) 6-fosfo-glico-desidrogenase (E.C. 1.1.1.43)

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

O gel de agarose foi preparado na concentração de 1% em uma diluição de 1:1 de água destilada e tampão fosfato pH 8,0 (A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 1M; B: Na_2HPO_4 – 1M; Uso: 13,6mL da solução A e 186,4mL da solução B; ajustar o volume para 1000mL com água destilada) ou tampão maléico pH 7,4 (Tris 24,22g, Ácido maléico 10g, EDTA 0,74g, MgCl_2 0,19g, água destilada q. s. p. 2L) de acordo com a enzima a ser testada. Os mesmos tampões foram utilizados nas corridas eletroforéticas.

A agarose foi dissolvida aquecendo a solução tampão (fosfato ou maléico) juntamente com a água destilada, em microondas, durante 5 minutos à potência de 70W (média-alta). Aproximadamente 50mL do gel foi derramado, ainda quente sobre um filme de poliestireno (Filme Gelbond), o qual foi apoiado sobre uma base de vidro para garantir o espalhamento uniforme do material. Após a secagem natural, o gel estava pronto para o uso.

No momento do uso, a umidade dos géis foi absorvida utilizando-se papel de filtro Whatman nº 3. Sobre o gel foi colocada uma fita plástica contendo retângulos eqüidistantes e vazados, sobre os quais foram aplicadas as amostras. Inicialmente foi aplicada uma solução de corantes (Azul de bromofenol 34mg, Xilenocianol 28mg e Água 10mL) em dois retângulos do gel, para indicar a velocidade e o término da corrida eletroforética.

As amostras a serem testadas foram retiradas do nitrogênio líquido no momento do uso, descongeladas e homogeneizadas em VORTEX durante alguns segundos. Aproximadamente 10 μ L de cada amostra foram retirados e aplicados

diretamente em cada retângulo da fita. Estas amostras foram absorvidas pelo gel e quando se encontraram completamente secas, a fita plástica foi retirada. O gel foi então colocado em uma cuba de eletroforese horizontal (LKB modelo 2117) previamente umedecida com Triton 1% para evitar o colapamento do gel com a superfície da placa, ligada no sentido pólo negativo para o pólo positivo. A temperatura foi mantida em 10°C por um circulador de água refrigerada (LKB modelo 2219) e foi aplicada uma diferença de potencial de 40 volts para o tampão fosfato e de 60 volts para o tampão maléico, para permitir a migração. Após o término da corrida foi feita a revelação da atividade enzimática por meio de uma solução contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, co-fatores e tampões, próprios para cada enzima (ANEXO 1). As isoenzimas foram visualizadas no gel pela presença de um composto colorido, correspondendo ao receptor de elétrons na sua forma reduzida.

Os géis foram incubados em estufa (BOD modelo 347), a 37°C até a revelação das bandas. Assim que as bandas apareceram, a revelação foi interrompida adicionando-se sobre os géis ácido acético a 5%. Os mesmos 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 deixados a temperatura ambiente até a secagem completa para análise posterior.

4.5 ANÁLISE DOS GÉIS

Os eletromorfos (bandas que são visualizadas no gel) foram numerados de acordo com a sua mobilidade eletroforética. Aquele que se apresentou 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 construídas tabelas para a comparação dos eletromorfos das amostras em teste com os das amostras de referência.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ESTUDOS MOLECULARES

As amostras destinadas aos estudos moleculares foram cultivadas como descrito no item 4.3.

As células foram centrifugadas a 3.800g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em solução PBS estéril pH 7,2. As células foram lavadas por 3 vezes (3.800g, durante 10 minutos a 4°C) em solução PBS. A massa de células obtida foi estocada em freezer sob temperatura de -70°C, até o momento do uso.

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA

As células dos parasitos estocadas em freezer a -70°C foram descongeladas e após o descongelamento, 10⁸ parasitos foram suspensos em 0,1mL de solução de lise (SDS1% + NaCl 80mM + EDTA 45mM). Em cada tubo foi adicionado proteinase K na concentração de 50µg/mL e os mesmos foram incubados em banho-maria a 37°C *overnight*. Após esse período foi então adicionado igual volume de fenol/clorofórmio/álcool-isoamílico (24:24:1); os tubos foram delicadamente homogeneizados por 10 minutos e centrifugados por 5 minutos a 1.800g. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo tubo com auxílio de pipeta de transferência estéril. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez. Após o que foi acrescentado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram homogeneizados por 10 minutos e centrifugados a 1.800g

por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente coletado e colocado em um novo tubo. Foi feita a adição de 2 volumes de etanol 95% gelado. Os tubos foram incubados em gelo, por 10 minutos para precipitação do DNA. Após esse período, foi feita centrifugação por 10 minutos, em 8.000g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos em papel absorvente até a completa evaporação do etanol. O DNA foi suspenso em 50 a 200µL de Low TE (10mM Tris, 1mM EDTA; pH 8,0), dependendo da quantidade obtida, e estocado em geladeira a 4°C até a realização dos experimentos.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A concentração do DNA obtido foi determinada por comparação com o DNA do fago λ (DNA Quantification Standards, Phage λ DNA, Gibco-BRL) nas concentrações 15ng/6µL, 31ng/6µL, 63ng/6µL, 125ng/6µL, 250ng/6µL e 500ng/6µL.

O DNA estocado foi aquecido a 60-65°C por 10 minutos em banho maria e centrifugado brevemente. Os DNAs das amostras (1µL), juntamente com os padrões utilizados foram submetidos à eletroforese convencional em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (90mM Tris-borato; 2mM EDTA, pH 8,0), contendo 1% de brometo de etídeo (10mg/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 ultravioleta (540nm). 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 1ng/µL.

4.9 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNAs POLIMÓRFICOS – RAPDs

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

Em cada tubo contendo os reagentes sob a forma de pérola foram adicionados 24µL de água deionizada estéril e 6,4pmol do iniciador utilizado, correspondentes a 3µL. Depois de homogeneizada, a mistura foi distribuída igualmente em três tubos (9µL) onde foi então acrescentado 1µL de DNA (1ng/µL) perfazendo um volume final de 10µL para cada amostra.

Os programas de amplificação utilizados foram aqueles descritos por Gomes et al. (1995), os quais consistiram 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. Os iniciadores utilizados para as reações estão listados no QUADRO 4.

Iniciador	Seqüência	NT ^a	G+C	Referência
A07	5' GAAACGGGTG 3'	10	60%	WILKERSON et al. (1993)
B07	5' GGTGACGCAG 3'	10	70%	RUNCIMAN et al. (1999)
L15996	5' CTCCACCATTAGCACCCAAAGC 3'	22	55%	DIRIENZO et al. (1991)
M13-40 Forward	5'GTTTTCCCAGTCACGAC 3'	17	52%	HU; MESSING (1982)
M13-40 Reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	17	47%	HU; MESSING (1982)
P14	5' ACGACAGGGCTGGTTGCCCA 3'	20	65%	NIGRO et al. (1989)
QG1	5'CCATTAGCACCCAAAGC AGACCTCACCCCTGTGGAGC 3'	36	58%	GOMES et al. (1995)
λGT11	5' TTGACACCAGACCAACTGGTAATG 3'	24	46%	YOUNG & DAVIS (1983)
F-10	5' GGAAGCTTGG 3'	10	60%	HIDE et al. (2001)
R-15	5' GGACAACGAG 3'	10	60%	HIDE et al. (2001)
ILO-872	5' CCCGCCATCT 3'	10	70%	TOLEDO et al. (2002)
ILO-875	5' GTCCGTGAGC 3'	10	70%	TOLEDO et al. (2002)

^a Número de nucleotídeos

QUADRO 4 - Iniciadores aleatórios utilizados nas reações de RAPD-PCR.

4.10 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 7 horas, até que o corante xileno-cianol, utilizado como marcador de corrida no gel, tivesse percorrido 7cm. 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, foi incubado em solução contendo 0,17% de nitrato de prata, por 10 minutos, para a coloração. Logo após, foi realizada a revelação em solução contendo 3% de NaOH (p/v) e 0,3% de formaldeído 37% (v/v). Após coloração, os géis foram fotografados com filme KODAK 35mm 50 ISO/18 DIN, sob luz branca, com filtro azul e câmera NIKON FM2.

4.11 PCR ANCORADA A REPETIÇÕES DE SEQÜÊNCIAS SIMPLES (SSR-PCR)

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

- $(CA)_8RY$, que amplifica os segmentos inter-repetições CA ancoradas na porção 3' por uma purina R e uma pirimidina Y quaisquer. Amplifica os segmentos inter-repetições (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

- $CAA(CT)_6$, conhecido como "iniciador K7" (WU et al., 1994) ancorado na extremidade 5' e que amplifica tanto a região inter-repetições quanto às repetições.

Os protocolos utilizados foram aqueles descritos por Zietkiewicz et al. (1994) modificado por Oliveira et al. (1997) para o $(CA)_8RY$ e para o $CAA(CT)_6$. Os iniciadores utilizados estão detalhados no QUADRO 5.

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

^a Número de nucleotídeos

QUADRO 5 - Iniciadores utilizados nas reações de SSP-PCR.

Para as reações de SSR-PCR foi utilizado o KIT *Ready-to-go*TM *RAPD Analysis Beads* (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), 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 programas 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 6).

Ciclos de Amplificação		
Iniciador $(CA)_8RY$		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 6 - Ciclos de amplificação dos iniciadores utilizados na técnica SSR-PCR.

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

4.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ESPECÍFICA

A amplificação de DNA das cepas estudadas foi realizada em termociclador para PCR – MJ Research Warrertown, Mass USA, utilizando um par de iniciadores MC1/MC2 (CORTES et al., 2004), específico para *L. infantum* (QUADRO 7).

O par de iniciadores foi desenhado a partir do seqüenciamento de regiões dos minicírculos de kDNA.

Iniciador	Seqüência	NT ^a	Referência
MC1	5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3'	20	CORTES et al. (2004)
MC2	5' CACCCATTTTTCCGATTTTG 3'	20	CORTES et al. (2004)

^a Número de nucleotídeos

QUADRO 7 - Iniciadores utilizados nas reações de PCR específica.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se o Kit *PuReTaq Ready to go PCR Beads in a plate* (Amersham Biosciences), composto de reagentes sob a forma de pérolas liofilizadas, estáveis à temperatura ambiente.

Em cada tubo contendo os reagentes sob a forma de pérola foram adicionados 19 μ L de água deionizada estéril e 5pmoles dos iniciadores MC1 e MC2 correspondentes a 2 μ L de cada um. Depois de homogeneizado foram

acrescentados 2 μ L de DNA (1ng/ μ L) perfazendo um volume final de 25 μ L para cada amostra.

O programa de amplificação utilizado foi aquele descrito por Cortes et al. (2004), o qual consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos. No ciclo final, o passo de extensão foi estendido para 5 minutos a 72°C.

Para verificação da amplificação do fragmento de interesse (447pb), os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5%, não desnaturante, conforme descrito anteriormente. Foi realizada uma corrida de 100 volts por aproximadamente 5 horas, até que o corante xileno-cianol, utilizado como marcador de corrida no gel, tivesse percorrido 5cm. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados pela coloração com o nitrato de prata, conforme descrito anteriormente. Os produtos da PCR foram então purificados utilizando-se o Kit de purificação Wizard[®] PCR Preps – DNA purification System – Promega.

4.13 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO - RFLP

Para digestão do fragmento de 447pb do kDNA do parasito, foram utilizadas as seguintes endonucleases de restrição: *Vspl*, *Ddel*, *HpaII*, *BglII*, *RsaI* (QUADRO 8). As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ L, contendo 2 μ L do produto da PCR realizada como descrito no item 4.12, 1 μ L da enzima (10U) e 4 μ L do tampão correspondente, a 37°C por quatro horas, seguindo o protocolo do

fabricante. Os produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata.

Enzima	Sítio de Reconhecimento
<i>HpaII</i>	<pre> 5' C^CGG 3' 3' GGC^C 5' </pre>
<i>DdeI</i>	<pre> 5' C^TNA 3' 3' GANT^C 5' </pre>
<i>RsaI</i>	<pre> 5' GT^AC 3' 3' CA^TG 5' </pre>
<i>VspI</i>	<pre> 5' AT^TA 3' 3' TA^AT 5' </pre>
<i>BglII</i>	<pre> 5' A^GATC 3' 3' TCTAG^A 5' </pre>

QUADRO 8 – Endonucleases de restrição que foram utilizadas na PCR-RFLP.

4.14 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE RAPD, SSR-PCR E PCR-RFLP E CONSTRUÇÃO DOS FENOGRAMAS

Para analisar o padrão de bandas obtido em cada amostra, 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 da inserção dos dados de 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 amostras, espécies e sub-gêneros de *Leishmania*.

O programa de computador *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 & LI, 1979), onde N_{xy} é o número de fragmentos (bandas) compartilhados entre as amostras x e y , N_x é o número de fragmentos A 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). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de *Bootstrap* com 1000 reamostragens. 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 original. Por exemplo, no caso de 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).

Os fenogramas são muito utilizados para exprimir graficamente as correlações de distância genética entre as amostras. Eles representam o grau de similaridade/diversidade genética entre amostras de uma espécie ou entre espécies, independentemente da história evolutiva do táxon que está sendo comparado. São dados gerados a partir da análise da matriz de diferença genética, usando um dos vários métodos de agrupamento, como por exemplo, o UPGMA (método de agrupamento ao pares utilizando médias aritméticas).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A comparação entre as medianas 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 todos os grupos e iniciadores.

4.16 REAÇÃO DE LSSP-PCR

Os DNAs obtidos de cada amostra foram submetidos a duas ampliações por PCR. A primeira amplificação foi direcionada à obtenção de um fragmento de 447pb da região variável do kDNA de *L. infantum* utilizando-se os iniciadores específicos MC1 e MC2 (QUADRO 9), segundo descrição feita anteriormente. Foi utilizado o *Kit PuReTaq Ready to go PCR Beads in a plate* (Amersham Biosciences) que contém os reagentes sob a forma de pérolas liofilizadas. Em cada tubo contendo os reagentes sob a forma de pérola foram adicionados 19 μ L de água deionizada estéril e 5pmoles de cada iniciador MC1 e MC2 correspondentes a 2 μ L de cada um. Depois de homogeneizado, foram acrescentados 2 μ L de DNA (1ng/ μ L) perfazendo um volume final de 25 μ L para cada amostra.

O programa de amplificação utilizado foi o descrito por Cortes et al. (2004), os quais consistiram de um passo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos. No ciclo final, o passo de extensão foi estendido para 10 minutos a 72°C.

Os produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 5%, não desnaturante, conforme descrito anteriormente. Foi realizada uma corrida de 100 volts por aproximadamente 5 horas, até que o corante xileno-cianol, utilizado como marcador de corrida no gel, tivesse percorrido 5cm. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados foram visualizados pela coloração com o nitrato de prata, conforme descrição anterior.

Os produtos amplificados foram então purificados utilizando-se o kit de purificação Wizard[®] PCR Preps – DNA purification System (Promega) e submetidos

à técnica de LSSP-PCR em uma segunda etapa, utilizando-se apenas o iniciador MC1.

A reação de LSSP-PCR foi realizada em volume final de 10 μ L contendo 50mM de dNTPs, 1,0mM de MgCl₂, tampão de reação 1X (100mM Tris HCl pH 9,0; 500mM, KCl; 1% Triton X-100) da Taq DNA Polimerase; 1,6U de Taq DNA Polimerase, 48pmoles do iniciador MC1 e 1 μ L do produto amplificado na primeira reação. A mistura foi coberta com óleo mineral estéril e então submetida a um programa de amplificação constituído por 40 ciclos de anelamento a 30°C por 1 minuto, de extensão a 72°C por 1 minuto e de desnaturação a 94°C por 1 minuto, precedidos por um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos. Após os 40 ciclos seguiu-se um passo de 30°C por 1 minuto e o passo de extensão foi estendido para 5 minutos a 72°C. Como controle negativo da reação de PCR foi utilizado o branco do MIX, o qual consiste em uma mistura de todos os componentes da reação (dNTP's, íon Mg, iniciadores e Taq DNA polimerase) sem adição de qualquer amostra de DNA.

Os produtos de LSSP-PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida a 5% corado pela prata, conforme descrição anterior.

Após eletroforese os géis foram cuidadosamente analisados para determinação dos principais fragmentos constituintes dos perfis de LSSP-PCR. Para isso os géis foram fotografados e as fotografias analisadas por inspeção visual, sendo os fragmentos de DNA constituintes de cada perfil e apresentando maior intensidade, manualmente selecionados e considerados como as bandas principais de cada perfil. O tamanho, em pares de base, dos fragmentos de DNA constituintes dos perfis de LSSP-PCR foram calculados em comparação ao padrão de peso molecular (1Kb Ladder, Promega) utilizando-se o programa *LabImage*, version. 2.70

(Copyright 1999–2004, GmbH, Kapelan). Os pesos moleculares desses fragmentos, foram utilizados na composição dos perfis de LSSP-PCR do kDNA de *L. infantum* e *L. chagasi*, obtidos tanto das cepas de referência, quanto daquelas isoladas de reservatórios caninos e casos humanos. A similaridade entre os perfis foi determinada pela comparação do tamanho (em pares de bases) dos principais fragmentos de DNA constituintes de cada perfil de LSSP-PCR.

4.17 SEQÜENCIAMENTO PARCIAL DO MINICÍRCULO DE kDNA

Para as reações de seqüenciamento, foram escolhidas aleatoriamente 40% das amostras de cada grupo do estudo (isolados humanos e de reservatórios caninos do Brasil e de Portugal) totalizando 16 amostras e também as amostras de referência de *L. chagasi* e *L. infantum* (PP75 e IPT1). As amostras foram inicialmente submetidas à amplificação em termociclador para PCR – MJ Research Warrertown, Mass USA, pelos iniciadores MC1 e MC2, como descrito previamente.

Após a amplificação as amostras foram tratadas com as enzimas Exonuclease I (Exo) e “Shrimp Alkaline Phosphatase” (SAP). Foi adicionado 1,5µL do mix das duas enzimas para cada 3µL de produto amplificado. As amostras foram então submetidas a um passo de 37° C por 30 minutos e 80° C por 15 minutos para inativação da reação no termociclador.

As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo método descrito originalmente por Sanger et al. (1977). As reações foram processadas em tubos de microcentrifuga de 0,2mL com um volume final de 10µL contendo 0,8pmoles do iniciador MC1 (5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3'), 0,3µL do Big Dye Terminator V3.1 (Cycle Sequencing), 1,77µL do tampão próprio da reação, 3-10ng de DNA (de

acordo com o perfil de amplificação de cada amostra) e água ultrapura suficiente para completar o volume de 10 μ L. As reações foram realizadas em um termociclador (Mastercycler® - Eppendorf) com uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 2 minutos. Após as reações de amplificação, os produtos da PCR foram submetidos a precipitação com isopropanol a 65%. Após a adição do isopropanol, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida foi feita centrifugação a 4.000g durante 25 minutos. Logo após esse procedimento o isopropanol foi removido por inversão do tubo e então adicionado 300 μ L de etanol a 60%. O material foi então centrifugado por 5 minutos a 4.000g. O etanol foi então cuidadosamente removido com o auxílio de uma pipeta e as amostras foram então deixadas em temperatura ambiente até a completa secagem do DNA. O sedimento foi então ressuspensionado por agitação em vórtex com 10 μ L do tampão de resuspensão contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA. O material foi então submetido ao seqüenciamento em seqüenciador *ABI 3130* (Applied Biosystems).

4.18 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS EM BANCO DE DADOS

As seqüências foram obtidas em forma de cromatograma e as seqüências foram analisadas utilizando o programa Sequence Scanner software V1.0 (Applied Biosystems).

Posteriormente as seqüências obtidas foram submetidas a análise de homologia utilizando-se 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. A seqüência obtida foi comparada à seqüência de kDNA das amostras de *Leishmania* armazenadas no banco de dados.

Em seguida foi feito o alinhamento de todas as seqüências obtidas utilizando-se o programa CLUSTALW disponível em (www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/index.html).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

A análise dos resultados das eletroforeses com 10 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 nas tabelas 1 e 2.

Todas as amostras estudadas apresentaram um perfil enzimático bastante homogêneo, sendo o padrão eletroforético dos isolados, semelhante ao das duas amostras de referência *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) e *Leishmania infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1). As amostras que apresentaram um perfil idêntico aos das amostras de referência foram agrupadas em dois grandes grupos: GH (grupo das amostras de humanos do Brasil e de Portugal) e GC (grupo das amostras de cães do Brasil e de Portugal). Os resultados obtidos foram convertidos em diagramas para melhor visualização (FIGURA 1).

Dentre as amostras isoladas no Brasil foram observadas duas variantes isoenzimáticas: variante A (VA) – amostra RR059, isolada de caso humano e variante B (VB) – amostra RR056, isolada de cão. Estas variantes foram determinadas pelas enzimas PGM e GPI. Utilizando-se a enzima PGM foi observada a ausência de dois eletromorfos (2 e 3) na amostra RR059 e um eletromorfo (3) na amostra RR066. Com a enzima GPI a amostra RR066 não apresentou o eletromorfo 4.

Com relação às amostras isoladas de casos humanos e caninos provenientes de Portugal não foi observada nenhuma variação com as enzimas estudadas, tanto entre as amostras, quanto quando comparadas com as amostras de referência.

TABELA 1 - Eletromorfos observados em isolados de *Leishmania* provenientes do Brasil e Portugal. Isolados humanos. A variante A (em vermelho) representa a única amostra, isolada no Brasil, que apresentou um perfil de migração diferente para a enzima PGM.

AMOSTRAS	NH	ACON	MDH	G6PDH	PEPD	GPI	6PGD	PGM	ME	IDH	VARIANTE
PH8	4,5	1	7	3,5	4	2	3	2	3	4	
M2903	3,6	1	1	7	5	3	1	3	1	-	
IPT1	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
PP75	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
BH46	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR072	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR055	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR059	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	-	2	2	A
RR071	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR050	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR053	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR058	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR057	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR054	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT242	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT245	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT144	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT248	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT249	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT224	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT233	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT225	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT226	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT234	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	

TABELA 2 - Eletromorfos observados em isolados de *Leishmania* provenientes do Brasil e Portugal. Isolados caninos. A variante B (em vermelho) representa a única amostra, isolada no Brasil, que apresentou um perfil de migração diferente para as enzimas GPI e PGM.

AMOSTRAS	NH	ACON	MDH	G6PDH	PEPD	GPI	6PGD	PGM	ME	IDH	VARIANTE
PH8	4,5	1	7	3,5	4	2	3	2	3	4	
M2903	3,6	1	1	7	5	3	1	3	1	-	
IPT1	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
PPT5	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR070	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR065	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
BH401	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR061	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR069	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
BH402	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
BH403	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
BH400	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
BH406	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
RR066	1,4	1	3,5,6	4,7	3	5	2	2	2	2	B
IMT 254	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 229	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 256	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 262	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 339	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 321	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 322	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 326	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 319	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	
IMT 320	1,4	1	3,5,6	4,7	3	4,5	2	2,3	2	2	

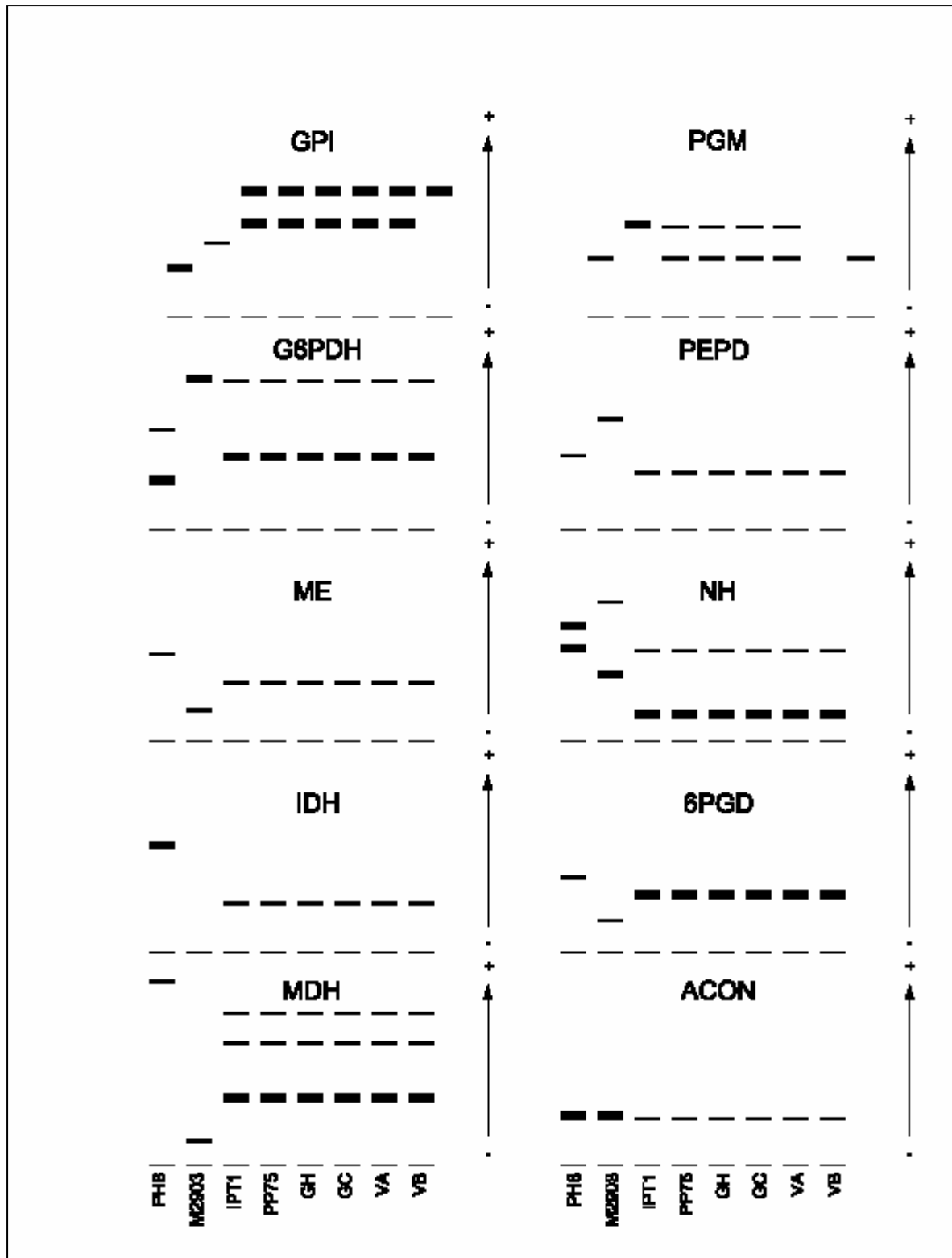


FIGURA 1 - Diagrama representativo do resultado da eletroforese das enzimas MDH, ACON, IDH, 6PGD, ME, NH, G6PDH, PEPD, GPI e PGM com as amostras de referência, amostras isoladas de casos humanos do Brasil e de Portugal (GH) e amostras isoladas de cães do Brasil e de Portugal (GC). As variantes A e B encontram-se representadas pelas iniciais VA (amostra RR059) e VB (amostra RR066), respectivamente.

5.2 AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DE DNA POLIMÓRFICO (RAPD)

Para a execução da técnica de RAPD-PCR, as amostras de *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* foram divididas em dois grupos, de acordo com o hospedeiro de origem, em isolados de casos humanos (Brasil e Portugal) e isolados de reservatórios caninos (Brasil e Portugal).

Na otimização das condições para realização do RAPD-PCR, a melhor concentração dos iniciadores utilizada foi de 6,4pmol/ 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, as amostras foram quantificadas pela eletroforese em gel de agarose e diluídas para uma concentração de 1ng/ μ L.

Os perfis de RAPD-PCR para todas as amostras, incluindo aquelas de referência, obtidos com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15 geraram perfis polimórficos que apresentaram várias bandas. Outros três iniciadores foram testados (A07, QG1 e λ GT11) sendo que algumas amostras não amplificaram e outras tiveram um padrão de amplificação de difícil análise. Por esse motivo estes iniciadores não foram incluídos no estudo.

Pela análise dos perfis de bandas, foi possível identificar diferenças pela presença ou ausência de um ou vários fragmentos amplificados. A maioria dos fragmentos foi compartilhada por todas as amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos (média de 0,92) e reservatórios caninos (média de 0,93). A análise dos perfis de RAPDs das amostras estudadas mostrou um alto grau de homogeneidade entre elas, conforme ilustrado com os iniciadores P14 e L15, (FIGURAS 2A e B, 4A e B), respectivamente.

A TABELA 3 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 isoladas de casos humanos, do Brasil e de Portugal, com cada um dos iniciadores utilizados. O número total de produtos amplificados entre as amostras isoladas de casos humanos com todos os iniciadores aleatórios, está apresentado na TABELA 5.

A TABELA 4 mostra o número médio de bandas, a média de bandas compartilhadas e a proporção de bandas compartilhadas entre as amostras isoladas de reservatórios caninos, com cada um dos iniciadores utilizados. O número de produtos amplificados das amostras de reservatórios caninos, com todos os iniciadores aleatórios, está apresentado na TABELA 6.

Como mostra a TABELA 3, para os isolados de casos humanos, do Brasil e de Portugal, os perfis gerados pelos iniciadores L15 e R15 deram origem a um maior número de bandas analisadas ($28,3 \pm 0,9$ e $26,0 \pm 2,7$, respectivamente), enquanto uma maior porcentagem de bandas compartilhadas entre as amostras foi observada para os iniciadores P14, L15 e ILO875, com 97% e para o iniciador ILO872 com 96% entre as amostras. Por outro lado, os iniciadores M13R e M13F geraram um menor número de bandas ($14,6 \pm 5,3$ e $14,6 \pm 3,2$, respectivamente), enquanto uma menor porcentagem de bandas compartilhadas entre as amostras foi gerada pelo iniciador F10 com 76%.

Já para os isolados de reservatórios caninos, a TABELA 4 mostra que os perfis gerados pelos iniciadores P14 e R15 deram origem a um maior número de bandas ($22,9 \pm 0,4$ e $23,2 \pm 2,0$, respectivamente) enquanto a maior porcentagem de bandas compartilhadas foi gerada pelos iniciadores P14, B07 e L15 com 100% de similaridade. Por outro lado, o iniciador F10 gerou um menor número de bandas

(14,4 ± 1,4), como também uma menor porcentagem de bandas compartilhadas entre as amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, de 69%.

Tanto para os isolados de casos humanos, como para os isolados de reservatórios caninos, o iniciador F10 foi o que gerou o perfil mais polimórfico (FIGURAS 6A e B), sem contudo representar uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Para o cálculo dos coeficientes de similaridade e distância genética foram utilizados os fragmentos de RAPD-PCR entre 250 e 1000bp. Esse intervalo foi escolhido baseado na melhor visualização e qualidade de definição das bandas.

Os coeficientes de similaridade entre as amostras isoladas de casos humanos, do Brasil e de Portugal, com base na média dos coeficientes calculados para cada iniciador utilizado, estão apresentados na TABELA 5. Já os coeficientes de similaridade entre as amostras isoladas de reservatórios caninos estão apresentados na TABELA 6.

Nos fenogramas, para cada iniciador utilizado 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 (FIGURAS 3, 5 e 7).

O fenograma consenso produzido pela análise do agrupamento sobre os perfis de RAPD-PCR de todas as amostras humanas e de reservatórios caninos, com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15 utilizados, estão apresentados na FIGURA 8.

O fenograma consenso (FIGURA 8), utilizando-se todos os iniciadores para a técnica de RAPD-PCR, construído pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA), pelo programa *Treecon*, revelou, como para cada iniciador analisado

individualmente, a presença de dois grupos distintos relacionados com os hospedeiros humano e canino com 95% de suporte pelo *Bootstrap*. As amostras de referência pertencentes ao complexo *L. donovani* foram agrupadas com 100% de suporte pelo *Bootstrap*. Não foi observada nenhuma correlação com a origem geográfica das amostras (Brasil ou Portugal) com nenhum dos iniciadores utilizados.

TABELA 3 - Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15 para as amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de casos humanos.

Iniciador	Média de bandas de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre todas as amostras ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP	Proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Proporção de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i>
P14	20,9 ± 2,4	17,3 ± 4,4	20,4 ± 0,9	0,87	0,97
B07	18,6 ± 1,3	15,2 ± 5,7	17,8 ± 3,6	0,81	0,94
M13R	14,6 ± 5,3	11,5 ± 3,2	11,6 ± 1,5	0,75	0,89
M13F	14,6 ± 3,2	11,9 ± 2,6	12,7 ± 0,9	0,82	0,92
L15	28,3 ± 0,9	25,2 ± 3,9	27,4 ± 0,8	0,90	0,97
F10	16,4 ± 2,6	11,4 ± 2,3	12,5 ± 1,9	0,71	0,76
ILO875	22,1 ± 1,2	18,8 ± 5,9	21,7 ± 0,9	0,86	0,97
ILO872	16,2 ± 0,7	14,0 ± 3,1	15,7 ± 0,9	0,86	0,96
R15	26,0 ± 2,7	21,4 ± 5,8	24,6 ± 2,7	0,84	0,93
Média geral				0,82	0,92

* Incluindo as amostras de referência da OMS: PH8, M2903, IPT1, DD8 e PP75

TABELA 4 - Resultados obtidos com a técnica de RAPD-PCR com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15 para as amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de reservatórios caninos.

Iniciador	Média de bandas de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre todas as amostras ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP	Proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Proporção de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i>
P14	22,9 ± 0,4	19,5 ± 5,3	22,3 ± 1,9	0,91	1,00
B07	17,0 ± 0,2	15,0 ± 4,3	17,0 ± 0	0,89	1,00
M13R	17,9 ± 4,0	15,1 ± 2,9	15,0 ± 1,1	1,00	0,90
M13F	19,7 ± 1,5	16,5 ± 4,1	18,2 ± 1,9	0,85	0,90
L15	18,0 ± 0,2	15,4 ± 3,6	17,6 ± 1,0	0,87	1,00
F10	14,4 ± 1,4	9,6 ± 1,9	9,8 ± 1,6	0,70	0,69
ILO875	20,1 ± 4,1	15,5 ± 6,8	19,0 ± 0,1	0,81	0,99
ILO872	17,8 ± 2,3	14,0 ± 3,8	16,1 ± 1,4	0,80	0,90
R15	23,2 ± 2,0	19,8 ± 4,1	22,0 ± 0	0,86	0,95
Média geral				0,85	0,93

* Incluindo as amostras de referência da OMS: PH8, M2903, IPT1, DD8 e PP75.

TABELA 5 – Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, detectados por RAPD-PCR, entre 250 e 1000 pb, com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15. Os números totais de fragmentos amplificados estão apresentados, diagonalmente, em vermelho. 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	M2903	IPT1	DD8	PP75	BH46	RR071	RR072	RR055	RR059	RR050	RR054	RR053	RR057	RR058	*144	*224	*225	*226	*233	*234	*242	*245	*248	*249
PH8	140	0,56	0,46	0,49	0,45	0,47	0,46	0,45	0,45	0,45	0,44	0,44	0,43	0,43	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,43	0,45	0,45	0,45	0,44	0,43
M2903	92	160	0,59	0,62	0,62	0,60	0,59	0,58	0,57	0,58	0,57	0,59	0,57	0,57	0,58	0,57	0,58	0,57	0,57	0,58	0,58	0,58	0,57	0,56	0,56
IPT1	83	107	179	0,69	0,73	0,66	0,70	0,69	0,70	0,70	0,68	0,67	0,69	0,69	0,79	0,68	0,69	0,69	0,69	0,68	0,69	0,69	0,69	0,68	0,68
DD8	89	113	136	191	0,80	0,70	0,78	0,77	0,77	0,76	0,75	0,77	0,74	0,74	0,75	0,74	0,75	0,76	0,76	0,75	0,76	0,77	0,75	0,75	0,73
PP75	80	107	137	154	181	0,70	0,82	0,81	0,83	0,82	0,81	0,80	0,79	0,80	0,81	0,80	0,81	0,81	0,81	0,79	0,81	0,81	0,81	0,81	0,78
BH46	82	107	127	138	134	193	0,74	0,71	0,72	0,72	0,71	0,72	0,69	0,70	0,71	0,70	0,71	0,71	0,71	0,71	0,70	0,71	0,71	0,71	0,68
RR071	77	100	129	146	148	140	177	0,95	0,96	0,95	0,93	0,92	0,91	0,92	0,93	0,92	0,93	0,93	0,90	0,92	0,92	0,92	0,92	0,91	0,89
RR072	74	96	126	143	146	135	169	173	0,97	0,96	0,94	0,93	0,93	0,94	0,94	0,93	0,94	0,96	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93	0,91	0,90
RR055	74	95	126	142	147	135	169	169	171	0,98	0,97	0,94	0,94	0,94	0,95	0,94	0,94	0,96	0,95	0,93	0,95	0,95	0,94	0,93	0,92
RR059	74	96	126	141	147	135	169	167	169	172	0,96	0,95	0,94	0,94	0,94	0,93	0,94	0,95	0,94	0,94	0,94	0,95	0,94	0,93	0,91
RR050	73	94	123	138	145	132	164	164	166	166	170	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,94	0,93	0,93	0,95	0,95	0,95	0,93	0,92
RR054	73	98	124	143	145	136	165	164	165	165	165	175	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,93	0,95	0,94	0,94	0,94	0,94
RR053	73	96	127	140	145	133	165	165	166	166	166	168	179	0,97	0,95	0,95	0,94	0,94	0,94	0,93	0,95	0,94	0,94	0,94	0,94
RR057	72	96	127	139	145	133	165	165	165	164	166	167	173	175	0,97	0,97	0,95	0,95	0,95	0,93	0,93	0,93	0,95	0,94	0,94
RR058	73	96	125	139	145	133	165	165	165	164	165	166	169	170	173	0,98	0,97	0,85	0,85	0,93	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
*144	73	95	124	137	143	132	163	163	163	162	164	165	168	169	169	171	0,97	0,95	0,94	0,93	0,95	0,94	0,95	0,93	0,93
*224	72	96	126	139	144	133	164	164	164	163	164	166	167	169	169	168	172	0,97	0,96	0,94	0,96	0,95	0,96	0,95	0,94
*225	74	97	128	143	148	135	168	170	169	167	166	168	169	170	170	168	172	178	0,98	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
*226	74	96	127	142	147	136	168	168	167	166	165	168	170	170	169	167	171	176	179	0,94	0,94	0,95	0,95	0,96	0,94
*233	75	99	128	144	147	137	167	168	167	168	167	169	170	170	169	167	172	175	173	186	0,95	0,97	0,96	0,94	0,92
*234	75	97	127	142	147	134	165	165	167	166	166	168	171	168	168	167	170	172	171	175	177	0,98	0,98	0,96	0,95
*242	76	98	129	145	148	136	167	167	168	169	167	170	172	169	169	167	171	174	173	179	176	182	0,97	0,96	0,93
*245	76	97	128	142	147	135	166	166	167	166	167	168	170	170	169	167	171	173	173	178	173	178	180	0,96	0,95
*248	73	94	125	139	143	132	163	162	163	163	162	166	167	167	166	164	168	170	171	172	170	174	173	175	0,96
*249	72	94	124	137	142	131	161	160	162	161	162	163	168	167	165	164	166	168	168	169	171	170	171	171	176

*Amostras de Portugal, precedidas pela sigla IMT

TABELA 6 – Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, detectados por RAPD-PCR, entre 250 e 1000 pb, com os iniciadores P14, B07, M13R, M13F, L15, F10, ILO875, ILO872 e R15. Os números totais de fragmentos amplificados estão apresentados, diagonalmente em vermelho. 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	M2903	IPT1	DD8	PP75	*229	*254	*256	*262	*339	*321	*322	*326	*319	*320	BH400	RR065	BH402	BH401	RR069	BH403	RR070	RR061	BH406	RR066
PH8	119	0,55	0,44	0,42	0,42	0,40	0,40	0,37	0,39	0,38	0,37	0,37	0,37	0,38	0,38	0,39	0,38	0,38	0,40	0,39	0,39	0,38	0,37	0,37
M2903	86	159	0,52	0,53	0,57	0,55	0,52	0,52	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52	0,54	0,53	0,53	0,53	0,53	0,53	0,53	0,54	0,54	0,54	0,52
IPT1	75	94	162	0,71	0,77	0,73	0,73	0,71	0,72	0,71	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69	0,70	0,70	0,69	0,69	0,71	0,69	0,69	0,69	0,69
DD8	70	94	129	177	0,84	0,84	0,81	0,80	0,77	0,80	0,79	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,78	0,77	0,79	0,79	0,78	0,78	0,77	0,76
PP75	70	100	141	155	183	0,93	0,91	0,91	0,90	0,89	0,89	0,88	0,84	0,85	0,88	0,88	0,86	0,87	0,89	0,89	0,86	0,86	0,85	0,86
*229	61	91	127	139	164	170	0,93	0,92	0,91	0,91	0,92	0,89	0,90	0,86	0,88	0,88	0,88	0,88	0,90	0,90	0,87	0,88	0,87	0,88
*254	58	84	125	140	158	164	164	0,96	0,94	0,94	0,93	0,93	0,90	0,88	0,93	0,91	0,91	0,91	0,94	0,92	0,92	0,92	0,91	0,93
*256	60	87	127	140	159	156	160	166	0,95	0,95	0,93	0,95	0,90	0,90	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,94	0,92	0,92	0,91	0,91
*262	54	82	121	132	154	151	154	156	159	0,96	0,96	0,94	0,94	0,91	0,94	0,93	0,91	0,91	0,91	0,92	0,91	0,91	0,91	0,93
*339	57	83	123	138	155	153	155	158	156	163	0,98	0,94	0,94	0,92	0,90	0,93	0,93	0,91	0,92	0,92	0,91	0,91	0,91	0,92
*321	57	87	124	139	156	155	157	161	158	162	167	0,95	0,95	0,92	0,90	0,93	0,93	0,93	0,93	0,94	0,91	0,91	0,91	0,92
*322	54	84	120	135	153	152	156	155	156	160	166	0,97	0,93	0,90	0,94	0,92	0,91	0,92	0,93	0,93	0,92	0,92	0,94	0,95
*326	56	85	122	136	155	154	157	160	156	157	161	164	169	0,93	0,91	0,95	0,93	0,92	0,93	0,94	0,93	0,93	0,93	0,93
*319	56	85	120	136	150	148	153	154	152	155	157	159	160	169	0,93	0,94	0,92	0,91	0,91	0,91	0,90	0,90	0,90	0,90
*320	56	87	121	133	148	147	148	149	149	149	151	153	154	157	164	0,94	0,91	0,90	0,89	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89
BH400	57	86	121	136	154	150	155	156	154	156	157	159	162	160	158	167	0,96	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
RR065	58	86	122	135	154	150	153	157	153	156	157	156	159	157	154	162	167	0,94	0,93	0,95	0,92	0,92	0,93	0,93
BH402	57	87	123	137	152	150	154	157	151	154	158	156	158	158	153	158	160	169	0,94	0,94	0,94	0,92	0,92	0,92
BH401	57	87	122	137	154	151	154	158	152	155	159	158	160	157	153	159	160	162	171	0,95	0,95	0,94	0,94	0,92
RR069	59	88	124	138	156	153	157	159	153	156	159	159	160	157	152	159	162	161	164	173	0,95	0,95	0,95	0,94
BH403	60	90	126	140	158	155	157	160	155	157	161	160	162	157	155	159	161	162	165	166	173	0,95	0,95	0,94
RR070	58	89	123	138	153	151	156	157	153	155	157	159	160	156	153	160	159	163	164	166	172	0,98	0,97	0,93
RR061	57	88	123	138	154	152	157	153	154	157	160	161	156	154	161	159	163	164	166	166	170	172	0,96	0,94
BH406	56	88	123	136	152	151	155	154	155	158	160	161	157	153	159	160	163	164	166	166	167	166	171	0,96
RR066	55	84	121	134	152	149	155	153	152	154	160	159	157	151	159	158	160	162	165	166	161	162	163	166

*Amostras de Portugal, precedidas pela sigla IMT

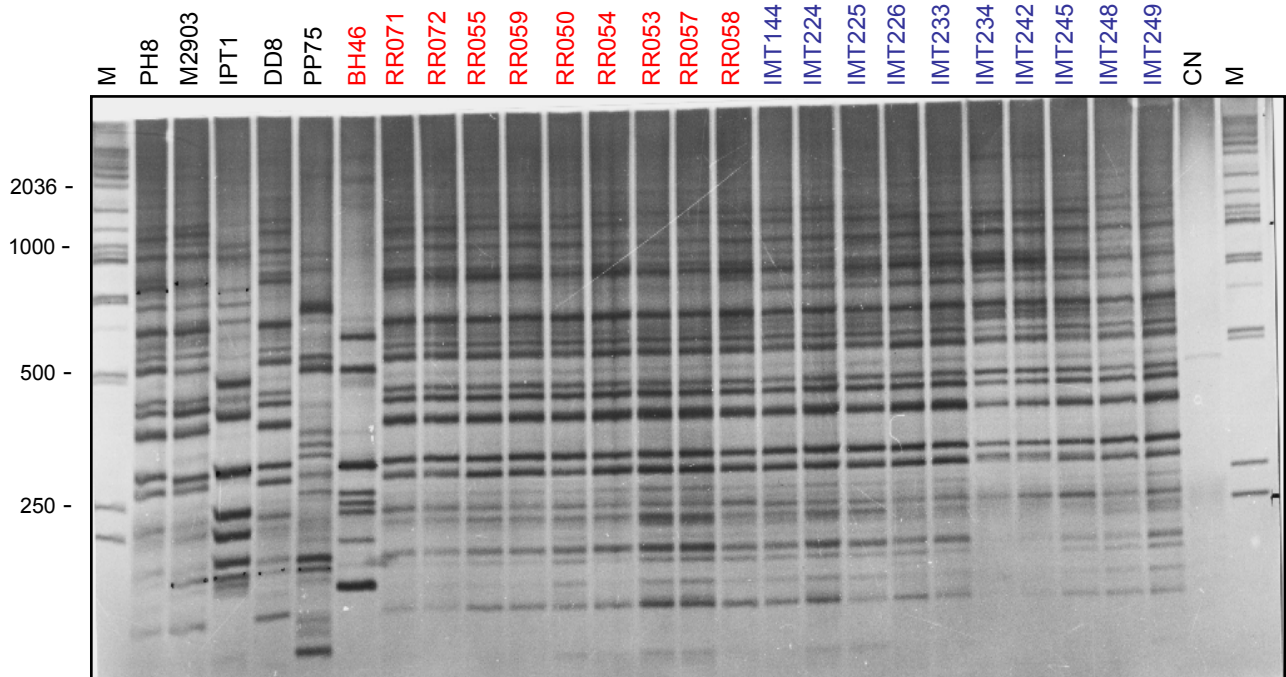


FIGURA 2A – Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador P14, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

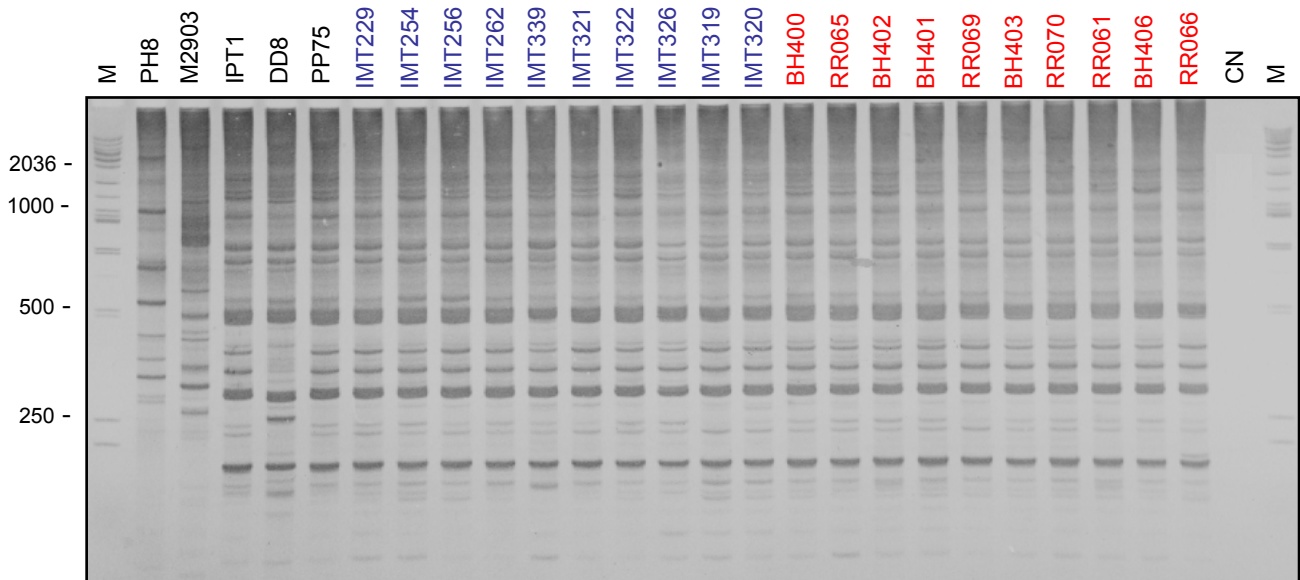


FIGURA 2B – Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador P14, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

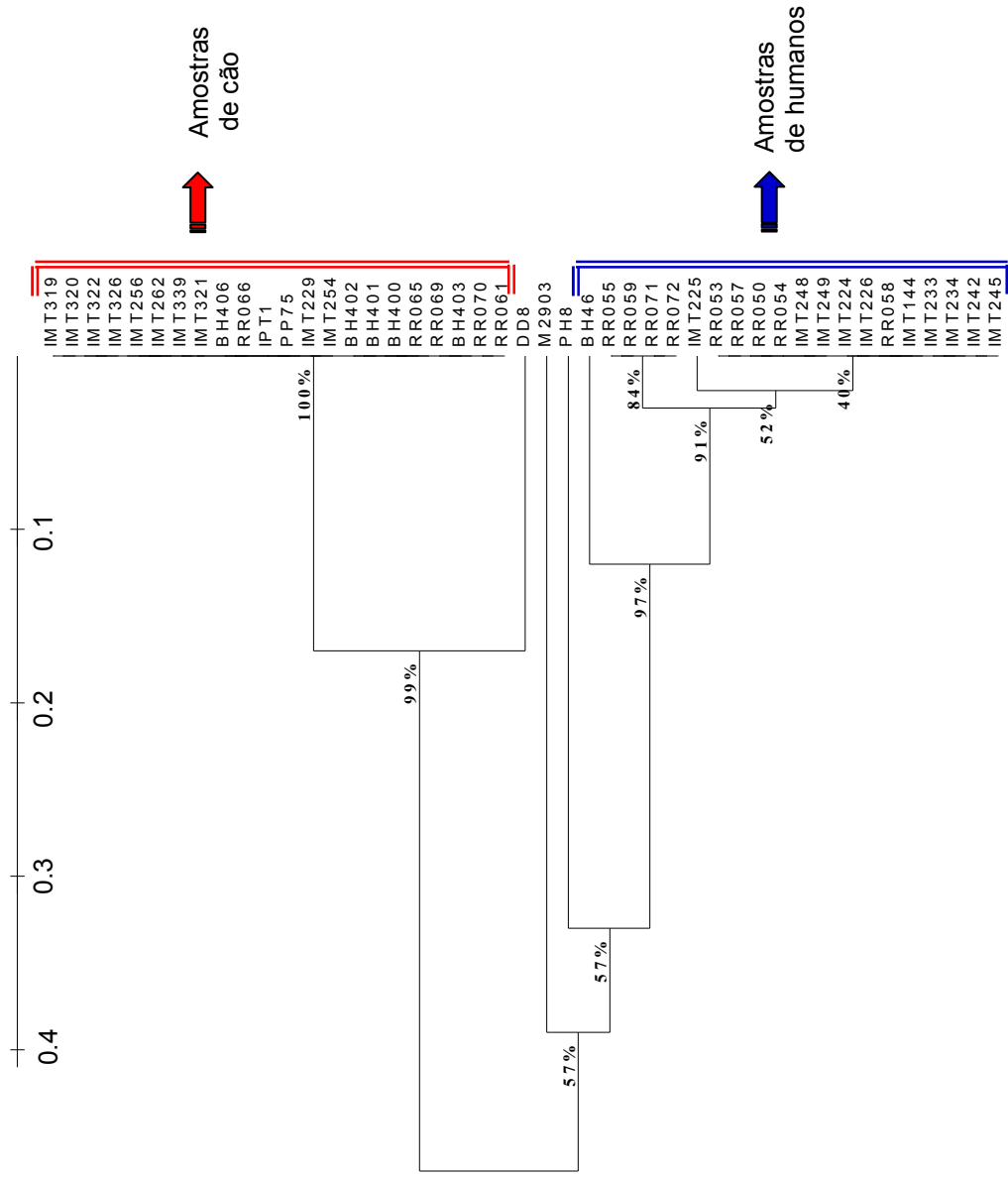


FIGURA 3 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador P14. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

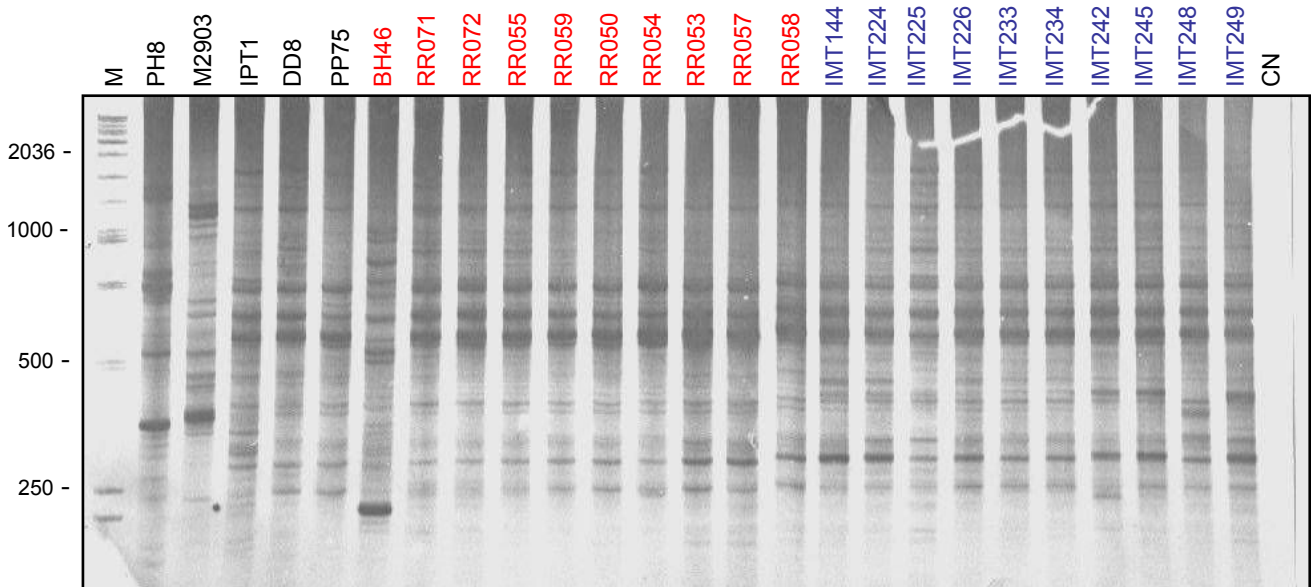


FIGURA 4A – Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador L15, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

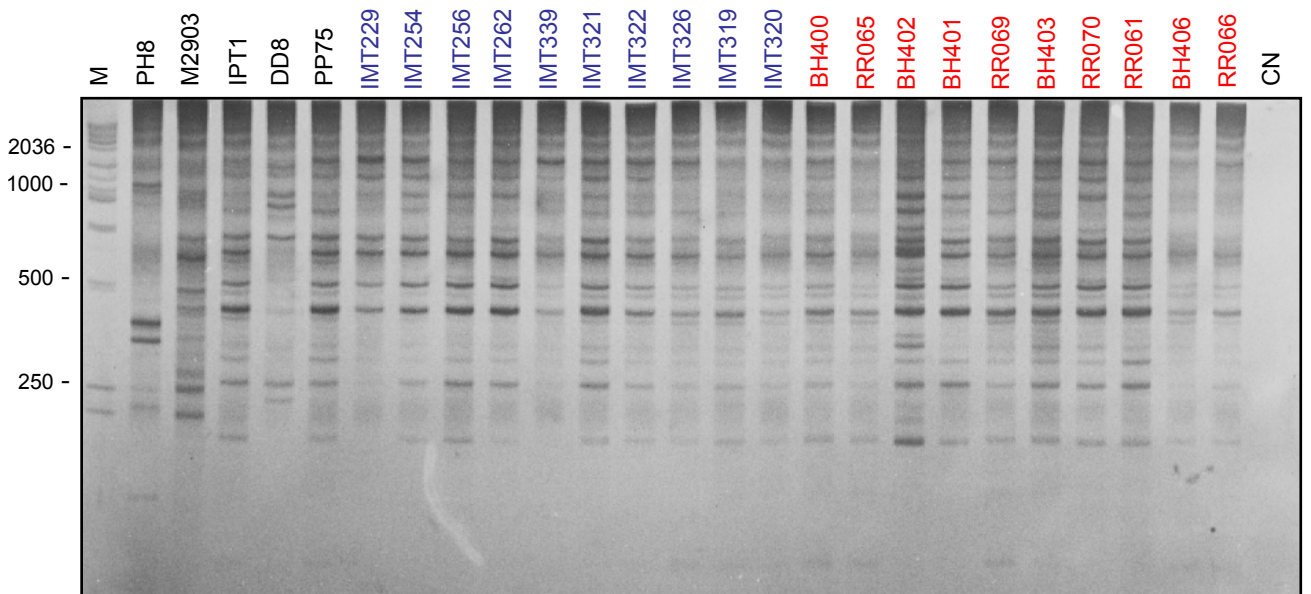


FIGURA 4B – Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador L15, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

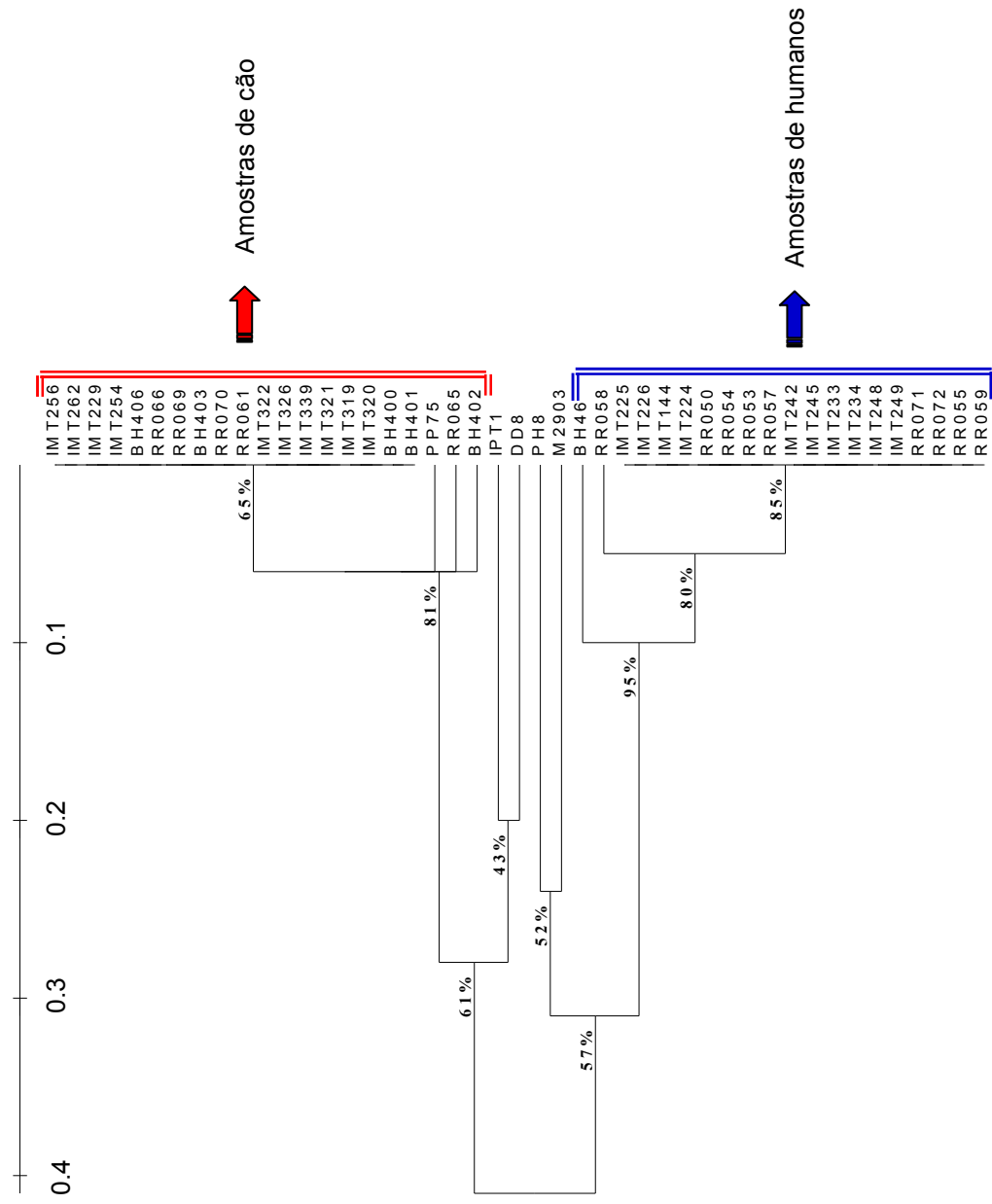


FIGURA 5 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Trecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador L15. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

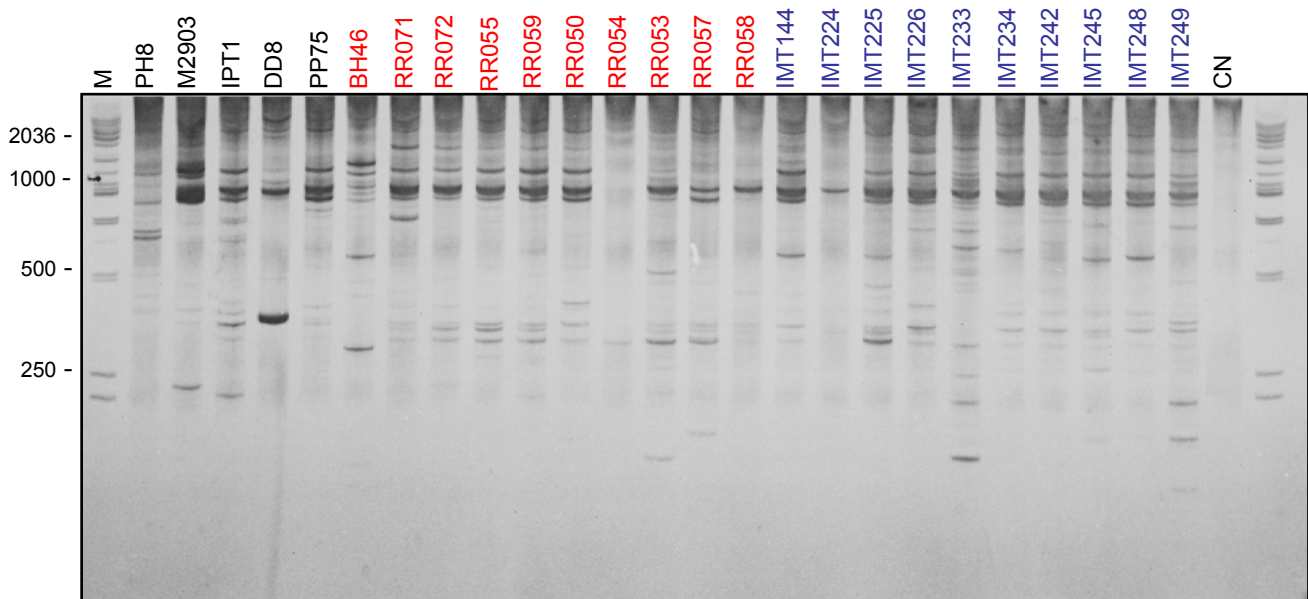


FIGURA 6A – Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência com o iniciador F10, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

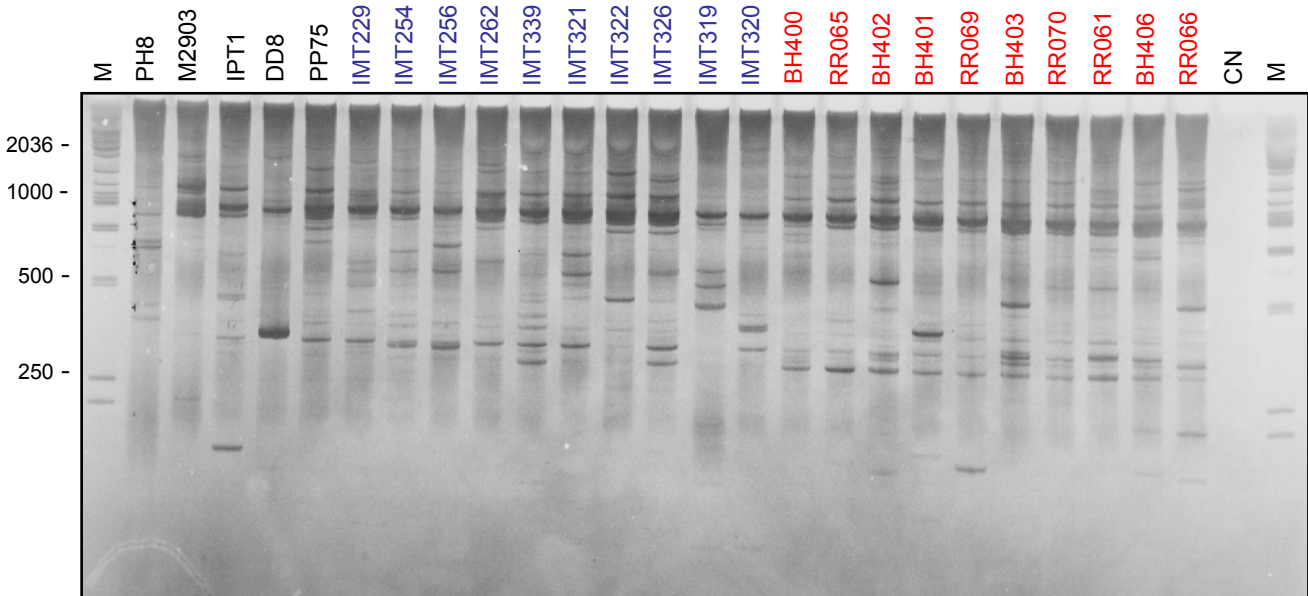


FIGURA 6B – Perfis de RAPD-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência com o iniciador F10, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

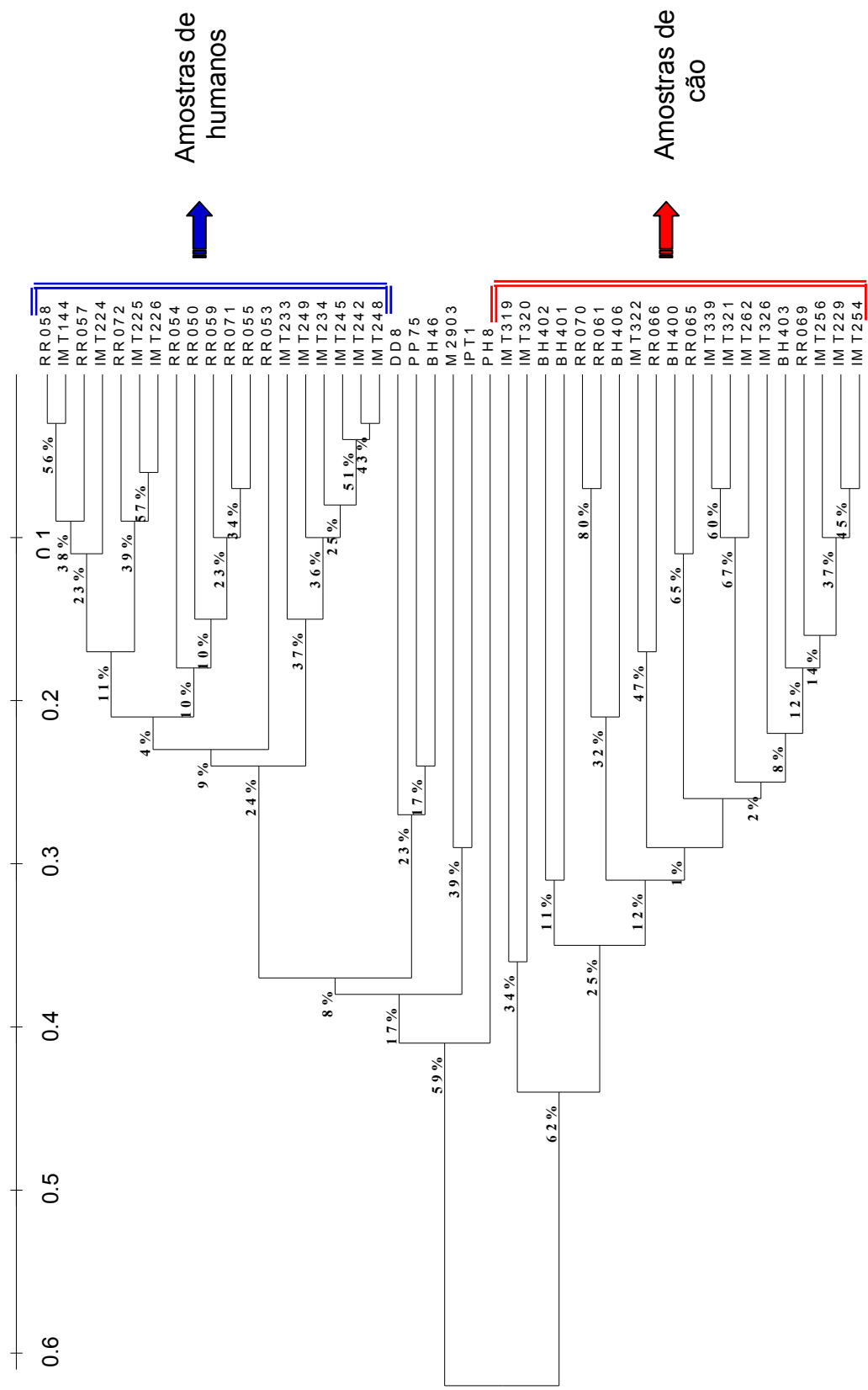


FIGURA 7 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com o iniciador F10. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

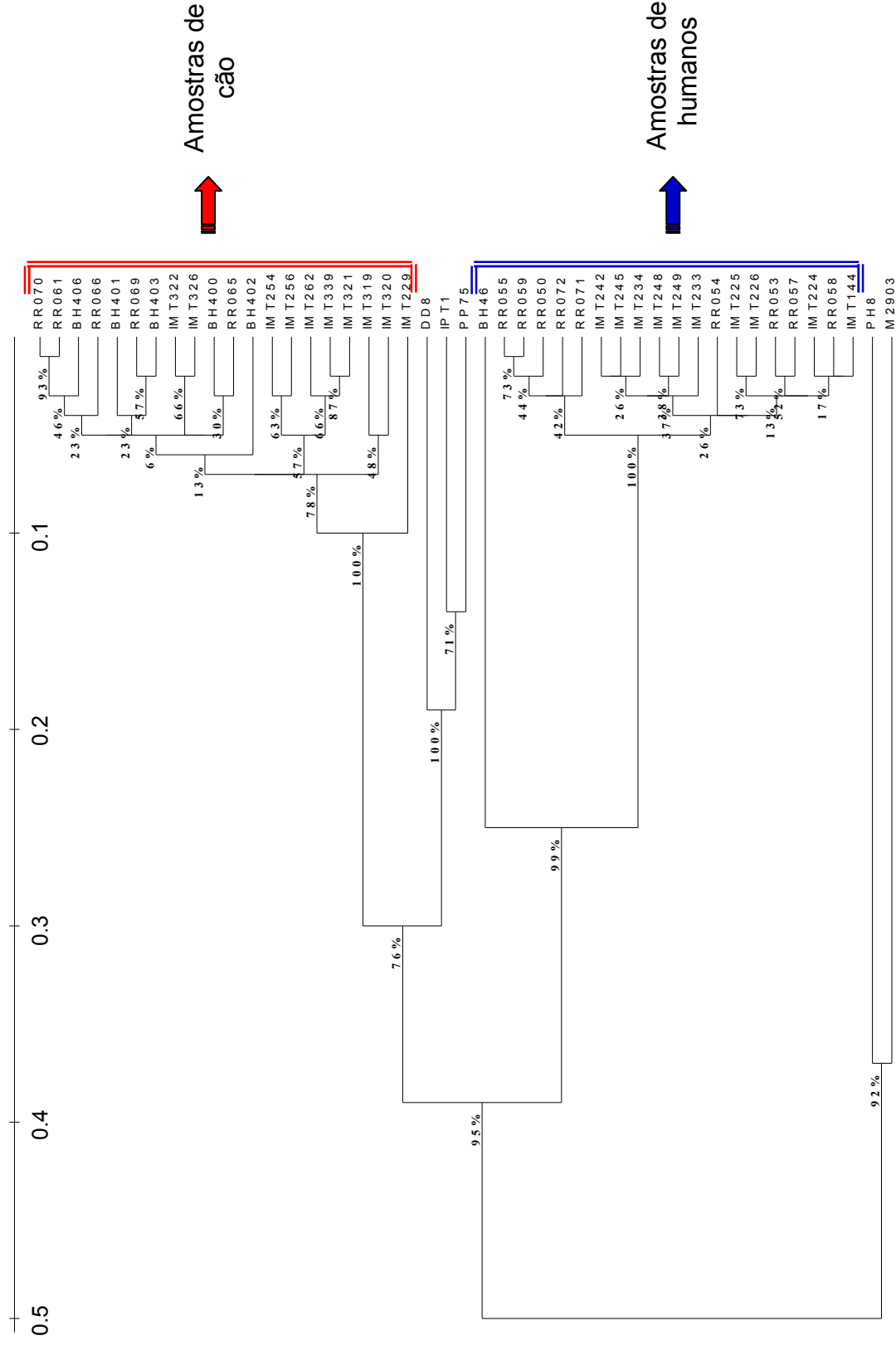


FIGURA 8 - Fenograma consenso das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de RAPD-PCR com nove iniciadores (B07, M13R, M13F, P14, L15, ILO 872, ILO 875, F10 e R15). Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

5.3 SSR-PCR

As FIGURAS 9A e B e 11A e B mostram os perfis de SSR-PCR para todas as amostras de *Leishmania* utilizadas com os iniciadores $(CA)_8RY$ e $CAA(CT)_6$. Os resultados da SSR-PCR também mostraram pouca variabilidade genética entre as amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* provenientes do Brasil e de Portugal.

TABELA 7 mostra a média de bandas obtidas, a média de bandas compartilhadas e a proporção de bandas compartilhadas entre as amostras, isoladas de casos humanos do Brasil e de Portugal, com a metodologia de SSR-PCR.

Os resultados mostraram um perfil de bandas muito homogêneo com a média de proporção de bandas compartilhadas de 0,98 para os dois iniciadores utilizados.

A TABELA 8 mostra a média de bandas obtidas, a média de bandas compartilhadas e a proporção de bandas compartilhadas entre as amostras, isoladas de reservatórios caninos, do Brasil e de Portugal, com a metodologia de SSR-PCR.

Os resultados obtidos com as amostras isoladas de reservatórios caninos utilizando o iniciador $(CA)_8RY$ mostraram um perfil de bandas mais polimórfico (média de proporção bandas compartilhadas de 0,88) do que com o iniciador $CAA(CT)_6$ (média de proporção de bandas compartilhadas de 0,99), sem contudo, representar uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

O número total de produtos amplificados das amostras de *Leishmania* com os iniciadores $(CA)_8RY$ e $CAA(CT)_6$, isoladas de casos humanos e caninos está apresentado nas TABELAS 9 e 10, respectivamente.

Para o cálculo dos coeficientes de similaridade e distância genética, a análise foi limitada, como para o RAPD, a amplicons entre 250 e 1000bp. Os coeficientes de

similaridade entre as amostras com base na média dos coeficientes calculados para os dois iniciadores utilizados estão apresentados nas TABELAS 9 e 10.

As amostras isoladas de casos humanos apresentaram coeficientes de similaridade variando de 0,54 a 1,00. Já as amostras isoladas de reservatórios caninos apresentaram coeficientes de similaridade variando de 0,55 a 1,00.

Em geral a topologia dos fenogramas construídos pelo método UPGMA, pelo programa *Treecon*, com base nos produtos obtidos com os iniciadores de SSR-PCR, foi semelhante à do fenograma construído com base nos produtos de RAPD-PCR, mostrando dois principais *clusters* que separaram as amostras isoladas de casos humanos daquelas de reservatórios caninos, com 29% de suporte pelo *Bootstrap*. Também como na análise feita com a técnica de RAPD-PCR não houve nenhuma correlação com a origem geográfica das amostras utilizadas (Brasil e Portugal).

Os fenogramas construídos pela análise de agrupamento baseada nos perfis de SSR-PCR com os iniciadores $(CA)_8RY$ e $CAA(CT)_6$ com todas as amostras estão apresentados nas FIGURAS 10 e 12, respectivamente. O fenograma consenso da técnica SSR-PCR com os dois iniciadores está apresentado na FIGURA 13. Neste fenograma foram mantidos os dois agrupamentos das amostras de humanos e de cão confirmando o resultado observado com a técnica de RAPD-PCR.

TABELA 7 - Resultados obtidos com a técnica de SSR-PCR com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆ para as amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de casos humanos.

Iniciador	Média de bandas de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre todas as amostras ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP	Proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Proporção de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i>
(CA) ₈ RY	10,0 ± 0,3	9,3 ± 0,9	9,8 ± 0,3	0,88	0,98
CAA(CT) ₆	20,1 ± 2,8	18,2 ± 2,4	19,0 ± 0,1	0,89	0,98

* Incluindo as amostras de referência da OMS: PH8, M2903, IPT1, DD8 e PP75.

TABELA 8 - Resultados obtidos com a técnica de SSR-PCR com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆ para as amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de reservatórios caninos.

Iniciador	Média de bandas de <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre todas as amostras ± DP*	Média de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i> ± DP	Proporção de bandas compartilhadas entre todas as amostras*	Proporção de bandas compartilhadas entre <i>L. chagasi</i> e <i>L. infantum</i>
(CA) ₈ RY	9,6 ± 2,2	8,6 ± 2,7	8,8 ± 3,0	0,80	0,88
CAA(CT) ₆	23,3 ± 1,5	21,8 ± 3,3	23,0 ± 0,1	0,92	0,99

* Incluindo as amostras de referência da OMS: PH8, M2903, IPT1, DD8 e PP75.

TABELA 9 – Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, 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 vermelho. 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	M2903	IPT1	DD8	PP75	BH46	RR071	RR072	RR055	RR059	RR050	RR054	RR053	RR057	RR058	*144	*224	*225	*226	*233	*234	*242	*245	*248	*249	
PH8	36	0,69	0,59	0,58	0,58	0,54	0,63	0,63	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	
M2903	29	48	0,63	0,67	0,62	0,59	0,63	0,63	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61
IPT1	23	29	40	0,96	0,89	0,86	0,79	0,79	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
DD8	23	31	39	41	0,92	0,84	0,77	0,77	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
PP75	22	27	35	36	37	0,88	0,80	0,80	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
BH46	19	25	31	31	30	33	0,87	0,87	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
RR071	21	25	28	28	27	28	30	1,0	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
RR072	21	25	28	28	27	28	30	29	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
RR055	20	24	27	27	26	27	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RR059	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RR050	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RR054	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RR053	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RR057	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
RR058	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
*144	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
*224	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
*225	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
*226	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
*233	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
*234	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0	1,0
*242	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0	1,0	1,0
*245	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	1,0
*248	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
*249	20	24	27	27	26	27	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29

*Amostras de Portugal, precedidas pela sigla IMT

TABELA 10 – Resumo do número de fragmentos de DNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, 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 vermelho. 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	M2903	IPT1	DD8	PP75	*229	*254	*256	*262	*339	*321	*322	*326	*319	*320	BH400	RR065	BH402	BH401	RR069	BH403	RR070	RR061	BH406	RR066		
PH8	36	0,69	0,62	0,61	0,57	0,55	0,62	0,63	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,29	0,61	0,61	0,61	
M2903	29	47	0,63	0,67	0,64	0,61	0,62	0,63	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,61	0,34	0,61	0,61	0,61	
IPT1	24	29	41	0,96	0,88	0,86	0,84	0,82	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,44	0,80	0,80	0,80	
DD8	24	31	40	42	0,91	0,84	0,83	0,80	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,44	0,79	0,79	0,79	
PP75	22	28	36	37	38	0,92	0,89	0,86	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,45	0,85	0,85	0,85	
*229	20	26	33	33	33	34	0,93	0,90	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,89	0,47	0,89	0,89	0,89	
*254	22	26	33	33	33	33	35	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,49	0,96	0,96	0,96	
*256	22	26	32	32	32	32	34	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,49	0,99	0,99	0,99	
*262	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
*339	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
*321	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
*322	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
*326	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
*319	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
*320	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
BH400	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
RR065	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
BH402	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
BH401	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
RR069	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
BH403	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
RR070	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	0,50	33	33	33	
RR061	12	16	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
BH406	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
RR066	21	25	31	31	31	31	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33

*Amostras de Portugal, precedidas pela sigla IMT

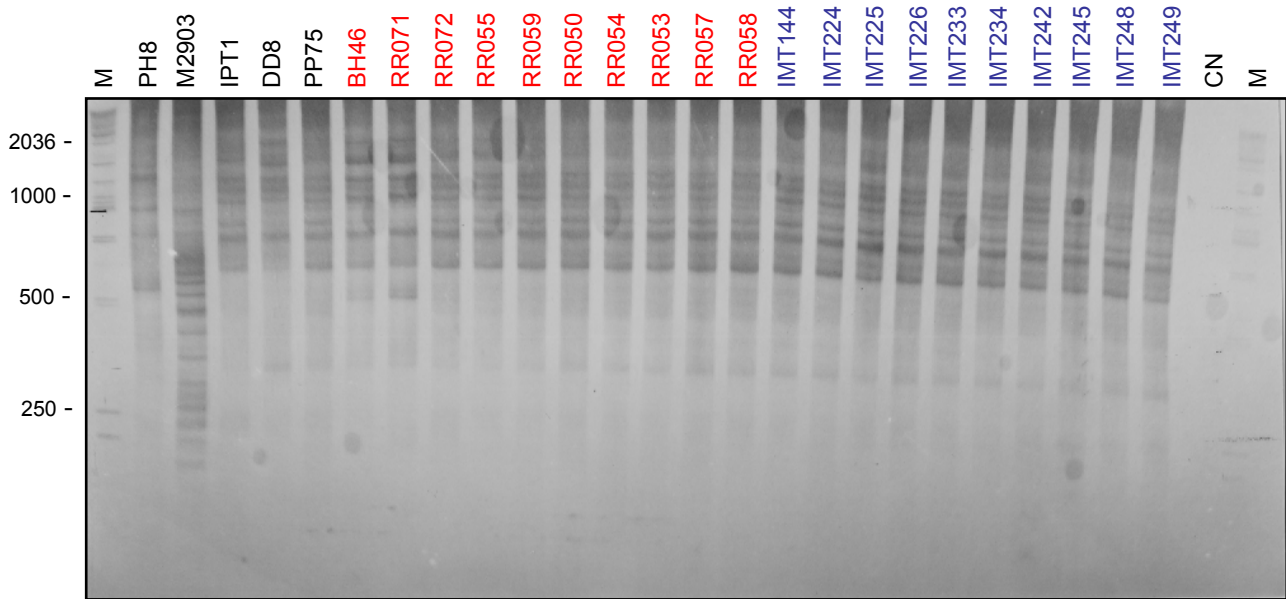


FIGURA 9A – Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador (CA)₈RY, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

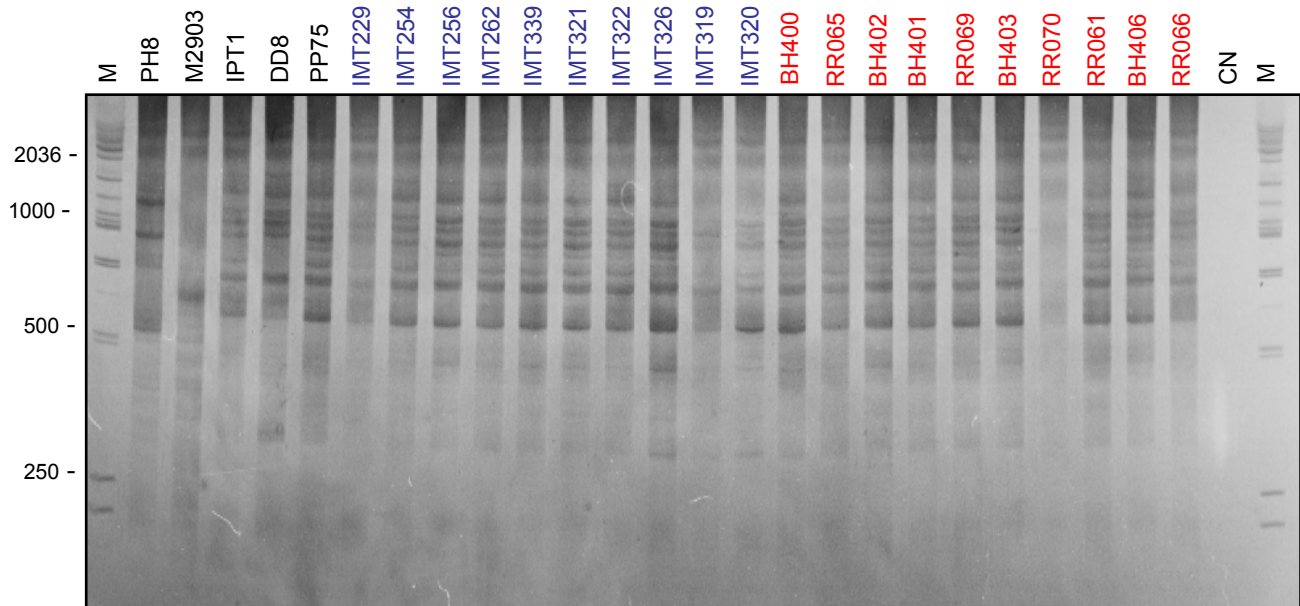


FIGURA 9B – Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador (CA)₈RY, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

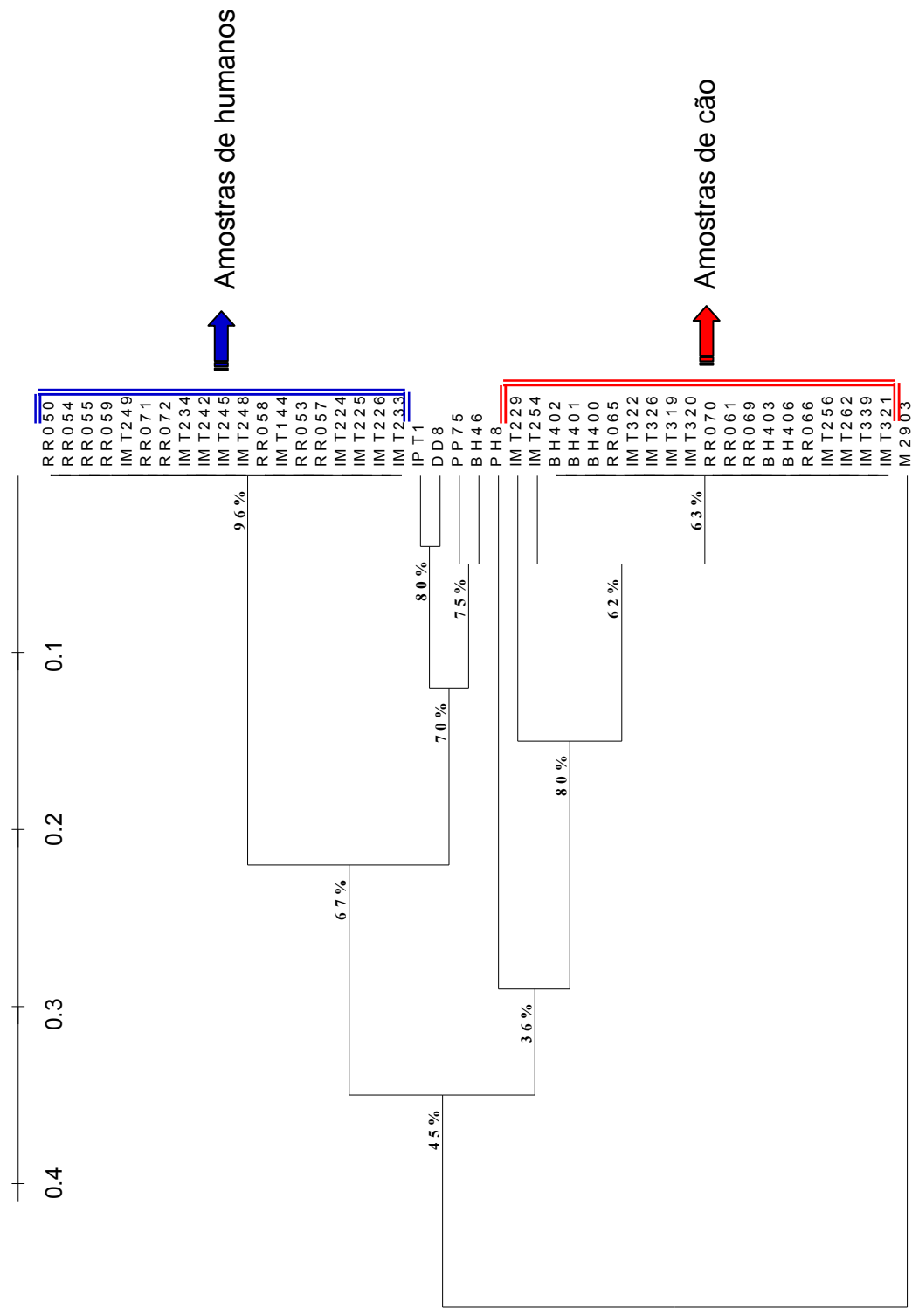


FIGURA 10 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método Treencon for Windows, com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com o iniciador (CA)₈RY. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

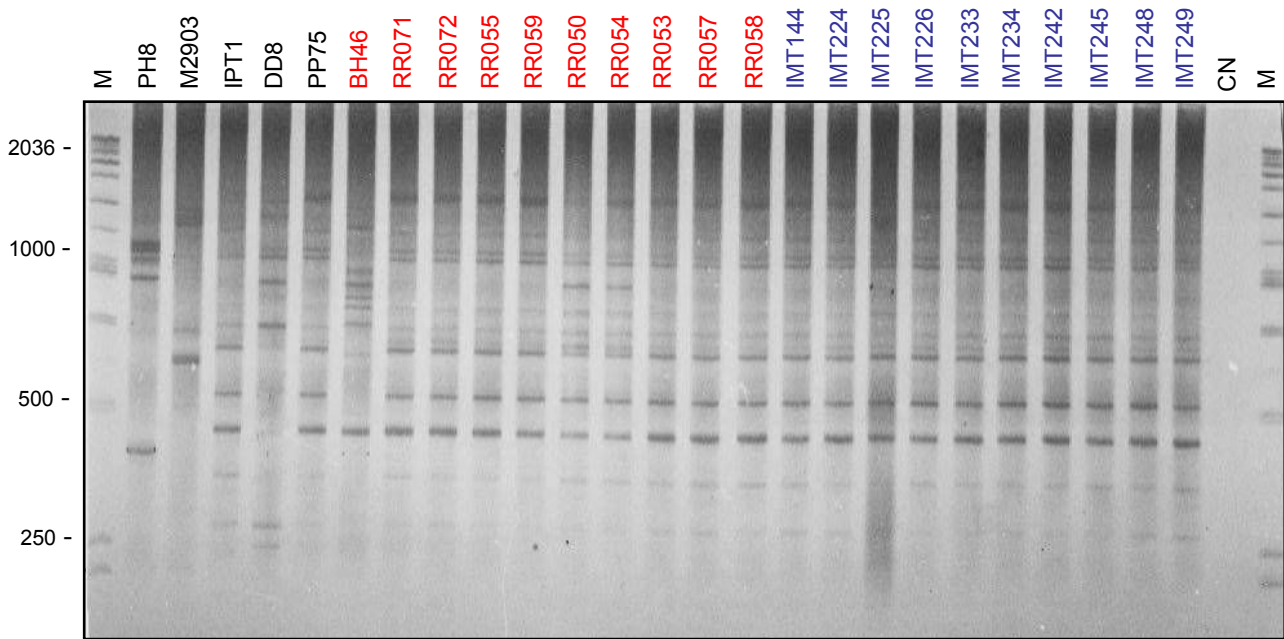


FIGURA 11A – Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador CAA(CT)₆, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

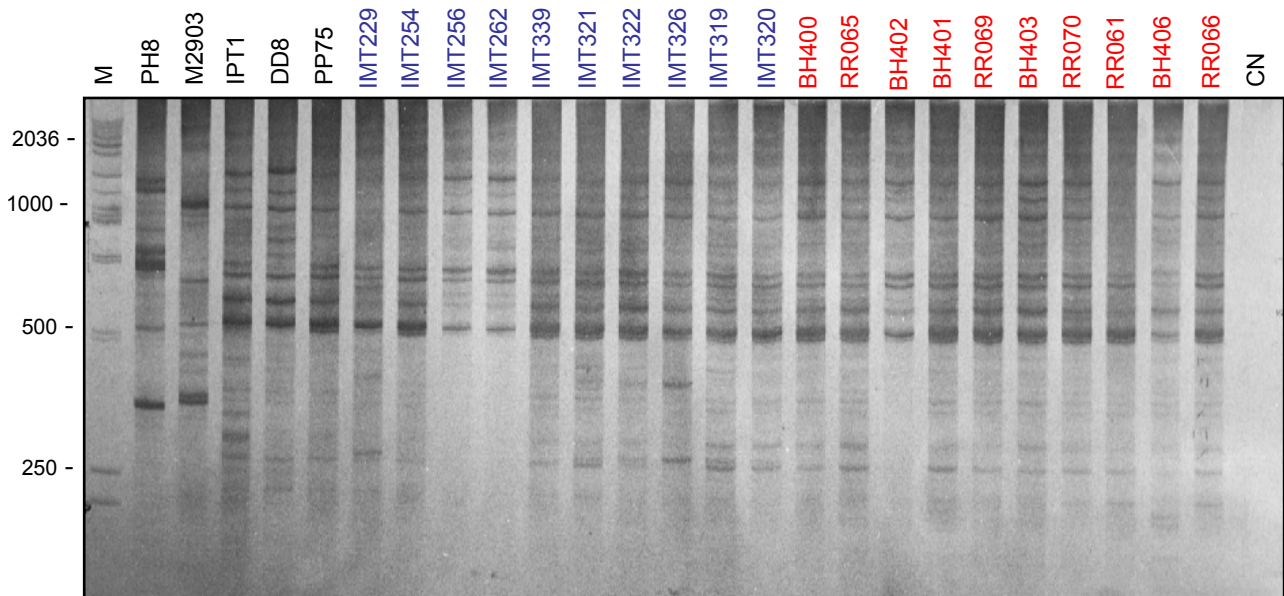


FIGURA 11B – Perfis de SSP-PCR obtidos pela análise do DNA genômico de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência, com o iniciador CAA(CT)₆, em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega 1 Kb); CN= controle negativo, sem DNA.

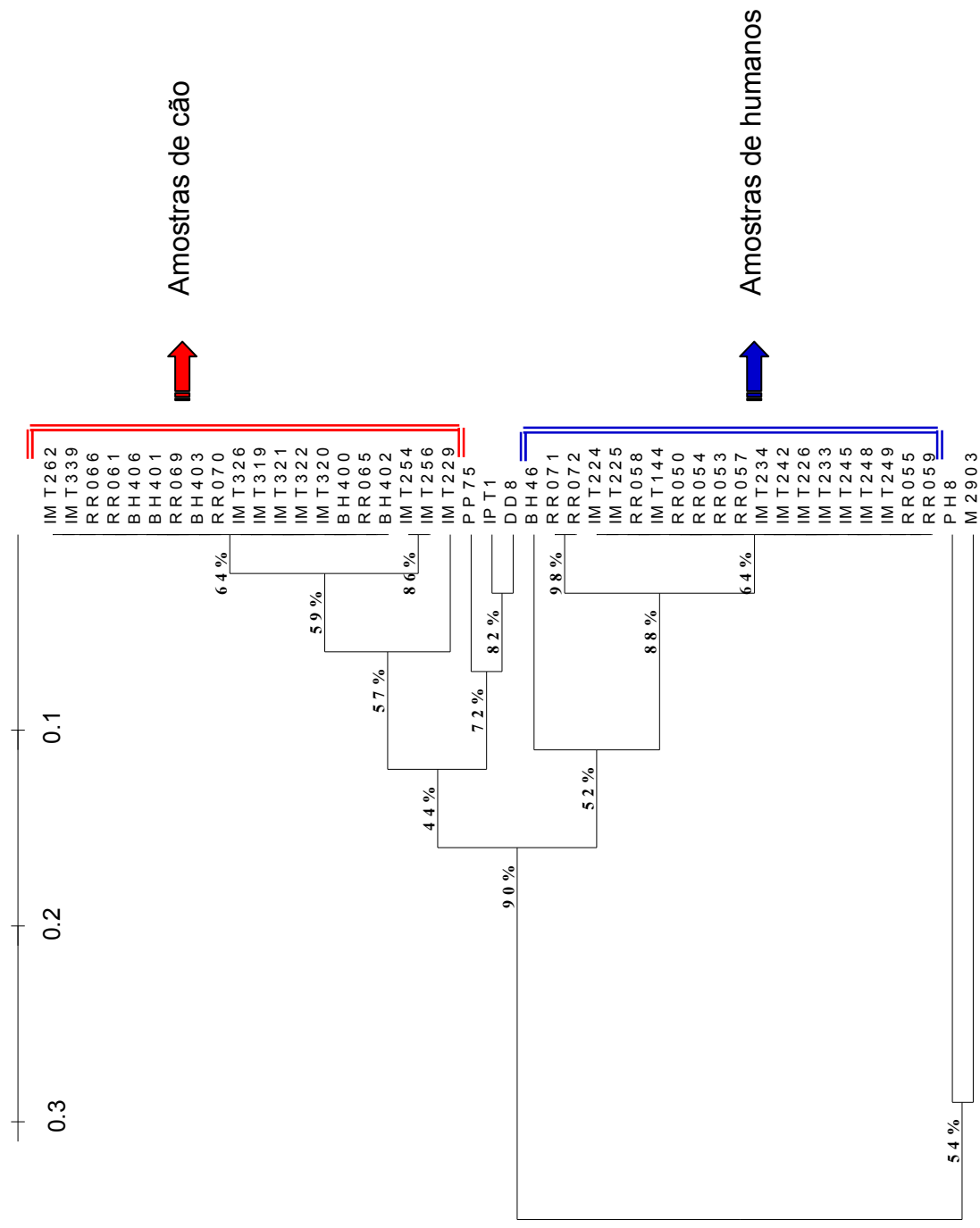


FIGURA 12 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com o iniciador CAA(CT)₆. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

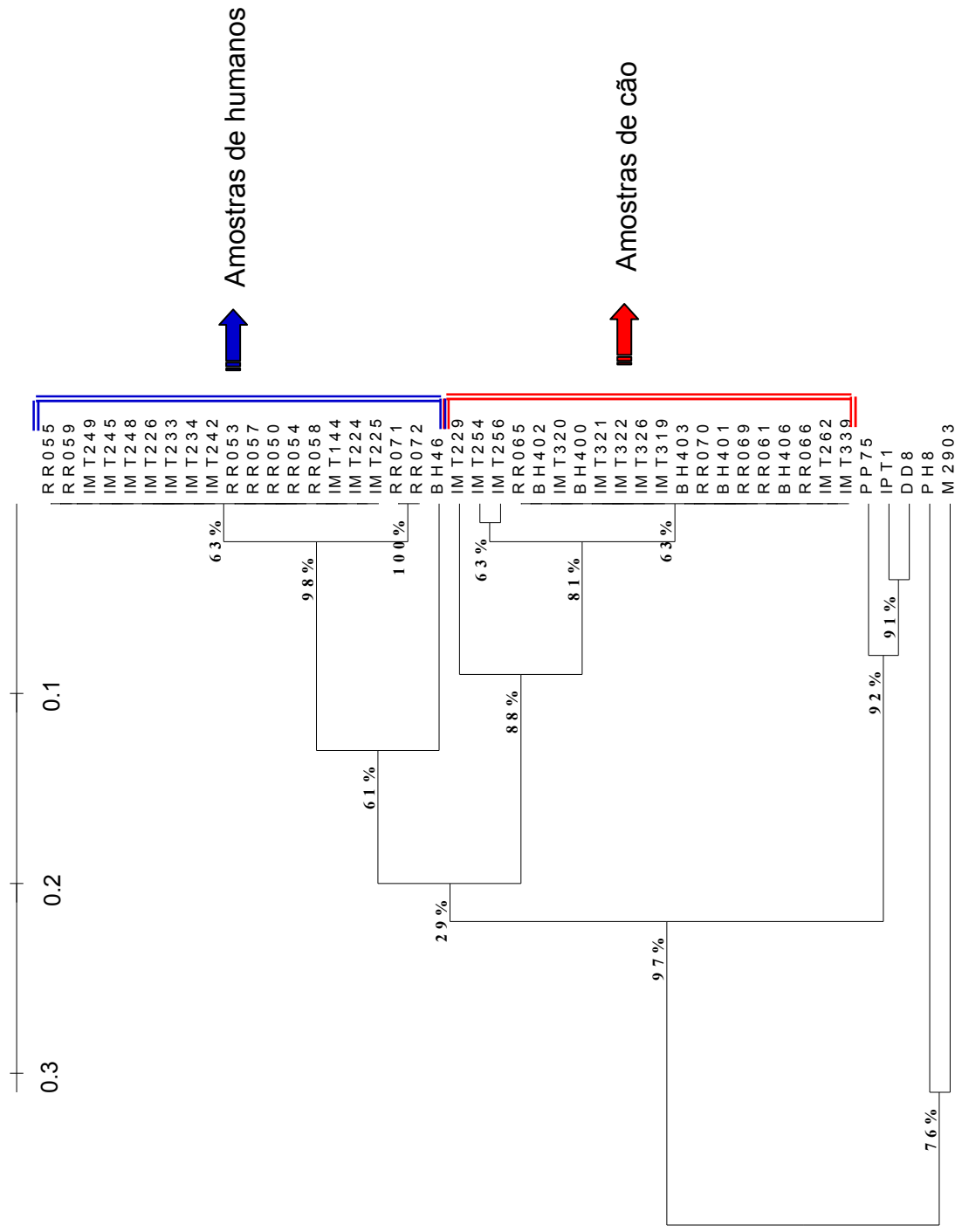


FIGURA 13 - Fenograma consenso das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do Treecon for Windows, com base nos dados gerados pela técnica de SSR-PCR com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

5.4 ANÁLISE ASSOCIADA DOS RESULTADOS OBTIDOS POR RAPD-PCR E SSR-PCR

Os dados obtidos com todos os iniciadores utilizados nas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR foram combinados para construir um fenograma consenso por UPGMA, pelo programa *Treecon*, apresentado na FIGURA 14.

Apesar de mínimas diferenças, o fenograma mostrou grande similaridade com aqueles construídos com base nos produtos de RAPD-PCR (FIGURA 8) e SSR-PCR (FIGURA 13), revelando a separação entre as amostras isoladas de casos humanos e de reservatórios caninos, com 29% de suporte pelo *Bootstrap*.

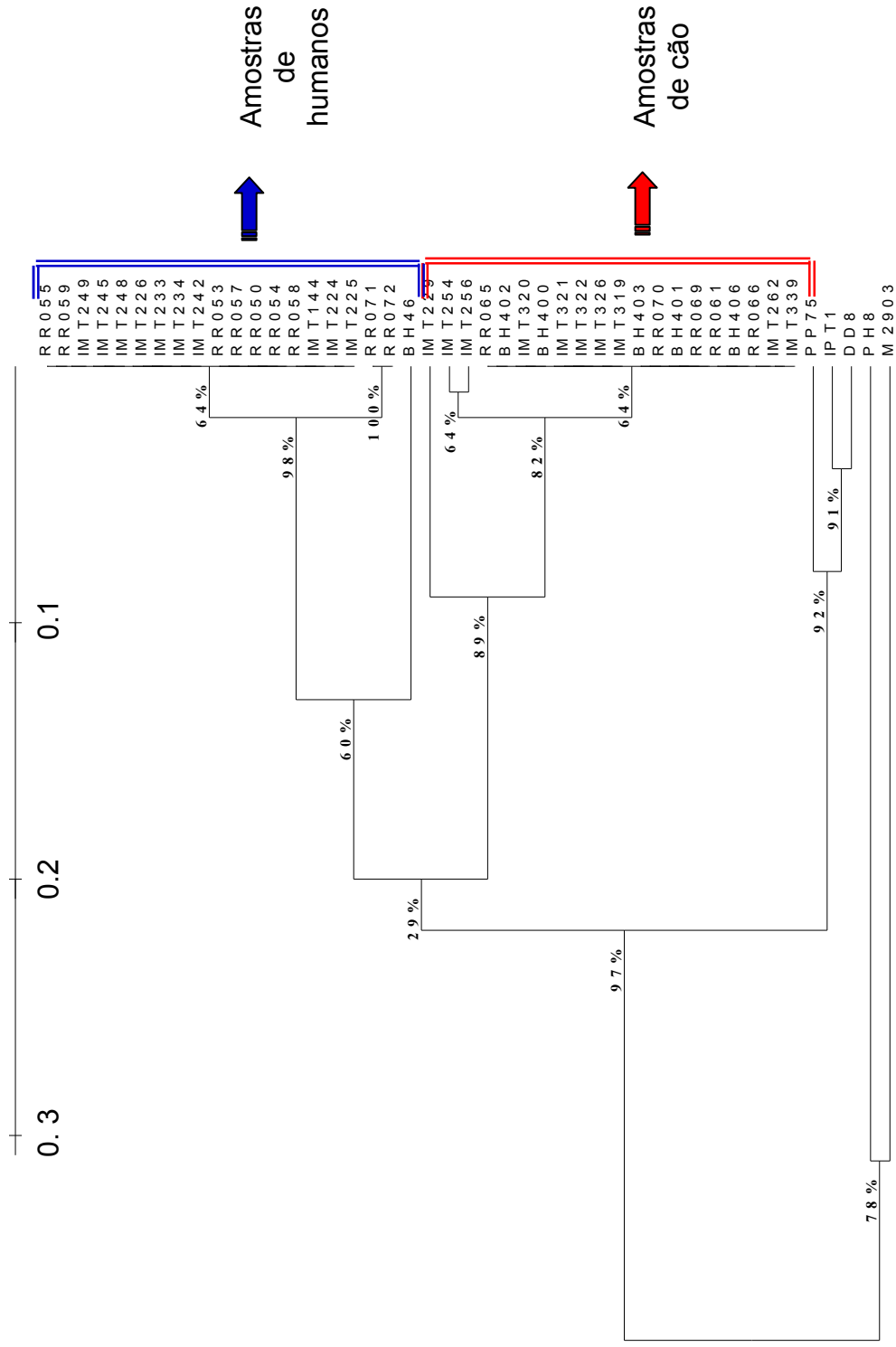


FIGURA 14 - Fenograma consenso das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, construído pelo método de UPGMA do *Treecron for Windows*, com base nos dados gerados pelas técnicas de RAPD com os iniciadores (B07, M13R, M13F, P14, L15, ILO 872, ILO 875, F10 e R15, e SSR-PCR com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

5.5 POLIMORFISMO POR TAMANHO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO – RFLP

Para realização da técnica de RFLP, as seguintes endonucleases de restrição: *Bgl*II, *Dde*I, *Hpa*II, *Rsa*I e *Vsp*I foram utilizadas para digerir os produtos de 447pb do kDNA do parasito, amplificados de todas as amostras estudadas.

Para caracterização das amostras utilizando-se o perfil de restrição do kDNA foram consideradas apenas as bandas principais (mais fortes e bem definidas). Para cada endonuclease foram definidos diferentes perfis de restrição de acordo com o número de bandas observado.

Endonuclease *Bg*II

Utilizando-se a enzima *Bgl*II foi detectada a presença de heterogeneidade genotípica nas amostras de *L. chagasi* (isoladas de reservatórios caninos), bem como entre as amostras de *L. infantum* (isoladas de casos humanos e reservatórios caninos). Foram observados polimorfismos na região de minicírculo do kDNA e dois perfis de restrição ou esquizodemas puderam ser distinguidos (FIGURAS 15A e B). dessa forma, puderam ser definidos como:

TIPO I – Perfil composto de uma banda localizada na altura aproximada de 447pb.

TIPO II – Perfil composto de 2 bandas: uma localizada acima de 234pb e outra acima de 194pb.

As amostras de referência IPT1 e PP75 apresentaram um perfil de restrição do Tipo I.

O fenograma construído pela análise de agrupamento baseada nos perfis de PCR-RFLP com a endonuclease *Bgl*II de todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 16.

	<i>Leishmania chagasi</i>		<i>Leishmania infantum</i>	
	Humanos	Cão	Humanos	Cão
TIPO I	Todas as amostras	BH400 BH401 BH406 RR066	IMT242 IMT245	IMT229 IMT254 IMT256 IMT262 IMT339 IMT321 IMT322 IMT326 IMT319
TIPO II	-	RR065 BH402 RR069 RR061 BH403 RR070	IMT144 IMT224 IMT225 IMT226 IMT233 IMT234 IMT248 IMT249	IMT320

QUADRO 9 – Perfis de restrição observados com a endonuclease *Bgl*II

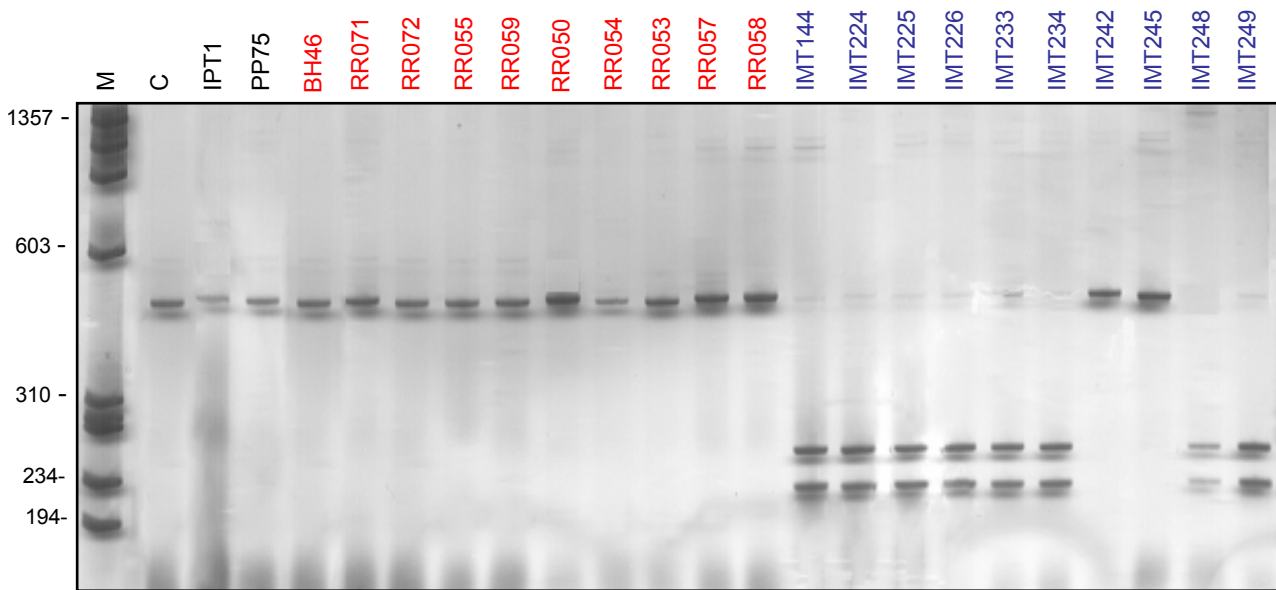


FIGURA 15A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Bgl*III em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). C= Controle da reação, DNA sem corte.

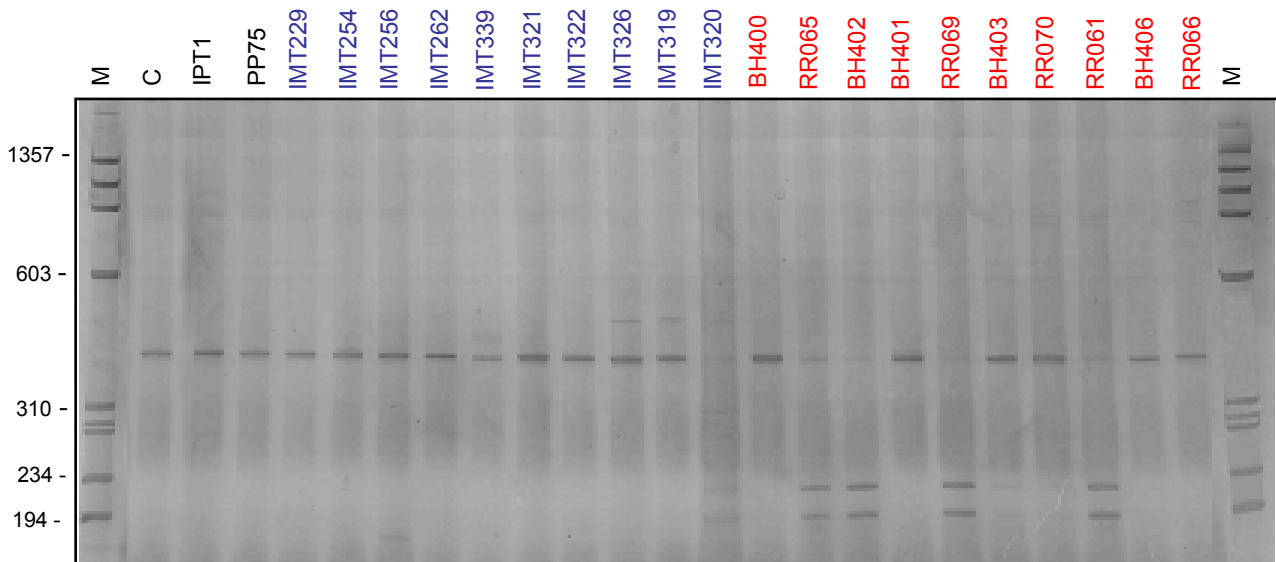


FIGURA 15B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Bgl*III em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). C= Controle da reação, DNA sem corte.

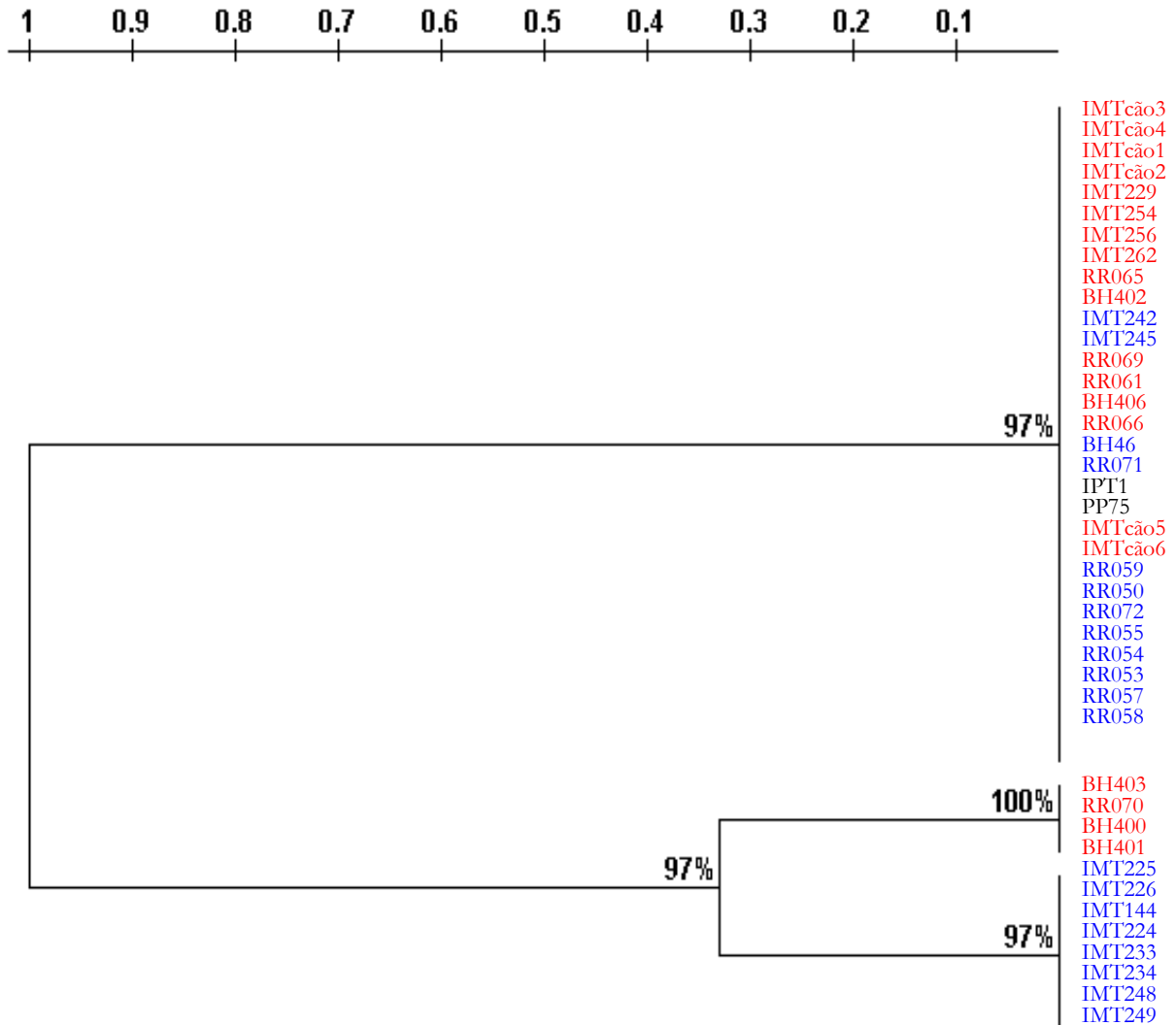


FIGURA 16 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição *Bgl*III. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

Endonuclease *DdeI*

Utilizando-se a enzima *DdeI* foi detectada a presença de heterogeneidade genotípica nas amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* (isoladas de casos humanos). Foram observados polimorfismos na região de minicírculo do kDNA e três perfis de restrição ou esquizodemas puderam ser distinguidos. (FIGURAS 17A e B).

TIPO I – Perfil com banda de melhor resolução localizada localizada acima de 310pb.

TIPO II – Perfil simples apresentando uma única banda localizada aproximadamente em 447pb.

TIPO III– Perfil composto de 2 bandas: uma localizada acima de 310pb e outra um pouco acima de 194pb.

As amostras de referência IPT1 e PP75 apresentaram um perfil de restrição do Tipo I.

O fenograma construído pela análise de agrupamento baseada nos perfis de PCR-RFLP com a endonuclease *DdeI* de todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 18.

	<i>Leishmania chagasi</i>		<i>Leishmania infantum</i>	
	Humanos	Cão	Humanos	Cão
TIPO I	RR071 RR050 RR058	-	IMT242 IMT245	Todas as amostras
TIPO II	-	Todas as amostras	IMT144 IMT224 IMT225 IMT226 IMT233 IMT234 IMT248 IMT249	-
TIPO III	BH46 RR072 RR055 RR059 RR054 RR053 RR057	-	-	-

QUADRO 10 - Perfis de restrição observados com a endonuclease *Ddel*

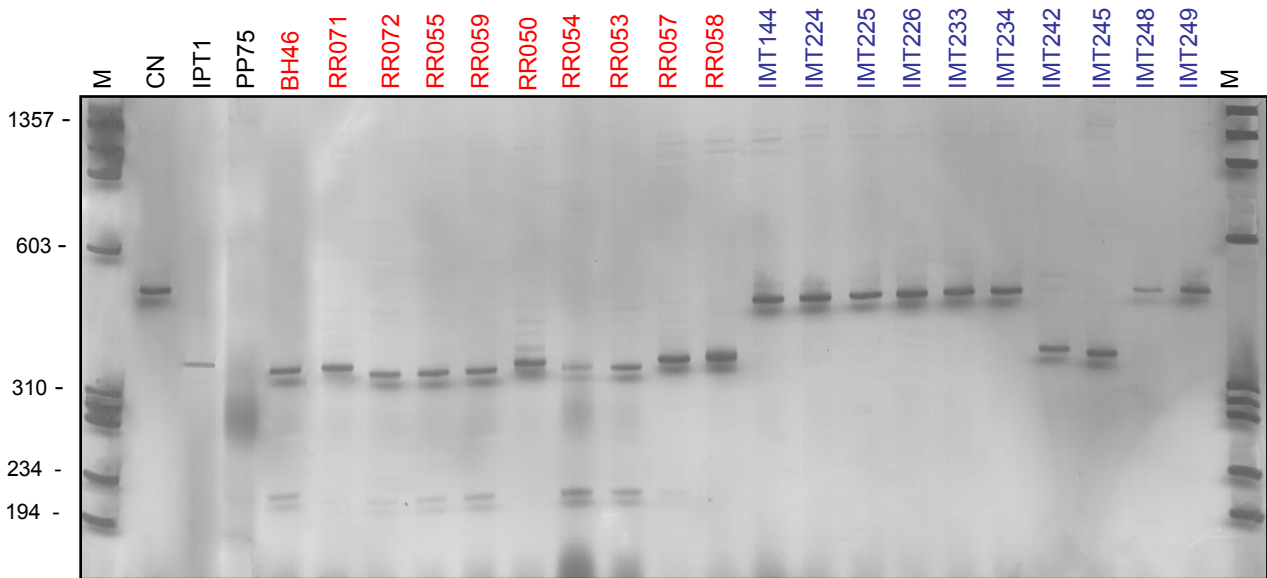


FIGURA 17A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Ddel* em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

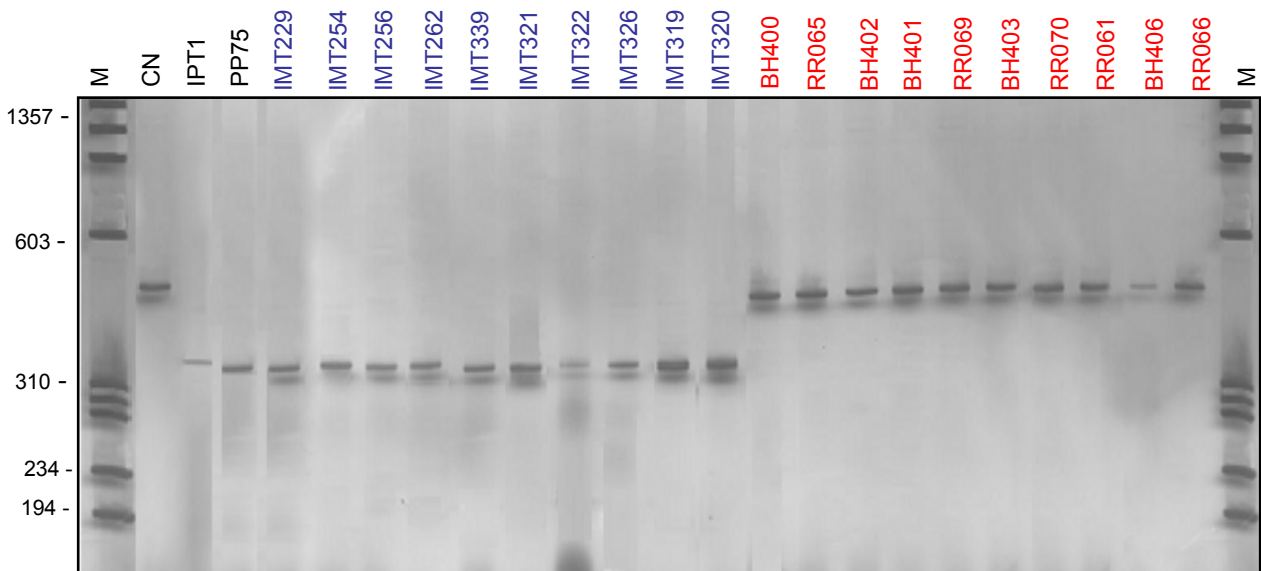


FIGURA 17B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Ddel* em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

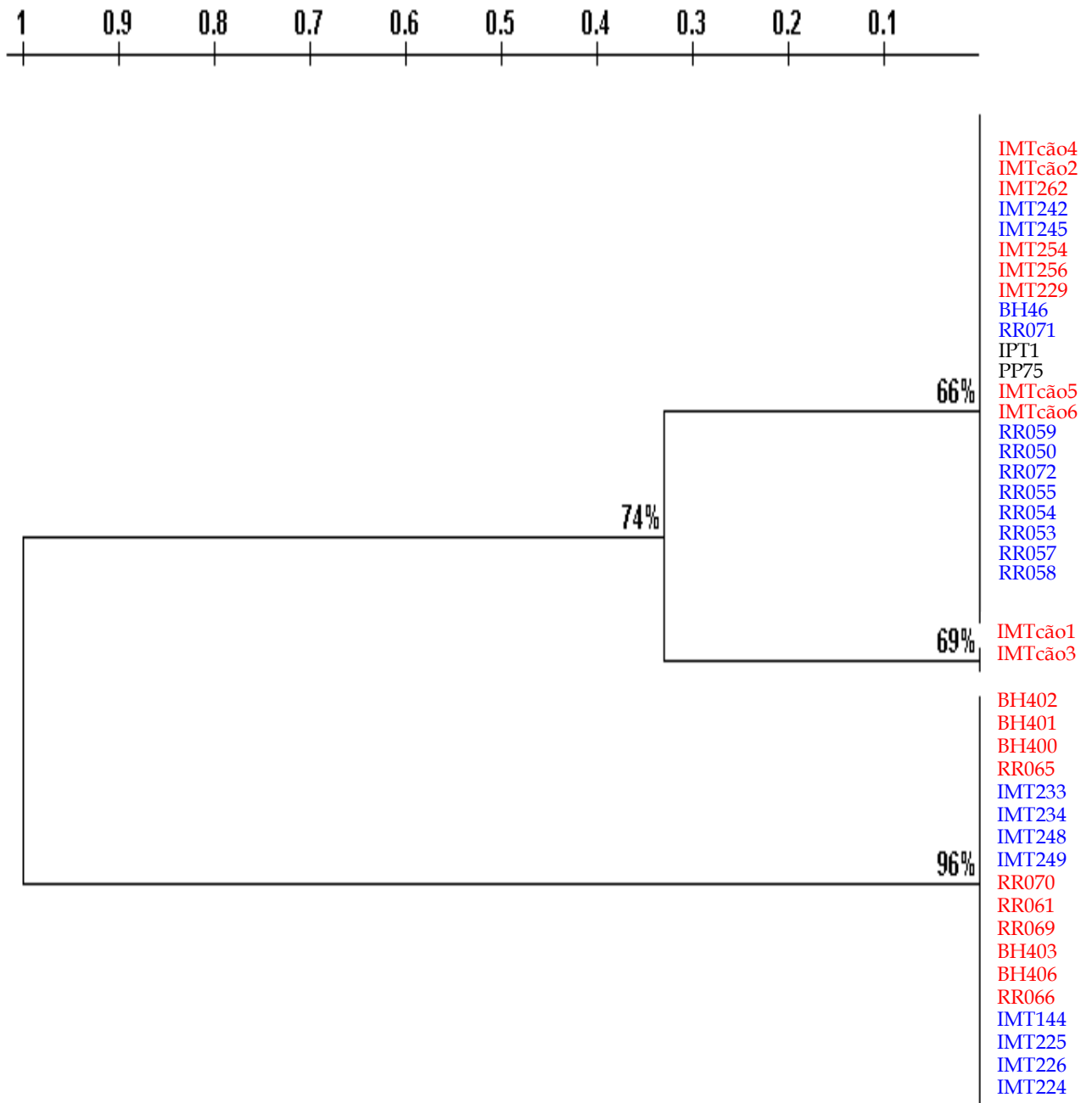


FIGURA 18 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição *DdeI*. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

Endonuclease *HpaII*

Quando utilizada a enzima *HpaII* foi detectada a presença de homogeneidade genotípica em todas as amostras isoladas no Brasil e em Portugal. Com esta endonuclease não foram observados polimorfismos na região de minicírculo do kDNA e um único perfil de restrição ou esquizodema foi observado, indicando que as amostras não foram cortadas com essa endonuclease (FIGURAS 19A e B).

TIPO I – Perfil apresentando uma única banda na altura de aproximadamente 447pb.

As amostras de referência IPT1 e PP75 apresentaram o perfil de restrição do Tipo I.

O fenograma construído pela análise de agrupamento baseada nos perfis de PCR-RFLP com a endonuclease *HpaII* de todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 20.

	<i>Leishmania chagasi</i>		<i>Leishmania infantum</i>	
	Humanos	Cão	Humanos	Cão
TIPO I	Todas as amostras	Todas as amostras	Todas as amostras	Todas as amostras

QUADRO 11 - Perfis de restrição observados com a endonuclease *HpaII*

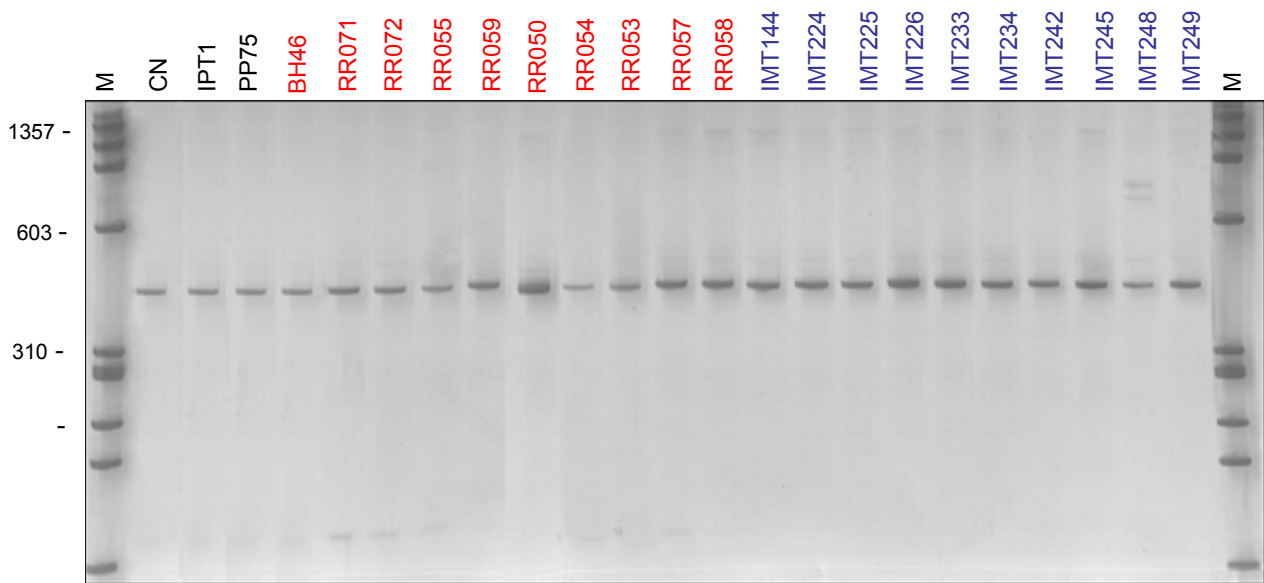


FIGURA 19A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Hpa*II em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

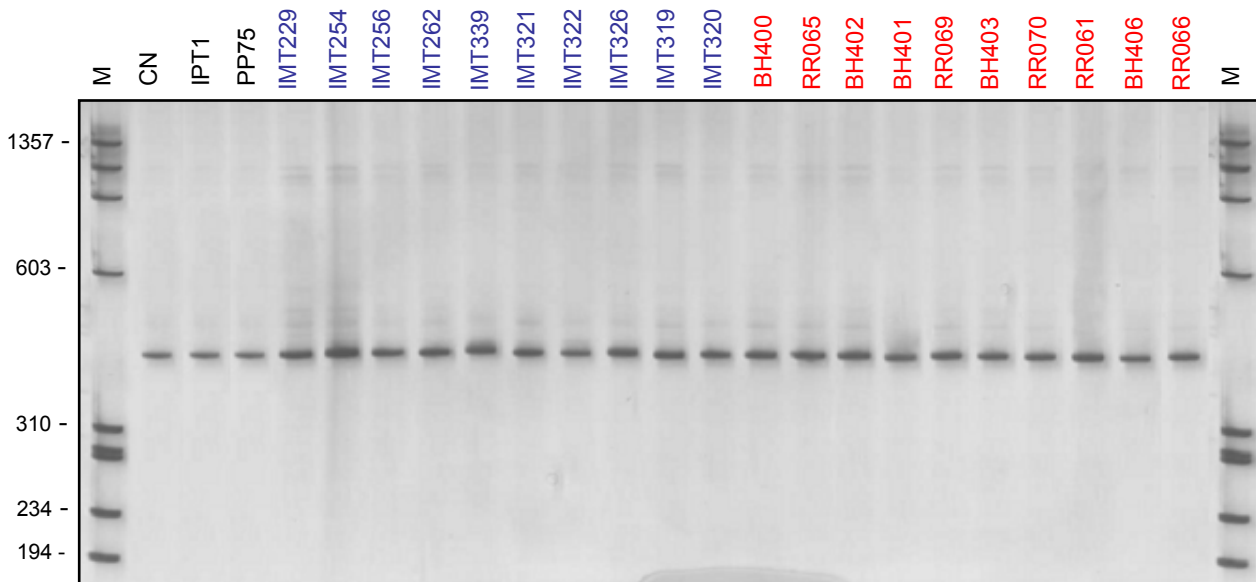


FIGURA 19B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Hpa*II em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

IMTcão4
IMTcão2
IMT262
IMT242
IMT245
IMT254
IMT256
IMT229
BH46
RR071
IPT1
PP75
IMTcão5
IMTcão6
RR059
RR050
RR072
RR055
RR054
RR053
RR057
RR058
IMTcão1
IMTcão3
BH402
BH401
BH400
RR065
IMT233
IMT234
IMT248
IMT249
RR070
RR061
RR069
BH403
BH406
RR066
IMT144
IMT225
IMT226
IMT224

FIGURA 20 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição *Hpa*II. As amostras de referência estão na cor preta.

Endonuclease *RsaI*

Para a enzima *RsaI* foi detectada a presença de heterogeneidade genotípica nas amostras de *L. chagasi* (isoladas de casos humanos). Foram observados polimorfismos na região de minicírculo do kDNA e dois perfis de restrição ou esquizodemas puderam ser distinguidos (FIGURAS 21A e B).

TIPO I – Perfil apresentando duas bandas próximas localizadas entre 310pb e 194pb.

TIPO II – Perfil apresentando três bandas entre 310 e 194pb.

As amostras de referência IPT1 e PP75 apresentaram o perfil de restrição Tipo I.

O fenograma construído pela análise de agrupamento baseada nos perfis de PCR-RFLP com a endonuclease *RsaI* de todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 22.

	<i>Leishmania chagasi</i>		<i>Leishmania infantum</i>	
	Humanos	Cão	Humanos	Cão
TIPO I	BH46 RR071 RR050 RR057 RR058	Todas as amostras	Todas as amostras	Todas as amostras
TIPO II	RR072 RR055 RR059 RR054 RR053	-	-	-

QUADRO 12 - Perfis de restrição observados com a endonuclease *RsaI*.

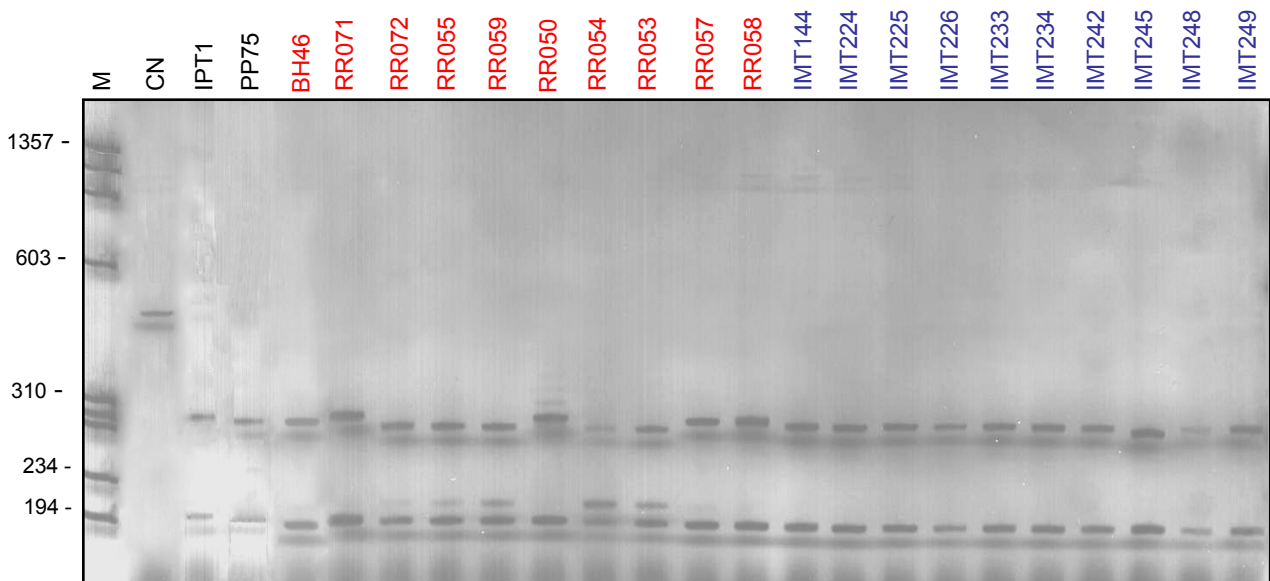


FIGURA 21A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *RsaI* em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

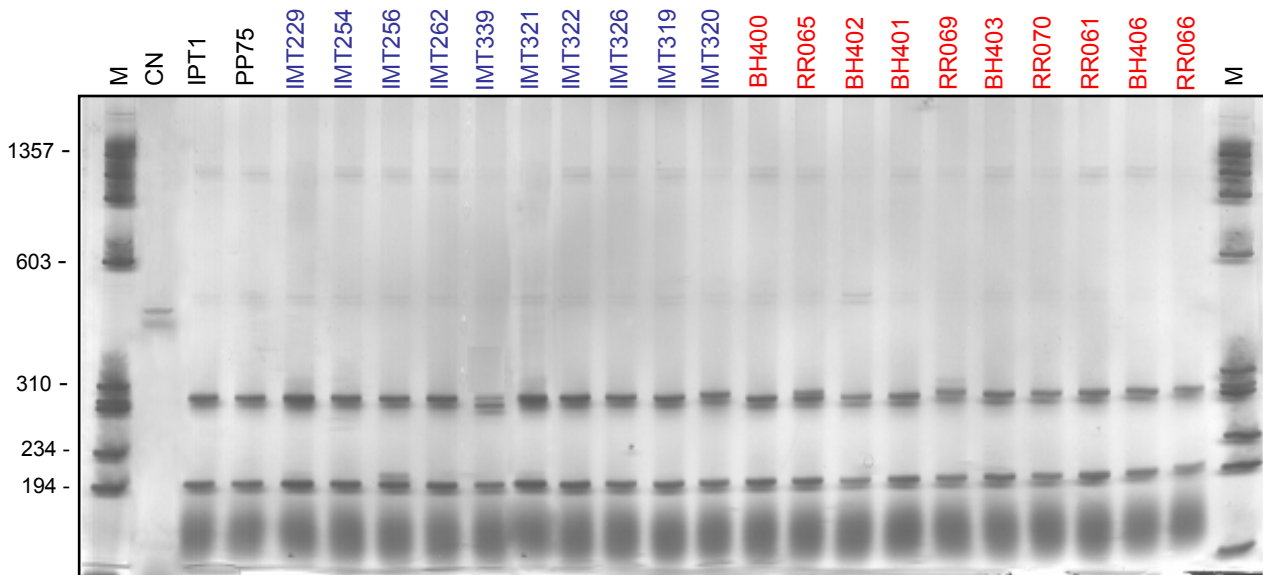


FIGURA 21B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *RsaI* em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

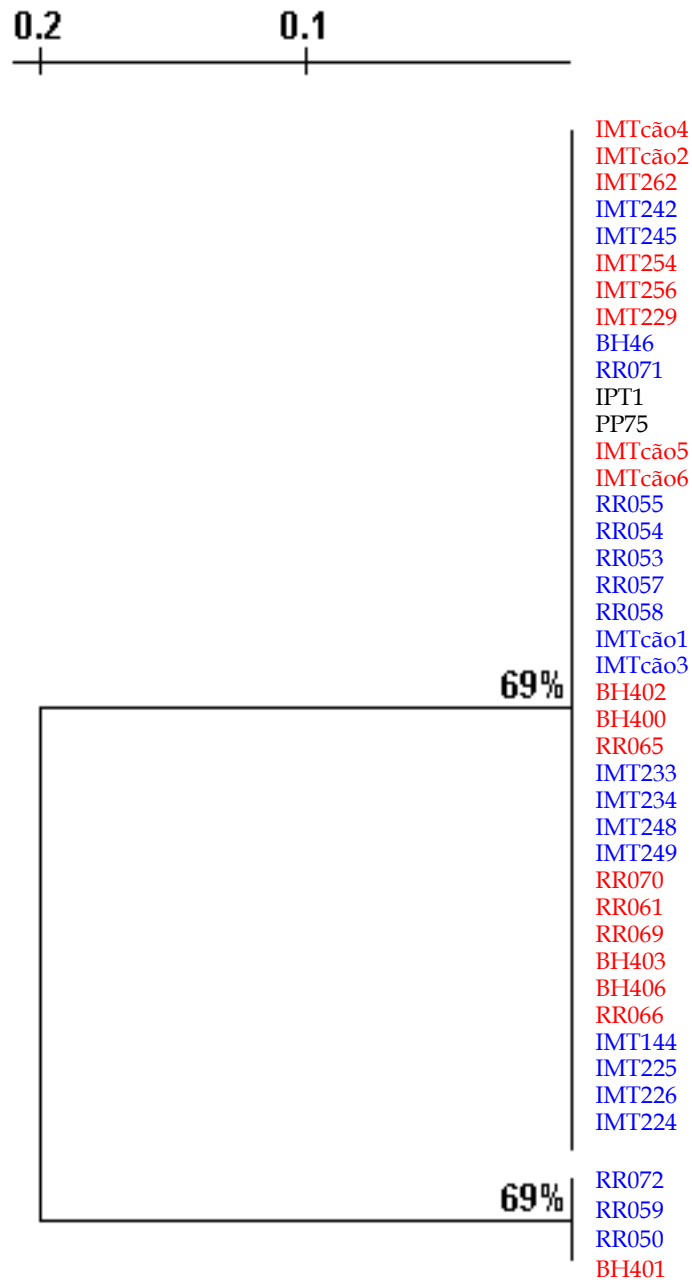


FIGURA 22 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição *RsaI*. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

Endonuclease *VspI*

Utilizando-se a enzima *VspI* foi detectada a presença de heterogeneidade genotípica nas amostras de *L. chagasi* (isoladas reservatórios caninos) e *L. infantum* (isoladas de casos humanos). Foram observados polimorfismos na região de minicírculo do kDNA e dois perfis de restrição ou esquizodemas puderam ser distinguidos (FIGURAS 23A e B).

TIPO I – Perfil apresentando duas bandas próximas localizadas abaixo de 194pb.

TIPO II – Perfil apresentando três bandas próximas localizadas abaixo de 234pb.

As amostras de referência IPT1 e PP75 apresentaram o perfil de restrição do Tipo I.

O fenograma construído pela análise de agrupamento baseada nos perfis de PCR-RFLP com a endonuclease *VspI* de todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 24.

O fenograma consenso construído pela análise de agrupamento baseada nos perfis de PCR-RFLP com todas as endonucleases (*BglII*, *DdeI*, *HpaII*, *RsaI* e *VspI*) com todas as amostras do estudo está apresentado na FIGURA 25.

	<i>Leishmania chagasi</i>		<i>Leishmania infantum</i>	
	Humanos	Cão	Humanos	Cão
TIPO I	Todas as amostras	BH400 RR065 BH402 RR069 RR070 BH406 RR066 BH401	IMT144 IMT224 IMT226 IMT249	-
TIPO II	-	BH403 RR061	IMT225 IMT233 IMT234 IMT245 IMT242 IMT248	Todas as amostras

QUADRO 13 - Perfis de restrição observados com a endonuclease *Vspl*.

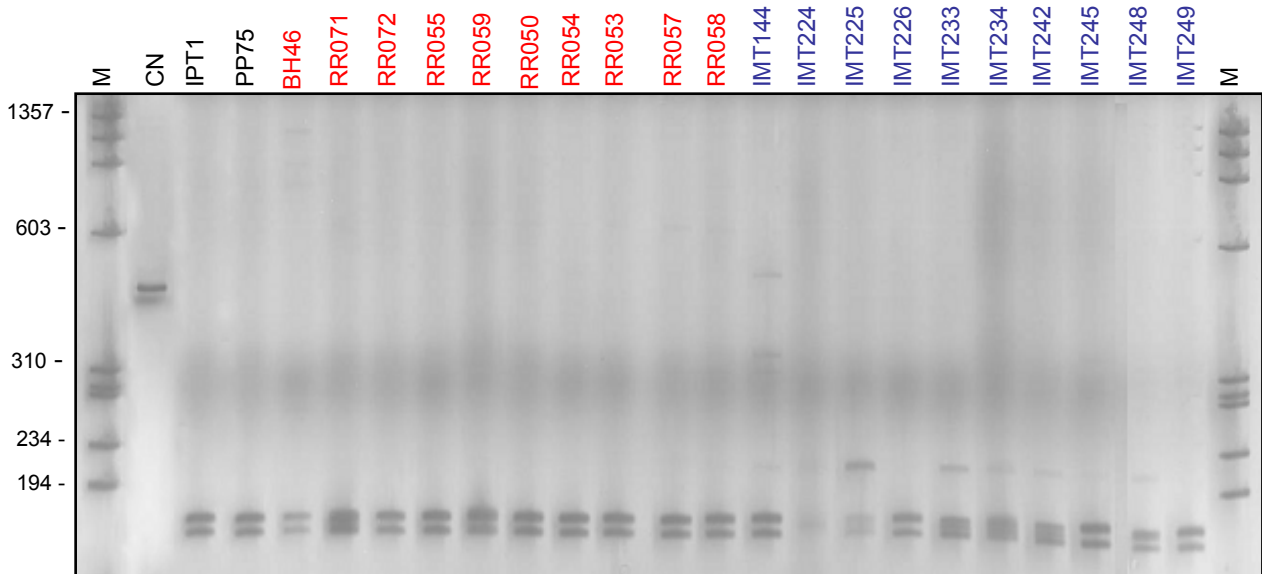


FIGURA 23A - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Vspl* em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

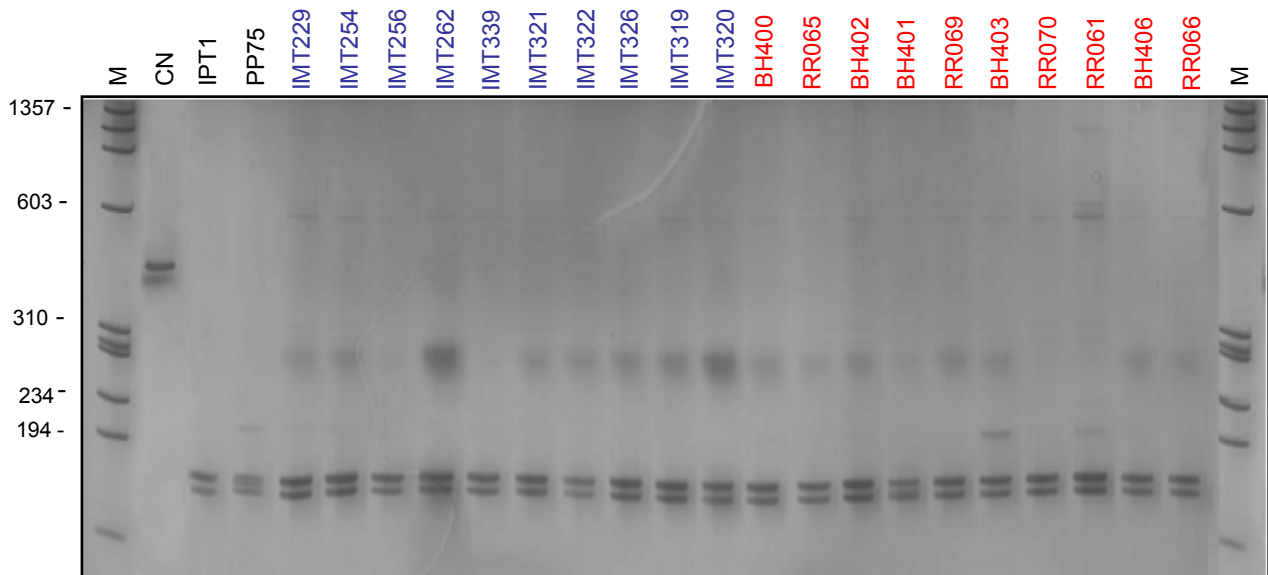


FIGURA 23B - Perfis de PCR-RFLP de kDNA de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos, no Brasil e em Portugal, e das amostras de referência IPT1 (*L. infantum*) e PP75 (*L. chagasi*), digeridas com a endonuclease *Vspl* em gel de poliacrilamida a 5%, corado com nitrato de prata. M= marcador de peso molecular (Promega ØX174). CN= Controle negativo, sem corte.

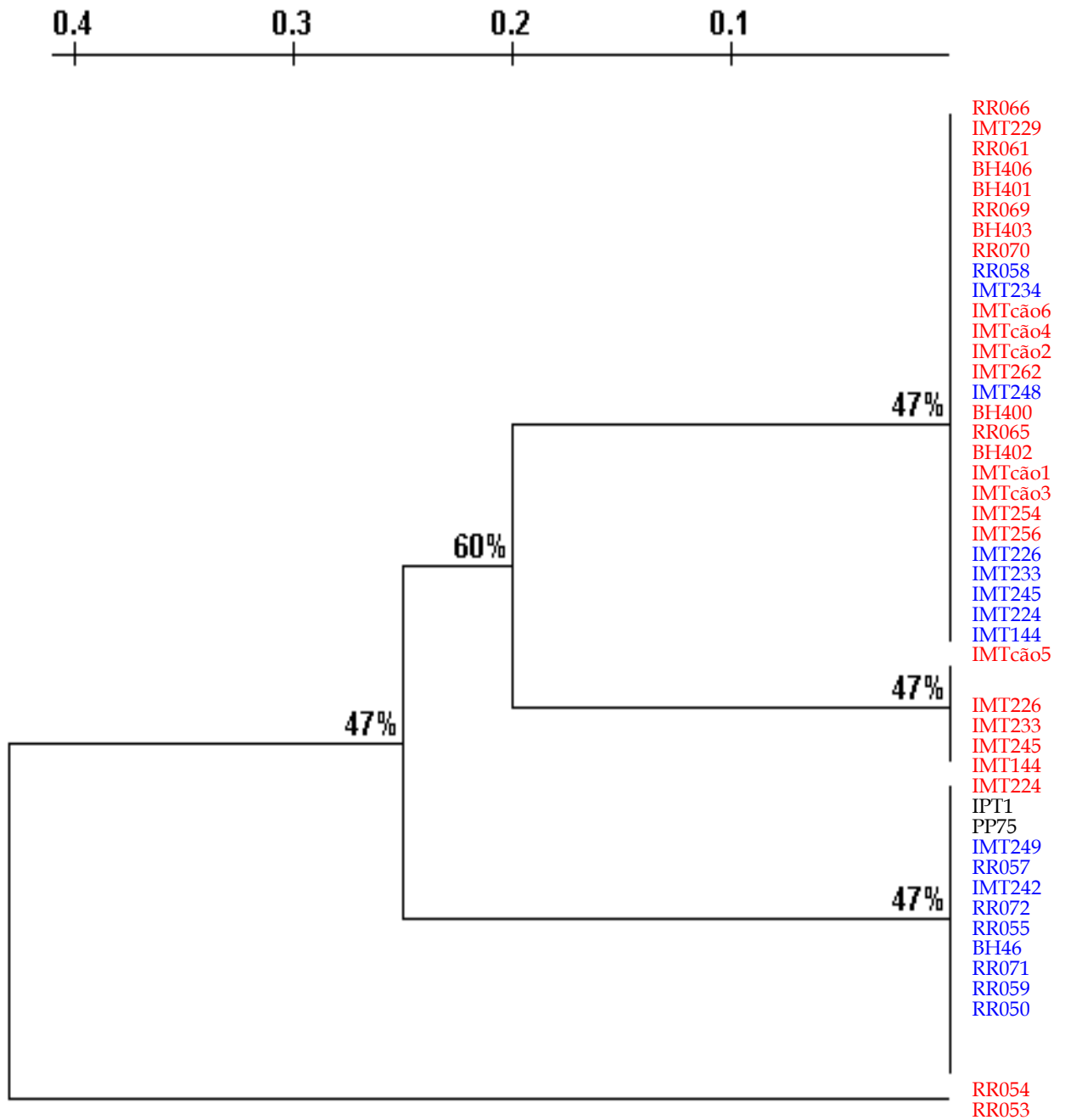


FIGURA 24 - Fenograma das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pela técnica de PCR-RFLP com a endonuclease de restrição *VspI*. Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

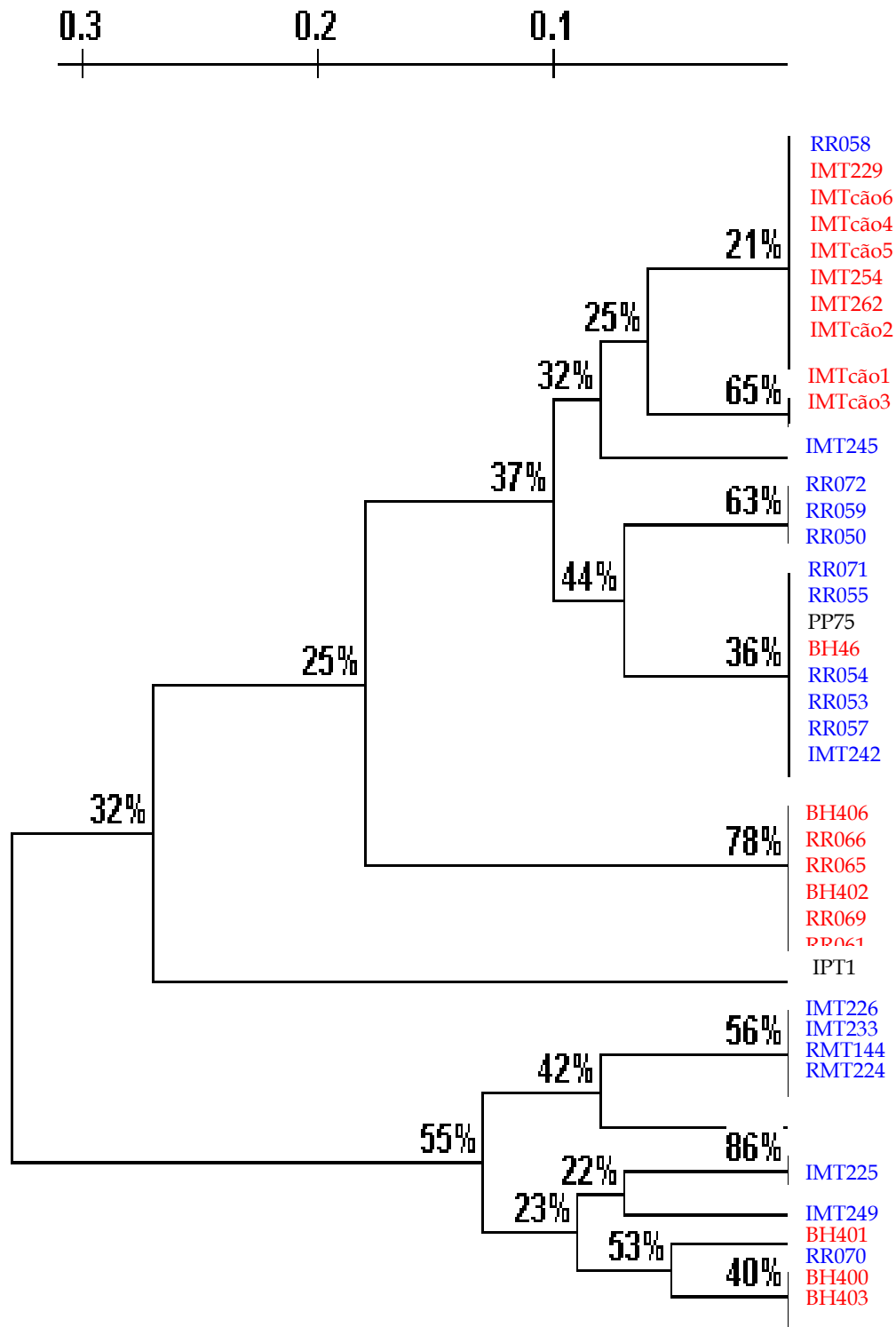


FIGURA 25 - Fenograma consenso das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de casos humanos (em azul) e reservatórios caninos (em vermelho), construído pelo método de UPGMA do *Treecon for Windows*, com base nos dados gerados pelas técnicas de PCR-RFLP com as endonucleases (*Bgl*II, *Dde*I, *Hpa*II, *Rsa*I e *Vsp*I). Os números nos braços indicam as porcentagens de 1000 reamostragens pelo teste de *Bootstrap*.

Para melhor visualização dos resultados obtidos com as endonucleases de restrição, os dados foram agrupados em um único quadro para as amostras de casos humanos (QUADRO 14) e reservatórios caninos (QUADRO 15). Cada perfil observado foi denominado por uma letra para cada endonuclease: *Bgl*II (A), *Dde*I (B), *Hpa*II (C), *Rsa*I (D) e *Vsp*I (E).

AMOSTRAS	<i>BglII</i>	<i>Ddel</i>	<i>HpaII</i>	<i>RsaI</i>	<i>VspI</i>
IPT1	A1	B1	C1	D1	E1
PP75	A1	B1	C1	D1	E1
BH46	A1	B3	C1	D1	E1
RR072	A1	B3	C1	D2	E1
RR055	A1	B3	C1	D2	E1
RR059	A1	B3	C1	D2	E1
RR071	A1	B1	C1	D1	E1
RR050	A1	B1	C1	D1	E1
RR053	A1	B3	C1	D2	E1
RR058	A1	B1	C1	D1	E1
RR057	A1	B3	C1	D1	E1
RR054	A1	B3	C1	D2	E1
IMT245	A1	B1	C1	D1	E2
IMT144	A2	B2	C1	D1	E1
IMT242	A1	B1	C1	D1	E2
IMT248	A2	B2	C1	D1	E2
IMT249	A2	B2	C1	D1	E1
IMT224	A2	B2	C1	D1	E1
IMT226	A2	B2	C1	D1	E1
IMT234	A2	B2	C1	D1	E2
IMT233	A2	B2	C1	D1	E2
IMT225	A2	B2	C1	D1	E2

Leishmania chagasi

Leishmania infantum

QUADRO 14 – Perfis de restrição obtidos com as diferentes endonucleases para todas as amostras isoladas de casos humanos, do Brasil e de Portugal.

AMOSTRAS	<i>Bgl</i> II	<i>Ddel</i>	<i>Hpa</i> II	<i>Rsa</i> I	<i>Vsp</i> I
IPT1	A1	B1	C1	D1	E1
PP75	A1	B1	C1	D1	E1
RR070	A1	B2	C1	D1	E1
RR065	A2	B2	C1	D1	E1
BH401	A1	B2	C1	D1	E1
RR061	A2	B2	C1	D1	E2
RR069	A2	B2	C1	D1	E1
BH402	A2	B2	C1	D1	E1
BH403	A1	B2	C1	D1	E2
BH400	A1	B2	C1	D1	E1
BH406	A1	B2	C1	D1	E1
RR066	A1	B2	C1	D1	E1
IMT319	A1	B1	C1	D1	E2
IMT320	A2	B1	C1	D1	E2
IMT254	A1	B1	C1	D1	E2
IMT256	A1	B1	C1	D2	E2
IMT262	A1	B1	C1	D1	E2
IMT321	A1	B1	C1	D1	E2
IMT322	A1	B1	C1	D1	E2
IMT229	A1	B1	C1	D1	E2
IMT339	A1	B1	C1	D1	E2
IMT326	A1	B1	C1	D1	E2

Leishmania chagasi

Leishmania infantum

QUADRO 15– Perfis de restrição obtidos com as diferentes endonucleases para todas as amostras isoladas de reservatórios caninos, do Brasil e de Portugal.

A análise dos resultados gerados pela técnica de RFLP-PCR não mostrou separação das amostras seja por hospedeiro ou origem geográfica, diferindo dos dados obtidos com as técnicas de RAPD e SSR-PCR, embora tenha evidenciado polimorfismos, que podem ser observados em algumas amostras, quando utilizadas as enzimas *BglI*, *DdeI*, *RsaI* e *VspI*.

Além dos resultados obtidos a partir dos produtos amplificados com os iniciadores MC1 e MC2 apresentados anteriormente, foi realizada a amplificação de todas as amostras com os iniciadores LV1 e LV2 e posterior digestão dos fragmentos obtidos com as mesmas enzimas de restrição usadas. Não foram observados fragmentos de DNA, indicando que possivelmente a região amplificada pelos iniciadores LV1 e LV2 não apresentava sítio de reconhecimento para as enzimas escolhidas (Resultados não mostrados).

5.6 LOW - STRINGENCY SINGLE SPECIFIC PRIMER PCR - LSSP-PCR

Na fase inicial deste estudo, foi procurado identificar o iniciador que fosse capaz de gerar um perfil de bandas constituído por múltiplos fragmentos, a partir da análise do fragmento de 447pb do minicírculo do kDNA de *L. chagasi* e *L. infantum*, previamente amplificados pelos iniciadores específicos MC1 e MC2. Dentre os dois iniciadores testados, apenas o iniciador MC1 foi capaz de gerar um perfil de bandas informativo.

A FIGURA 26 representa os perfis de bandas obtidos pela técnica de LSSP-PCR, utilizando-se o iniciador MC1 para análise do fragmento de 447pb, obtido a partir da amplificação específica de DNA extraídos das amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas de casos humanos e mantidas em cultura. Perfis complexos e constituídos por múltiplas bandas, denominados de “assinaturas de kDNA”, foram obtidos para a maioria das amostras analisadas.

O QUADRO 19, apresenta o tamanho molecular dos principais fragmentos constituintes dos perfis de LSSP-PCR, correspondentes à análise dos fragmentos de kDNA de *L. chagasi* e *L. infantum* amplificados a partir de amostras de DNA genômico de amostras isoladas de casos humanos. Esses valores foram calculados pela utilização do software *LabImage*, tomando-se como referência os fragmentos constituintes do Padrão de Peso Molecular 1Kb Ladder (Promega).

De acordo com o compartilhamento de bandas de mesmo peso molecular, dez perfis de kDNA (I a X) foram obtidos pela análise de LSSP-PCR do fragmento de kDNA amplificado das amostras de *Leishmania sp.*, que foram isoladas de casos humanos (FIGURA 26 e QUADRO 16). A maioria das amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* analisadas, apresentaram padrões de kDNA que possibilitaram sua

distribuição dentro dos perfis de I a VI, exceção feita à amostra de referência IPT1, às amostras BH46 e RR071 (isoladas de pacientes brasileiros) e à amostras IMT248 (isolada de um paciente de Portugal), que por apresentarem padrões únicos de bandeamento do kDNA, foram classificadas como perfis isolados de LSSP-PCR (VII, VIII, IX e X), respectivamente. Ressalta-se que os perfis de I a III foram compostos por padrões obtidos tanto de amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* isoladas do Brasil, quanto daquelas isoladas de Portugal, enquanto que os perfis IV e VI, foram exclusivamente compostos por amostras de pacientes isolados do Brasil e de Portugal, respectivamente.

Observa-se que as “assinaturas de kDNA” de *Leishmania sp.* obtidas de amostras isoladas de humanos, possuíam em sua maioria de 7 a 12 fragmentos, com exceção do perfil VI constituído por apenas duas bandas fortes (548 e 615pb). Destaca-se também que alguns fragmentos de DNA estavam presentes em diferentes perfis, como, por exemplo, os de 116, 126, 135, 156, 191, 236, 255, 341, 348, 364, 400, 430, 560 e 591pb.

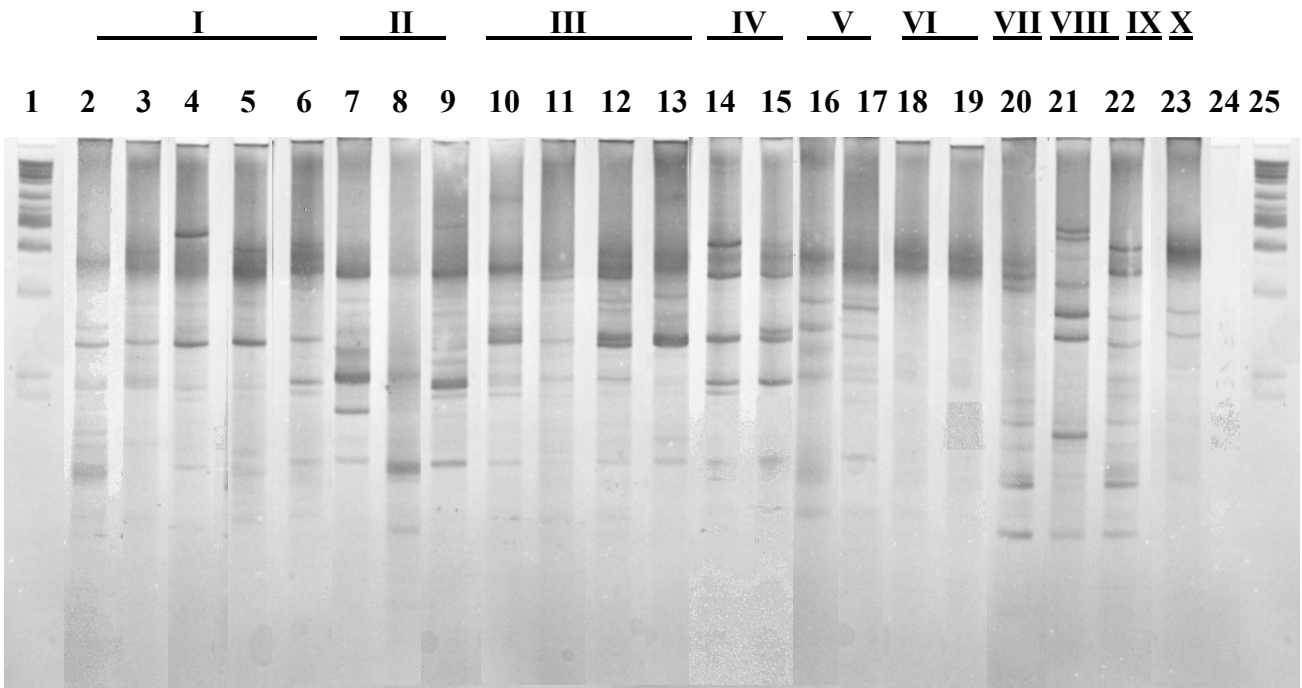


FIGURA 26 - Gel representativo dos Perfis de LSSP-PCR obtidos pela análise do fragmento de 447 pb da região do kDNA de *L. chagasi* e *L. infantum* amplificado a partir de amostras de DNA genômico de cepas isoladas de pacientes humanos. **Canaletas 2 a 6**, amostras RR072, RR050, IMT144, IMT233, IMT242; **canaletas 7 a 9**, amostras RR054, RR053, IMT224; **canaletas 10 a 13**, RR057, RR058, IMT226, IMT245; **canaletas 14 a 15**, RR055, RR059; **canaletas 16 a 17**, PP75, IMT225; **canaletas 18 a 19**, IMT234, IMT249; **canaleta 20**, IPT1; **canaleta 21**, BH46; **canaleta 22**, RR071; **canaleta 23**, IMT248. **Canaleta 24**, controle negativo da reação de LSSP-PCR; **canaletas 1 e 25**, Padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder (Promega), com os principais fragmentos de 250, 253, 294, 471, 486, 680, 709, 883, 925, 969, 1169, 1688, 2095 e 2249 pares de base (pb).

283					X					
273			X						X	
268		X								
259	X				X					
255			X	X						
244	X									
236			X	X					X	
225							X			
205		X								
191								X	X	
184							X			
168								X		
156	X		X				X			
140					X					
135	X	X		X					X	
126				X			X		X	
116				X			X		X	

QUADRO 16 – Estabelecimento dos perfis de LSSP-PCR do kDNA de cepas de *Leishmania* isoladas de pacientes humanos de acordo com o tamanho das bandas principais.

A FIGURA 27 representa os perfis de banda obtidos pela técnica de LSSP-PCR, utilizando-se o iniciador MC1 para análise dos fragmentos moldes de 447pb obtidos a partir da amplificação específica de amostras de DNA extraídas das cepas de *L. chagasi* e *L. infantum*, isoladas de reservatórios caninos e mantidas em cultura. Em comparação aos resultados apresentados na figura anterior, perfis menos complexos e constituídos por um número menor de bandas, foram obtidos pela análise do kDNA de cepas de *Leishmania sp.* isoladas de cães.

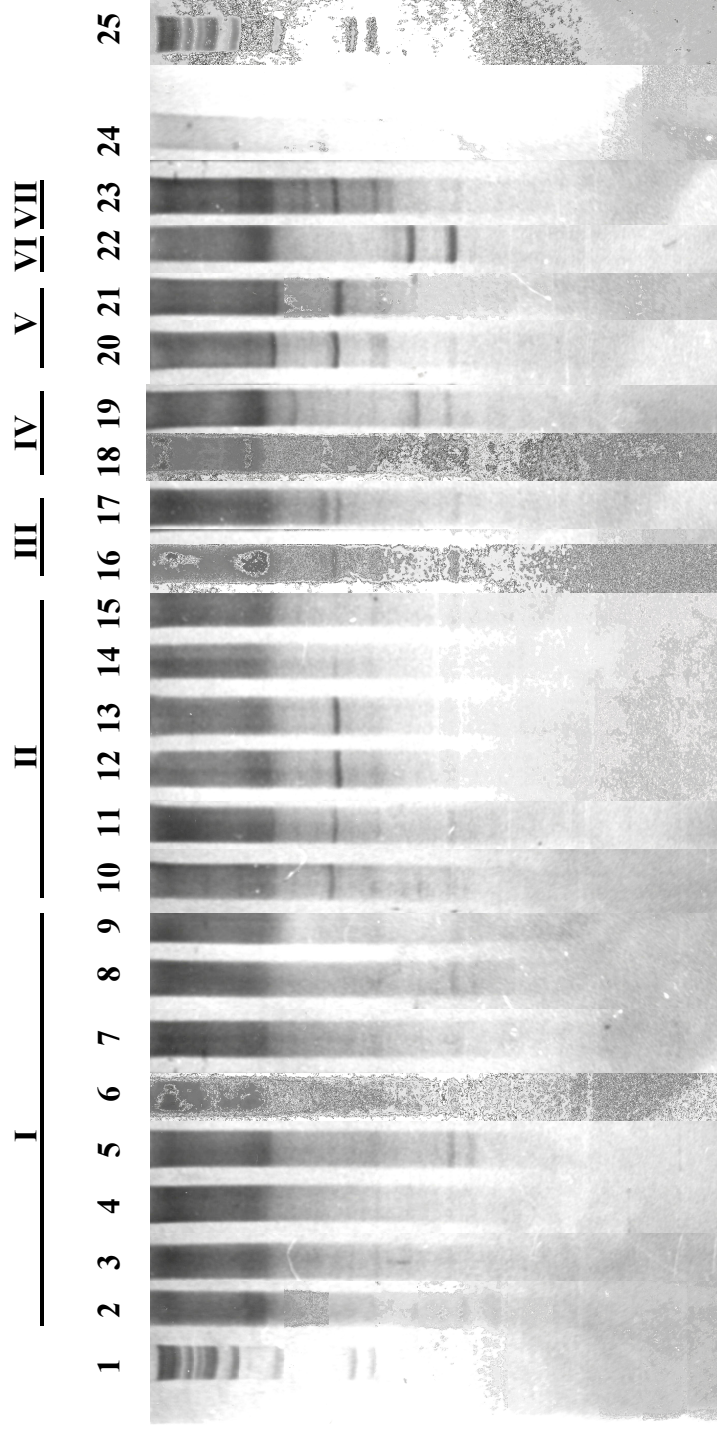


FIGURA 27 - Gel representativo dos Perfis de LSSP-PCR obtidos pela análise do fragmento de 447 pb da região do kDNA de *L. chagasi* e *L. infantum* amplificado a partir de amostras de DNA genômico de cepas isoladas de reservatórios caninos. **Canaletas 2 a 9**, amostras IPT1, IMT254, IMT262, IMT339, RR070, BH406, RR066; **canaletas 10 a 15**, amostras IMT229, IMT321, BH400, BH402, IMT254, IMT262, IMT339, RR069; **canaletas 16 a 17**, amostras IMT320, RR069; **canaletas 18 a 19**, amostra PP75, IMT256; **canaletas 20 a 21**, amostras IMT326, RR061; **canaleta 22**, amostra IMT322; **canaleta 23**, amostra BH403. **Canaleta 24**, controle negativo da reação de LSSP-PCR; **canaletas 1 e 25**, Padrão de Peso Molecular 1Kb DNA Ladder (Promega), com os principais fragmentos de 250, 253, 294, 471, 486, 680, 709, 883, 925, 969, 1169, 1688, 2095 e 2249 pares de base (pb).

O QUADRO 17 apresenta o tamanho molecular dos principais fragmentos constituintes dos perfis de LSSP-PCR, correspondentes à análise do fragmento de kDNA de *L. chagasi* e *L. infantum*, amplificados a partir de amostras de DNA genômico de cepas isoladas de cães. Esses valores foram calculados pela utilização do software *LabImage*, tomando-se como referência os fragmentos constituintes do Padrão de Peso Molecular 1Kb Ladder (Promega).

Sete perfis de kDNA (I a VII) foram obtidos pela análise de LSSP-PCR do fragmento de kDNA amplificado das amostras de *Leishmania sp.*, que foram isoladas de reservatórios caninos (FIGURA 27 e QUADRO 20). Os padrões de LSSP-PCR apresentados por essas amostras permitiram sua distribuição dentro dos perfis de I a V, com exceção das amostras IMT322 e BH403, que por apresentarem padrões únicos de bandeamento do kDNA, foram classificadas como perfis isolados de LSSP-PCR (VI e VII), respectivamente. Destaca-se que todos os perfis de kDNA (I a V) foram compostos por padrões obtidos tanto de amostras isoladas no Brasil, quanto daquelas isoladas em Portugal.

Observou-se ainda, que as “assinaturas de kDNA” de *Leishmania sp.* obtidas de amostras isoladas de reservatórios caninos, possuíram em sua maioria de 4 a 7 fragmentos, com exceção do perfil VII, constituído por 11 fragmentos, e do perfil VI, constituído por três bandas fortes (130, 183 e 526pb). Destaca-se também que alguns fragmentos de DNA estavam presentes em diferentes perfis, como, por exemplo, os de 130, 242, 250, 255, 297, 330, e 535pb.

Bandas	Perfis						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
658							X
612	X						
558							X
535	X	X		X			
530				X			
526						X	
509							X
496					X		
420				X			
396							X
375				X			
366			X				
362							X
355			X				
339		X					
330			X		X		X
300							X
297	X			X			
273							X
255	X	X					
250					X		X
242			X	X			
223					X		
219							X
183						X	
130	X	X	X	X	X	X	X

QUADRO 17 – Estabelecimento dos perfis de LSSP-PCR do kDNA de cepas de *Leishmania* isoladas de pacientes humanos de acordo com o tamanho das bandas principais.

5.7 Sequenciamento parcial do minicírculo de kDNA

A FIGURA 28 mostra o alinhamento realizado com o programa Clustalw do sequenciamento parcial do minicírculo do kDNA das amostras selecionadas. As bases marcadas em amarelo indicam pontos de polimorfismos entre os isolados, que estão relacionados ao hospedeiro e origem geográfica. As bases marcadas em vermelho evidenciam polimorfismos que são distintos entre as amostras isoladas no Brasil e em Portugal.

	370	380	390	400	410
IPT1	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
PP75	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT322	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT254	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT262	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT339	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT144	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT224	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT225	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
IMT226	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
RR065	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
BH402	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
RR066	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
RR061	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTG
RR056	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATTGGGTG
RR055	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AA	
RR050	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	ATGGGTGA
RR071	TCTGGTCCCTC	CGGGTAGGGG	CGTTCTGCAA	AATCGGAAAA	A

FIGURA 28 – Sequenciamento parcial do minicírculo de kDNA de algumas amostras isoladas de casos humanos e reservatórios caninos, isoladas no Brasil e em Portugal, após amplificação com os iniciadores MC1 e MC2. As bases marcadas em amarelo indicam polimorfismos não relacionados ao hospedeiro ou origem geográfica. As bases marcadas em vermelho indicam polimorfismos observados entre os isolados do Brasil e de Portugal.

- Amostras isoladas de reservatórios caninos em Portugal
- Amostras isoladas de casos humanos em Portugal
- Amostras isoladas de reservatórios caninos no Brasil
- Amostras isoladas de casos humanos no Brasil
- Sítio de reconhecimento da enzima *Bgl*II

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses compreendem uma das dez endemias mundiais prioritárias da Organização Mundial de Saúde (OMS), estando entre as doenças mais negligenciadas pelo setor privado, sobretudo pela indústria farmacêutica, pela expectativa de baixo retorno financeiro, por serem as mesmas, doenças de países pobres e em desenvolvimento. Encontram-se amplamente distribuídas em quatro continentes, mostrando um aumento de incidência. Atualmente são consideradas um problema de Saúde Pública, com alguns estudos demonstrando a reativação de vários focos antigos e o aparecimento de novas situações epidêmicas, aliadas a uma subestimativa da severidade destas infecções e de seu impacto sócio-econômico (BAÑULS et al., 1999).

Nos últimos 20 anos, métodos genéticos e moleculares para estudo e caracterização de linhagens patogênicas têm ganhado uma maior aproximação da epidemiologia das doenças parasitárias e outras infecções. Um conhecimento confiável e consensual sobre a taxonomia, baseado no conhecimento da estrutura da população e na diversidade filogenética, são pré-requisitos indispensáveis para um melhor entendimento da epidemiologia dos parasitos patogênicos.

A epidemiologia molecular e a genética de populações podem levar a um melhor conhecimento da estrutura das populações de *Leishmania* e resolver questões de importância epidemiológica, como por exemplo, a complexa relação entre formas clínicas da infecção humana e de reservatórios mamíferos.

Se a espécie é sexual, seus multilocos genéticos são instáveis, devido à recombinação genética e não podem ser usados como marcadores epidemiológicos, mas se a espécie é clonal, seus genótipos se propagam como fotocópias genéticas e, portanto podem ser usados como marcadores epidemiológicos confiáveis. Esse

parece ser o caso de *Leishmania*. Diferentes estudos de genética de populações mostram uma estrutura de população basicamente clonal em diferentes espécies (BAÑULS et al., 1999). O critério de clonalidade tem sido extensivamente descrito e discutido por Tibayrenc et al. (1990). Entretanto, eventos de recombinação genética têm sido registrados por vários autores, demonstrando que a recombinação gênica ocorre também em populações naturais no Novo e Velho Mundo (EVANS et al., 1987; TIBAYRENC et al., 1990; BELLI et al., 1994; DUJARDIN et al., 1995)

Os avanços na tecnologia molecular têm permitido o estudo da ecologia de populações clonais de *Leishmania* trazendo informações sobre fontes de infecção, perfis de transmissão, resposta ao tratamento e a importância da imunidade à reinfecção.

Em 2007, Lukes et al. realizaram uma análise genética multifatorial, com aproximadamente 1800 caracteres para cada uma das 25 cepas geograficamente representativas das áreas na Europa, África e Ásia, mas não da América, onde ocorrem representantes do complexo *L. donovani*. Os autores observaram que o genótipo é fortemente correlacionado com a origem geográfica, mas não com a atual taxonomia ou forma clínica. Desta forma, propõem uma nova taxonomia, onde *L. infantum* e *L. donovani* são as únicas espécies reconhecidas do complexo *L. donovani* e apresentam uma hipótese evolutiva para a origem e dispersão das espécies. O gênero *Leishmania* pode ter se originado na América do Sul, mas diversificado após migração para a Ásia. *L. donovani* e *L. infantum* divergem em aproximadamente 1 milhão de anos, com divergências adicionais de grupos genéticos infra-específicos entre 0,4 e 0,8 milhões de anos. O modo prevalente de reprodução é clonal, mas há evidências de trocas genéticas entre cepas, particularmente na África.

6.1 ANÁLISE DE ISOENZIMAS

Uma das técnicas utilizadas nesse estudo foi a eletroforese de enzimas. Esse tem sido um dos métodos mais comumente utilizados para estudos epidemiológicos e análise da diversidade das espécies. O controle genético para a maioria das enzimas é conhecido, o que permite que sejam feitas inferências genéticas diretamente dos padrões de bandas observados. Pela facilidade de execução e pelas informações que fornecem, mesmo hoje, com as técnicas moleculares mais recentes, as isoenzimas continuam sendo uma classe de marcadores muito úteis para análises genéticas que não requeiram uma amostragem ampla do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; HIDE et al., 2001; CHICARRO et al., 2002).

A análise eletroforética de isoenzimas é considerada o padrão ouro para caracterização e identificação de amostras de *Leishmania* e tem sido muito utilizada no estudo da variabilidade genética nesse parasito, pois possui a capacidade de examinar genes estruturais, e assim caracterizar os polimorfismos existentes entre espécies e dentro de uma mesma espécie. Entretanto, alguns autores consideram que essa metodologia, algumas vezes, não é suficientemente discriminatória (BOTILDE et al., 2006).

Pela primeira vez em um estudo com maior número de amostras caninas e humanas de *L. chagasi* isoladas no Brasil, foram comparadas enzimaticamente com amostras da Europa. Os perfis enzimáticos encontrados foram bastante homogêneos, sendo o padrão eletroforético dos isolados, idêntico ao das duas amostras de referência (*L. infantum* e *L. chagasi*). Os resultados mostraram que a maioria dos isolados do Brasil, são iguais entre si e iguais às amostras de *L. infantum*, com exceção de uma amostra isolada de caso humano e outra isolada de

reservatório canino que foram diferentes entre si, mostrando variação nos perfis com as enzimas GPI e PGM.

Com relação às amostras isoladas de casos humanos e reservatórios caninos de Portugal, não foi observada nenhuma variação com as enzimas estudadas. De fato, as amostras procedentes de Portugal pertencem ao zimodema MON-1 que é o mais comum no país, embora nove outros zimodemas sejam encontrados no Mediterrâneo. Em Portugal, o zimodema MON-1 é encontrado em humanos, cães, outros reservatórios e flebotomíneos, causando a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea (CAMPINO, 2003; CAMPINO et al., 2005). Segundo Oschesenreither et al. (2006) a predominância desse zimodema na área do Mediterrâneo reduz o poder discriminatório da técnica. Por outro lado, Hide et al. (2001), utilizando estudos isoenzimáticos e RAPD-PCR, mostraram que esse zimodema é polifilético e geneticamente heterogêneo.

Estudos com *L. infantum* pertencentes ao zimodema MON-1, caracterizado por MLEE pelo Laboratório de Referência WHO de Montpellier – França (Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, France) que é mais comumente encontrado na Europa, mostraram seis diferentes genótipos em *L. infantum/L. chagasi* com 15 sistemas enzimáticos (HIDE et al., 2001). Em nosso trabalho utilizamos 10 sistemas enzimáticos, alguns iguais aos utilizados por estes autores. As diferenças entre a metodologia, as enzimas utilizadas, a procedência dos isolados, os quais foram provenientes da mesma área endêmica no Brasil e em Portugal, podem ter sido as causas do baixo polimorfismo observado em nosso estudo.

Em relação a *L. chagasi* estudos realizados no Brasil têm mostrado pouca variabilidade nos zimodemas (BRAGA et al., 1986; SILVA et al., 2001).

Em estudo realizado na Ilha Margarita, Venezuela, Zerpa et al. (2001) observaram que as amostras isoladas de casos humanos e de reservatórios caninos apresentaram o mesmo zimodema MON-1 encontrado em *L. infantum* da Europa.

Nossos dados são consistentes com aqueles observados por Lainson et al. (1981), que encontraram alta similaridade nos perfis enzimáticos de *L. chagasi* e *L. infantum*, o que os levou a sugerirem a separação taxonômica dos dois parasitos a nível subespecífico. Berveley et al. (1987) e Cupollilo et al. (1994) também não observaram nenhuma variabilidade no perfil isoenzimático destas espécies. Estes autores observaram também, que o perfil isoenzimático dos isolados era idêntico ao da amostra de referência de *L. infantum* (IPT1).

Dados recentes obtidos com a amplificação e seqüenciamento de cinco genes que codificam para as enzimas ASAT, GPI, NH1, NH2 e PGD, em espécies do complexo *L. donovani*, Maurício et al. (2006) mostraram que alguns fenótipos indistinguíveis eram produzidos por distintos genótipos, em muitos casos o polimorfismo de um único aminoácido foi responsável por mudança na mobilidade enzimática.

Embora tenhamos estudado amostras criopreservadas logo após o isolamento, de casos humanos e caninos, bem caracterizadas clinicamente, estas são originárias da mesma área endêmica em Portugal, Alto Douro e Brasil, na região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Pode ser que haja uma maior variabilidade isoenzimática em *L. chagasi* de outras áreas do país, embora alguns achados não correlacionem os polimorfismos observados com a origem geográfica dos isolados. *L. chagasi* é aparentemente o único agente etiológico da LV no Novo Mundo. No entanto, alguns trabalhos realizados em área endêmica demonstram que em alguns indivíduos a manifestação clínica da leishmaniose visceral pode ser

causada, mesmo que esporadicamente, por outras espécies de *Leishmania*, como *L. amazonensis* (BARRAL et al., 1986) e *L. colombiensis* (RODRIGUES-BONFANTE et al., 2003), em indivíduos imunocompetentes. Esse fato indica a necessidade da identificação do parasito, associado ao quadro da LV, para melhor entendimento da epidemiologia e aplicação das medidas de controle, principalmente em áreas emergentes. Também há relatos de *L. chagasi* associada a lesões cutâneas. No Brasil, Oliveira et al. (1986) descreveram um caso de leishmaniose cutânea causada por *L. chagasi* em área endêmica do Rio de Janeiro. Já em outras partes da América, Honduras (atualmente Belize) e Nicarágua, *L. chagasi* tem sido o agente causal de vários casos de leishmaniose cutânea no homem (NOYES et al., 1997; BELLI et al., 1999).

Nos últimos anos, técnicas moleculares têm sido usadas como métodos complementares nos estudos de variabilidade e caracterização de *Leishmania*. Dentre elas, podemos citar: amplificação pela PCR de genes como gp63 e cpb, seguido pela análise por RFLP (MAURÍCIO et al., 2001; QUISPE TINTAYA et al., 2004), PCR-RFLP de minicírculos do kDNA (MORALES et al., 2001; CHICARRO et al., 2002; CORTES et al., 2006), RAPD (HIDE et al., 2001; ZEMANOVÁ et al., 2004) e microssatélites (BULLE et al., 2002; OSCHSENREITHER et al., 2006).

6.2 RAPD-PCR

O RAPD-PCR apresenta como vantagens a simplicidade e velocidade da técnica, não necessitando conhecimento prévio do genoma, aliadas à alta resolução e reprodutibilidade, além da requisição de pequenas quantidades de DNA.

Quando os iniciadores são de tamanho intermediário (na ordem de 10pb), múltiplos fragmentos, de diferentes locos são geralmente amplificados para cada

conjunto de iniciadores no genoma analisado. Uma vez que os iniciadores consistem de seqüências randômicas e não discriminam regiões codificadoras de não codificadoras, é razoável esperar que a amostragem do genoma seja mais aleatória do que a observada para os métodos convencionais, como isoenzimas, gerando uma grande quantidade de polimorfismos de DNA distribuídos por todo o genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

De acordo com Lynch & Milligan (1994), desde que a técnica de RAPD-PCR é relativamente fácil de aplicar a uma grande variedade de organismos e que o número de locos que pode ser examinado é ilimitado, os RAPDs apresentam várias vantagens sobre RFLP e DNA *fingerprinting*.

O RAPD é uma técnica válida para mostrar variabilidade genética intra e interespecífica em *Leishmania*, incluindo aquelas do complexo *Leishmania donovani* (TIBAYRENC et al., 1993; NOYES et al., 1997; GUERBOURJ et al., 2001; MAURÍCIO et al., 2001). Baseado nestes e em outros dados, a técnica foi escolhida para estudar a variabilidade genética das amostras de *L. chagasi* e *L. infantum*.

Em nosso estudo empregamos duas técnicas que utilizam o DNA genômico (RAPD-PCR e SSR-PCR). Em ambas houve um alto grau de similaridade genética entre os isolados de humanos e de cães, do Brasil e de Portugal, conforme mostrado pela distância genética, sempre menor que 1 e como já havia sido detectado na eletroforese de isoenzimas. Os iniciadores utilizados no trabalho geraram perfis de bandas altamente monomórficos com os diferentes isolados. O que observamos foi a separação das amostras de humanos e de cães em dois *clusters* distintos com todos os iniciadores utilizados. Isso pode ser melhor visualizado quando observamos o fenograma consenso (FIGURA 8), o que pode ser conseqüência do efeito clonal. O RAPD-PCR foi capaz de separar as amostras em duas populações relacionadas ao

hospedeiro de origem (homem e cão) independentemente de sua procedência geográfica. Apesar desta separação, as amostras apresentaram um alto grau de similaridade onde 93% das bandas observadas foram compartilhadas entre todas as amostras. Esses dados indicam que as amostras são geneticamente muito homogêneas e possivelmente derivadas de um mesmo precursor, indicando uma origem clonal.

A discussão sobre clonalidade/sexualidade tem sido foco de vários estudos nos últimos anos e é ainda controversa. Os clones não são as espécies como um todo, mas unidades evolutivas distintas que precisam ser estudadas e caracterizadas sobre os aspectos médicos e epidemiológicos (TIBAYRENC, 1990).

Toledo et al. (2002) utilizando a técnica de RAPD-PCR conseguiram separar amostras de *L. infantum* em dois *clusters*, de acordo com a origem geográfica. Botilde et al. (2006), utilizando RAPD-PCR, entre outras técnicas, conseguiram mostrar variabilidade genética em *L. infantum* utilizando o iniciador F10, que foi também por nós utilizado, sendo o iniciador que mostrou maior polimorfismo entre os isolados (FIGURAS 6A e B), embora nossa análise estatística não tenha detectado diferença significativa com os demais iniciadores. Nossos resultados são consistentes com aqueles observados por Hide et al. (2001) que também encontraram variabilidade genética utilizando os iniciadores F10 e R15. Os iniciadores ILO872 e ILO875 não foram capazes de mostrar polimorfismos com as amostras estudadas, divergindo dos resultados observados por Noyes et al. (1997), que encontraram pequenas diferenças entre as linhagens de *L. chagasi*, utilizando as técnicas de RAPD, *pulse field* e *differential display*.

Como a análise dos resultados obtidos com as técnicas de isoenzimas e RAPD-PCR não apresentou variabilidade significativa entre os isolados, o estudo foi ampliado com o uso de outros marcadores genéticos.

6.3 SSR-PCR

Uma grande proporção do genoma de organismos eucariotos é composta de seqüências repetitivas de DNA. Esta proporção é variável entre as espécies. As SSR (microsatélites) são muito freqüentes e distribuídas ao acaso permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. *Leishmania* é relativamente rica em microsatélites. Têm sido demonstrado que os locos que contém microsatélites na família Trypanossomatidae são estáveis em condições de laboratório e podem ser detectados com pequenas quantidades de DNA do parasito (OCHSENREITHER et al., 2006).

SSR-PCR, é uma técnica que utiliza iniciadores direcionados a regiões repetitivas do DNA, foi descrita como método alternativo à AP-PCR para estudos de polimorfismos do genoma eucarioto, uma vez que apresenta boa reprodutibilidade devido às condições de alta estringência utilizadas (ZIETKIEWICZ et al., 1994). Oliveira et al. (1997) utilizaram SSR-PCR com o iniciador (CA)₈RY para estudar a variabilidade genética intra-específica de parasitos, mostrando que os padrões obtidos foram comparáveis aos originados por AP-PCR. Contudo, como a temperatura de anelamento é maior na técnica de SSR-PCR, observa-se uma maior especificidade, como também uma maior reprodutibilidade (OLIVEIRA et al., 1997). Devido à sua aplicabilidade, a técnica de SSR-PCR foi escolhida para estudar a variabilidade intra e interespecífica de *L. chagasi* e *L. infantum*.

Os resultados obtidos em nosso estudo com os iniciadores (CA)₈RY e CAA(CT)₆ mostraram um perfil de bandas muito homogêneo. As amostras isoladas de reservatórios caninos utilizando o iniciador (CA)₈RY mostraram um perfil de bandas mais polimórfico do que com o iniciador CAA(CT)₆, embora essas diferenças não sejam estatisticamente significantes.

Os dados da comparação de bandas não compartilhadas obtidos a partir dos perfis de RAPD-PCR e SSR-PCR foram utilizados para construir fenogramas por UPGMA.

Ambas as análises mostraram a formação de dois subgrupos genéticos associados ao hospedeiro de origem. Essa separação em dois *clusters* ocorreu dentro de cada técnica, com cada um dos iniciadores analisados individualmente, bem como no consenso dentro e entre as duas técnicas RAPD-PCR e SSR-PCR. Apesar dessa separação, os fenogramas mostraram baixos índices de distância genética entre as amostras dos dois grupos formados, indicando que existe uma grande similaridade entre todas as amostras estudadas. Os resultados obtidos com as duas técnicas sugerem a possível existência de diferentes clones que preferencialmente infectam humanos ou cães. Isso pode inclusive indicar a existência de dois ciclos de transmissão do protozoário, um ciclo natural zoonótico e um outro ciclo antroponótico.

Em 1962, Deane & Deane demonstraram que pessoas com leishmaniose visceral ativa poderiam infectar o vetor e levantaram a hipótese de que essas pessoas poderiam funcionar como fonte de infecção para os vetores (COSTA et al., 2002).

Na região do Mediterrâneo o uso de xenodiagnóstico para detecção de *L. infantum* no sangue de pacientes infectados com HIV, tem sugerido que pessoas

imunocomprometidas podem potencialmente servir como reservatórios secundários no ciclo natural da leishmaniose visceral em áreas urbanas. Assim, uma antroponose natural endêmica pode ser estabelecida onde *P. perniciosus* desempenha o papel de vetor de *L. infantum*. Nesta região, além do ciclo zoonótico convencional (cães-flebótomos-homem) existem duas outras alternativas hipotéticas de ciclo antroponótico: um ciclo artificial entre pessoas imunocomprometidas e usuários de drogas endovenosas, via seringa e um ciclo natural entre pessoas imunocomprometidas, o inseto, e, crianças ou adultos imunocompetentes (MOLINA et al., 1999).

As baixas taxas de sucesso terapêutico, os altos níveis de reincidência e a alta parasitemia observada nos pacientes co-infectados com HIV, fazem com que aumente o número de pacientes humanos que atuam como reservatórios nas áreas de transmissão antroponótica. Esses fatos podem ter propiciado a criação de novos focos de transmissão antroponótica, onde a transmissão era tradicionalmente zoonótica (CRUZ et al., 2006).

No Brasil, a co-infecção com HIV é um acontecimento relativamente novo na Saúde Pública. Tem sido demonstrado que pacientes co-infectados são altamente infectantes para os flebotomíneos (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006). Foi demonstrado ainda que pacientes assintomáticos funcionam como transportadores do parasito. Contudo, ainda é desconhecido se pessoas com infecção subclínica por *L. chagasi* agem como fonte de infecção para o vetor (COSTA et al., 2002; MORENO et al.; 2006).

Segundo Tibayrenc (1998) a concordância entre dois tipos de marcadores genéticos confirmam a robustez da subdivisão filogenética e é evidenciada pelo desequilíbrio de ligação e pelo isolamento repetido de amostras com genótipos

idênticos detectados, que é considerado como evidência circunstancial para propagação clonal.

A reprodução assexuada tem um importante papel na estrutura das populações dentro de espécies como as do gênero *Leishmania*. Os dois marcadores RAPD-PCR e SSR-PCR mostraram duas populações clonais relacionadas com os hospedeiros humanos e caninos, isto tem importância na biologia e conseqüências nas medidas de controle. Embora híbridos encontrados na natureza, indiquem segregação e recombinação, eles são raros ou ausentes em populações naturais do complexo *L. donovani*. Até o momento apenas um híbrido foi descrito nesse complexo (LUKES et al., 2007).

6.4 RFLP-PCR

Com o objetivo de analisar mais detalhadamente o genótipo das amostras, utilizamos o método de RFLP-PCR. Este método têm sido válido para mostrar variabilidade genética dentro e entre diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo as do complexo *L. donovani* (GUERBOUJ et al., 2001; HIDE et al., 2001; MAURÍCIO et al., 2001; ZEMANOVÁ et al., 2004). A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, podem variar entre diferentes indivíduos gerando polimorfismos. Diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos pode resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O primeiro relato de diversidade genotípica, utilizando-se o perfil de restrição do kDNA (RFLP-kDNA), entre isolados de LV procedentes do Velho e Novo Mundos foi publicado em 1984. Neste trabalho os autores, Pacheco et al. (1984) reportam o

estudo genotípico de diferentes isolados de *L. chagasi* provenientes dos Estados da Bahia e do Rio de Janeiro. Apesar de terem sido analisadas somente uma amostra de referência de *L. infantum* da França e outra de *L. donovani* da Índia, a distinção genética entre elas é bem nítida, da mesma forma que entre o perfil genético de *L. infantum* e diferentes isolados de *L. chagasi*. Além disso, a diversidade intra-específica foi também observada, sendo os isolados da Bahia genotipicamente distintos daqueles encontrados para as amostras do Rio de Janeiro.

A análise dos polimorfismos nos fragmentos de restrição do kDNA é considerada um poderoso instrumento para estudos epidemiológicos e para mostrar variabilidade genética em amostras de *Leishmania* (ARNOT & BARKER, 1981; ANGELICI et al., 1989; PACHECO et al., 1999).

O DNA do cinetoplasto representa 20-25% do DNA do parasito e consiste em uma rede de moléculas circulares, concatenadas, divididas em maxicírculos (25-50 cópias por célula) e minicírculos (20000-30000 cópias por célula) (TELLERIA et al., 2006). Cada minicírculo tem aproximadamente 800pb de tamanho, com 200pb de região conservada e 600pb de região variável. A heterogeneidade da região variável tem sido explorada para discriminar entre linhagens de uma mesma espécie. A análise dos esquizodemas tem revelado que pode haver variações nas frequências das classes de minicírculos, conferindo diversidade (CORTES et al., 2006). Morel et al. (1980) observaram com a técnica de RFLP-PCR, um considerável polimorfismo nessas moléculas em *Leishmania* sp.

Cortes et al. (2006) amplificaram uma parte variável do minicírculo de kDNA de *L. infantum* e submeteram as amostras à digestão com diferentes endonucleases de restrição. Observaram um perfil polimórfico quando foram utilizadas, entre outras, as enzimas *Bgl*III, *Vsp*I, *Rsa*I, *Hpa*II e *Dde*I.

Em nosso estudo a porcentagem de divergência entre as amostras estudadas, foi estimada pela proporção de sítios de restrição compartilhados em cada loco e utilizados na construção do fenograma consenso. Diferentemente do que foi observado com a utilização das outras técnicas, nossos resultados com a análise dos perfis de restrição com as enzimas *Bgl*II, *Vsp*I, *Rsa*I e *Dde*I mostraram variabilidade genotípica na região dos minicírculos de kDNA. Essa variabilidade, contudo, não fez nenhuma discriminação entre as amostras, ou seja, não houve separação de acordo com o hospedeiro ou origem geográfica. Entretanto, algumas endonucleases, tais como *Hpa*II que mostrou polimorfismos com *L. infantum*, em trabalho anterior, não mostrou com as amostras estudadas. A variabilidade alélica, nesse tipo de marcador, poderia ser explicada pelo fato de as seqüências do DNA do cinetoplasto evoluírem mais rapidamente do que as do DNA nuclear, podendo mostrar um nível maior de polimorfismo dentro das espécies (PACHECO et al., 1986).

Diferentes mecanismos moleculares têm sido propostos para explicar a variabilidade observada nos minicírculos de kDNA de tripanossomatídeos (substituição, inserção ou deleção, recombinação, rearranjos e mutações pontuais), que no final resultam na produção de uma variedade de moléculas ou classes de minicírculos distintas. A elucidação da distribuição de cada classe e sua relação com a edição de RNA, em diferentes espécies e amostras é que poderá esclarecer melhor esta questão (FERNANDES et al., 1999).

O fragmento do minicírculo de kDNA, amplificado com o iniciador MC1 e MC2 foi submetido à análise por seqüenciamento. Foram escolhidas amostras aleatoriamente dentro de cada um dos grupos estudados, perfazendo um total de 40% de amostras para cada grupo. O seqüenciamento confirmou os resultados

obtidos com as demais técnicas, onde após o alinhamento das seqüências, utilizando o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/tools/clustalw/index.html) foi observado grande similaridade no kDNA, com poucas bases não alinhadas, indicando possíveis mutações pontuais nessas amostras.

Há muitas maneiras pelas quais um sítio para uma endonuclease de restrição pode ser perdido: um dos vários nucleotídeos da seqüência de reconhecimento pode ser substituído, ou o sítio pode sofrer mutações no comprimento. O resultado apresentado na FIGURA 28, mostra a ocorrência de mutações pontuais que poderiam ter gerado os polimorfismos observados. Comparando o sequenciamento com a técnica de RFLP, para a endonucelase *Bgl*III, as amostras que não foram digeridas, apresentam a troca de uma das bases do sítio de reconhecimento da enzima.

6.5 LSSP-PCR

Nosso estudo foi pioneiro na utilização da técnica de LSSP-PCR na comparação entre amostras de *L. chagasi* e *L. infantum* mostrando variabilidade genética entre as amostras estudadas.

LSSP-PCR é uma técnica simples e rápida baseada na reação de PCR para detectar variações nas seqüências de DNA sendo altamente sensível e informativa. Mudanças tais como a mutação em uma única base pode mudar drasticamente o perfil de bandeamento produzindo novas assinaturas, as quais são então detectadas como alterações específicas (VAGO et al., 1996).

Pequenas mudanças na seqüência do molde de DNA resultam em alterações nas seqüências de ligação do iniciador. Isso pode explicar as diferenças entre os mutantes, embora eles possam diferir na substituição de uma única base.

Uma característica interessante observada nas assinaturas é o grande número de fragmentos de DNA, que são maiores (em pares de bases) do que o DNA molde. Essa possibilidade se deve ao fato dos primeiros produtos amplificados servirem como molde para os próximos ciclos de amplificação (PENA et al., 1994).

Obtivemos assinaturas de kDNA após a amplificação inicial das amostras com o iniciador MC1. Foi observado que as amostras isoladas de casos humanos apresentaram um perfil mais polimórfico, gerando um maior número de assinaturas, do que as amostras isoladas de reservatórios caninos. Em todos os perfis observados, tanto para as amostras de humanos como para de reservatórios caninos, não foi observada nenhuma separação das mesmas por origem geográfica, embora determinados perfis de LSSP-PCR tenham agrupado exclusivamente amostras de humanos provenientes do Brasil ou de Portugal.

Vago et al. (1996) estudando amostras de *T. cruzi* obtidas de diferentes tecidos infectados obtiveram perfis com múltiplas bandas, as quais foram variáveis entre algumas linhagens embora, muito similares entre outras. Também Meija & Triana (2005) estudando amostras de *T. cruzi* de diferentes tecidos e do sangue atribuem a heterogenidade encontrada a um caráter policlonal das amostras, sugerindo que as divergências encontradas poderiam ser o resultado de diferenças na origem biológica, distribuição geográfica e tempo de manutenção em laboratório.

Ferreira et al. (2007) mostraram que a técnica de LSSP-PCR foi capaz de identificar diferentes genótipos de *L. braziliensis* produzindo perfis complexos, validando a técnica, como sendo de grande utilidade na detecção de polimorfismos genéticos.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÕES

- * A eletroforese de enzimas não foi eficiente para detectar variabilidade entre os diferentes isolados estudados.

- * As técnicas baseadas em PCR - RAPD e SSR separaram as amostras em dois *clusters* de origem clonal, por hospedeiros, embora a distância genética e os valores de *Bootstrap* mostrem grande similaridade entre as mesmas.

- * As técnicas utilizando o minicírculo de kDNA – RFLP-PCR, LSSP-PCR mostraram polimorfismos genéticos pontuais que não foram associados ao hospedeiro ou origem geográfica das amostras.

- * O sequenciamento parcial do minicírculo de kDNA confirmou a grande similaridade dos isolados, embora polimorfismos tenham sido detectados. Esses polimorfismos foram associados, ora ao hospedeiro, ora à origem geográfica das amostras.

- * Todas as técnicas utilizadas no estudo não permitiram a separação dos isolados por origem geográfica (Brasil ou Portugal), nos permitindo sugerir que as amostras são pertencentes a uma única espécie.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização e o estudo da variabilidade genética de amostras isoladas de focos de LV tem grande utilidade como ferramenta na epidemiologia molecular. *Leishmania* tem um modelo clonal, onde a recombinação genética é um evento raro, se a mudança genética na população é freqüente, o genótipo do parasito seria representante de categoria instável e não poderia ser utilizado como marcador epidemiológico. Contudo, se aceitamos a premissa de que a estrutura populacional de *Leishmania* segue o modelo clonal, zimodemas e esquizodemas podem ser utilizados como unidades taxonômicas nos estudos de epidemiologia molecular. Os clones naturais, que são transmitidos por longos períodos em extensas áreas geográficas, sem alteração, podem ser facilmente reconhecidos por técnicas moleculares, podendo ser usados como marcadores em estudos epidemiológicos

Em nosso estudo, constatamos a predominância de amostras geneticamente muito similares, independentemente da origem geográfica (Brasil e Portugal) e do ciclo de transmissão. Entretanto, um número maior de amostras de outras regiões do país devem ser analisadas em comparação com amostras de *L. infantum* de outras regiões endêmicas, para que se possa fazer considerações mais precisas e até mesmo a proposta de uma revisão taxonômica.

É necessário que se estabeleça o verdadeiro papel do homem nos ciclos de transmissão da doença, onde indivíduos assintomáticos ou portadores de co-infecção *Leishmania*/HIV podem eventualmente funcionar como fonte de infecção para o vetor em nosso meio, mudando assim a óptica do controle da doença.

Entender a diversidade genética tem ainda implicações em traçar a dispersão do parasito, entender a estratégia de emergência de novas drogas e do

desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, terapêutica e obtenção de vacinas; enfim, tem importância nas estratégias de controle.

Em nossos resultados utilizando as técnicas de Isoenzimas, RAPD, SSR-PCR, LSSP-PCR, RFLP-PCR e sequenciamento foi observada baixa diversidade genética entre as amostras estudadas. Nenhuma das técnicas mostrou separação das amostras por origem geográfica (Brasil ou Portugal), permitindo-nos sugerir que sejam uma única espécie. Entretanto a origem da espécie, se do Novo ou Velho Mundo ainda é matéria de discussão.

O estudo da diversidade genética pode ainda auxiliar no melhor entendimento da evolução, taxonomia e patogenicidade *per se*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AL-TAQI, M. & EVANS, D. A. Characterization of *Leishmania* sp. From Kuwait By Isoenzyme electrophoresis. *Trans R S Trop Med Hyg*, v. 72, p. 56-65, 1978.

ALJEBOORI, T.J., EVANS, D.A. *Leishmania* sp in Iraq. Electrophoresis isoenzyme patterns. II. Cutaneous leishmaniasis. *Trans R S 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.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. v. 215 (3), p. 403-410, 1990.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BEM, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. v. 22(12), p.552-7, 2006.

ANGELICI, M.C., GRAMICCIA, M., GRADONI, L. Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitol*, v. 99, p. 301-309, 1989.

AULT, S. K. Pan American Health Organization's Regional Strategic Framework for addressing neglected diseases in neglected populations in Latin America and the Caribbean. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Sep 18, 2007.

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

BARKER, D. C.; ARNOT, D. E. Biochemical identification of cutaneous leishmaniasis by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. *Mol Biochem Parasitol*. v. 3(1), p. 33-46, 1981.

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

BARKER, D. C.; ARNOT, D. E.; BUTCHER, J. DNA characterization as a taxonomic tool for identification of kinetoplastic flagellate protozoans. In: CHANCE, M. L. & WALTON, B. C. (eds). Biochemical characterization of *Leishmania*. Geneva, UNDP/ WORLD BANK/WHO, P. 139-180, 1982.

BARKER, D. C.; BUTCHER, J.; GIBSON, L. J.; KENNEDY, W. P. K.; WILLIANA, R. H.; CUBA CUBA, C. A.; MARSDEN, P. D.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. Sequence homology of kinetoplast DNA in *Leishmania* studied by filter hybridization of endonuclease digested fragments and in situ hybridization of individual organisms. In: RIOUX, J. A. (ed). *Leishmania* Taxonomy and phylogeny. Montpellier. IMEEE, p. 41-55, 1986a.

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.

BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitology*, v. 79, n. 2, p. 215-218, 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.

BELLI, A. A.; MILES, M. A. ; KELLY, J. M. putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology.* v. 109, p. 435-442, 1994.

BELLI, S.; FORMENTON, A.; NOLL, T.; IVENS, A.; JACQUET, R.; DESPONDS, C.; HOFER, D.; FASEL, N. *Leishmania major*: histone H1 gene expression from the sw3 locus. *Exp Parasitol.* v. 91(2), p.151-60, 1999.

BERVELEY, S. M.; ISMACH, R. B.; McHON-PRATT, D. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 84, p. 484-488, 1987.

BHATTACHARYA, R.; SINGH, R.; HAZRA, T. K.; MAJUMDER, H. K. Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. *FEMS Microbiol Lett.* v. 15, p. 99-104, 1993.

BOTILDE, Y; LAUTRENT, T.; QUISPE TINTAYA, W.; CHICARRO, C.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; KUHL, K.; SCHONIAN, G.; DUJARDIM, J. C. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol.* v. 6 (6), p. 440-446, 2006.

BRAGA, R. R.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RYAN, L.; SILVEIRA, F. T. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarem, Para State. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 80(1), p.143-5, 1986.

BRASIL 2006 - Ministério da saúde – Portal da Saúde. DISPONÍVEL EM : <
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22140>. Acesso em 09 de fevereiro de 2006

BRAZIL, R. P. Electrophoretic variation of the enzyme phosphoglucose mutase in different strains of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasit.* v. 72(3), p. 289-329, 1978.

BULLE, B.; MILLON, L.; BART, J. M.; GALLEGU, M.; GAMBARELLI, F.; PORTUS, M.; SCHNUR, L.; JAFFE, C. L.; FERNANDEZ-BARREDO, S.; ALUNDA, J. M.; PIARROUX, R. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol.* v. 40(9), p. 3391-3397, 2002.

CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B. J.; GRESSHOF, P. M. DNA amplification using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biol Techn.* v. 9, p. 553-557, 1991.

CAMPINO, L. Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. In: FARREL, J. P. World class parasites: vol. 4 *Leishmania*. Ed: Kluwer Academic Publishers. p. 45-59, 2003.

CAMPINO, L.; BAJANCA, R.; FRANCA, I.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; FIADEIRO, T. Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme MON-1 em Portugal. *Acta Med Port.* v. 18, p. 475-478, 2005.

CAMPINO, L.; PRATLONG, F.; ABRANCHES, P.; RIOUX, J. A.; SANTOS-GOMES, G.; ALVES-PIRES, C.; CORTES, S.; RAMADA, J.; CRISTÓVÃO, J. M.; AFONSO, M. O.; DEDET, J. P. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania*

infantum base don the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health*. v.11(11), p. 1708-14, 2006 .

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G.; GUIMARÃES, F. N.; VON PAUMGARTTEN, M. J.. Leishmaniose Visceral Americana (Relatório dos trabalhos da comissão encarregada do estudo da Leishmaniose visceral Americana em 1937). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 33(1), p. 89-229, Sa B 1938.

CHANCE, M. L.; PETERS, W.; GRIFITHIS, H. W. A comparative study of DNA in the genus *Leishmania*. *Trans R S Trop Med Hyg*, v. 67, p. 24-25, 1973.

CHANCE, M. L.; GARDNER, P. J.; PETERS, W. Biochemical taxonomy of *Leishmania* as na ecological tool. In: Colloques Internationaux du Centre de la Research Scientifique, 239, Ecologie des leishmanioses. Paris. Editions du CNRS, p. 52-62, 1977.

CHICHARRO, C.; MORALES, M. A; SERRA, T.; ARES, M.; SALAS, A.; ALVAR, J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic tools. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 96(Suppl 1), p. 93-99, 2002.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. v. 141(21), p. 539-43, 1997.

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.

CORTES, S.; ROLAO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. v. 98(1), p.12-7, 2004.

CORTES, S.; MAURÍCIO, I.; ALMEIDA, A.; CRISTÓVÃO, J. M.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; CAMPINO, L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasit Intern*. p. 1-7, 2006.

COSTA, C. H. N.; JAY, M. S.; REGIS, B. B. G.; LOURDES, M. G.; PATRÍCIA, K. S. R.; BOSSA, M.; ABHAY, S.; SERATH, D. Y.; REGINA, S. S.; MAURO, R. B. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg.* v. 66(4), p.334-7, 2002.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in *Leishmania*. *Trop Med Interl Health.* v. 6(11), p. 899-905, 2001.

CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; CAÑAVATE, C.; DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* v. 123, p. 357-388, 2006.

CUNHA, A. M. & CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*, n.sp. Nota prévia. *Hospital*, v. 11(2), p. 148-152, 1937.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. JR.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* v. 50(3), p. 296-311, 1984.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. Jr.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* v. 50(3), p. 296-311, 1994.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 39(4), p. 352-356, 2006.

DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 98(7), p. 861-70, 2003 .

DEANE, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. Rio de Janeiro: Serviço nacional de educação sanitária, 161 p., 1956.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v. 4, p.198-212, 1962.

DEREURE, J.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. *Proceedings of the international canine leishmaniasis forum*. Barcelona, Spain, 1999. p. 18-25.

DESJEUX, P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by contry or territory. WHO/LEISH/91/30, 1991.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol*. v. 2(9), p.692, 2004.

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.

DIAKOU, A.; DOVAS, C. I.; Optimization of random-amplified polymorphic DNA producing amplicons up to 8500 bp and revealing intraspecies polymorphism in *Leishmania infantum* isolates. *Anal Biochem*. v. 288(2), p. 195-200, 2001.

DUJARDIN, J. C.; BAÑULS, A. L. ; LLANOS-CUENTAS, A.; ALVAREZ, E.; DeDONCKER, S.; JACQUET, D.; LE RAY, D.; AREVALO, J.; TIBAYRENC, M. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*. v. 59, p. 293-307, 1995.

DUJARDIN, J. C. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol*. v. 22(1), p. 4-6, 2006.

EVANS, D. A.; KENNEDY, W. P. K.; ELBIHARI, S.; CHAPMAN, C. J.; SMITH, V.; PETERS, W. Hybrid formation within the genus *Leishmania*? *Parassitologia*. v. 29, p. 165-173, 1987.

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

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

FERNANDES, O.; CASTANHO, M. P.; SEGURA, I.; LABRADA, L. A.; DERRE, R.; SARAIVA, N.; DEGRAVE, W. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania* (*Viannia*) species. *J Parasitol*. v. 85(3), p. 563-8, 1999.

FERREIRA, G. A.; SOARES, F. C.; VASCONCELLOS, S. A.; RODRIGUES, E. H.; WERKRAUSER, R. P.; DE BRITO, M. E.; ABATH, F, G. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. *J Parasitol.* v. 93(3), p. 712-714, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Editora Embrapa-Brasil, 1998.

FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; DA COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; GALLEGO, M.; PRATLONG, F.; FISA, R.; RIERA, C.; RIOUX, J. A.; DEDET, J. P.; PORTUS, M. The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 95(3), p.269-71, 2001. Review.

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. 681-687, 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.* v. 69(2), p. 99-109, 1998.

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

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.* v. 97(5), p. 751-753, 2002.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALD JR, G.; MOMEN, H.; SOARES, M. J.; MORIEARTY, P. L. Enzyme variation and difference in infectivity within a single strain of *Leishmania mexicana mexicana*. *Int J Parasitol.* v. 12(2-3), p. 185-9, 1982.

GRIMALDI JR. G.; DAVID, J.R.; MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* v. 36, p. 270-287, 1987.

GRIMALDI JR. G.; MCMAHON-PRATT, D. Leishmaniasis and its etiological agents in the New World: An overview. In: Tsieh Sun (ed). *Prog Clin Parasitol.* v. 2, p. 73-118, 1996.

GUERBOUJ, S.; VICTOIR, K.; GUIZANI, I.; SERIDI, N.; NUWAYRI-SALTI, N.; BELKAID, M.; ISMAIL, R. B., LE RAY, D.; DUJARDIN, J. C. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitol.* v. 122, p. 25-35, 2001.

GUEVARA, P.; ALONSO, G.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; MELLO, M.; SCORZA, J. V.; AÑEZ, N.; RAMIREZ, J. L. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol.* v. 56, p. 15-26, 1992.

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 Hyg.* v. 50, p. 632-640, 1994.

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.* v. 79, p. 6465-6469, 1982.

HANAFI, R.; BARHOUMI, M.; ALI, S. B.; GUIZANI, I. Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Exp Parasitol.* v. 98(2), p. 90-9, 2001.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *The Lancet.* v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HIDE, M., BANULS, A.L., TIBAYRENC, M. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology.* 123(Pt 5):425-32, 2001.

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.

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

IVENS, A. C.; BLACKWELL, J. M. The *Leishmania* genome comes of Age. *Parasitol Today*. v. 15(6), p. 225-31, 1999. Review.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. v. 309(5733), p. 436-42, 2005.

JACKSON, P. R.; WOHLHIETER, J.; HOCKMEYER, W. T. *Leishmania* characterization by restriction endonuclease digestion of kinetoplastic DNA. In *Abstr Vth Internat Congr Parasitol*. p. 342, 1982.

JACKSON, P. R.; WOHLHIETER, J. A.; JACKSON, J. E.; SAYLES, P.; DIGGS, C. L.; HOCKMEYER, W. T. Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*, v. 33, p. 808-819, 1984.

KILLICK-KENDRICK, R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.) *Biology of the Kinetoplastida*, London: Academic Press, v. 2, p. 395-460, 1979.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; RIOUX, J. A.; LANOTTE, G. & LEANEY, A. J. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann Trop Med Parasitol*. v. 74, p. 563-565, 1980.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Path Exot*. v. 78, p. 747-755, 1985.

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

KILLICK-KENDRICK, R.; RIOX, J. A. *Leishmania*: ciclo intravectorial. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann Parasitol Hum Com*, v. 66, n.1, p. 71-144, 1991.

KRAUSPENHARI, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; DA SLIVA, A. A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria. v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.

KREUTZER, R. D., SOURATY, N., SEMKO, M. E. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *Am J Trop Med Hyg*. v. 36, p.22-32, 1987.

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., 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. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Biology and Epidemiology*. London, *Acad Press*. v. 1, p. 1-120, 1987.

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). *Ann Parasitol Humt Comp*, v. 63(2), p. 134-145, 1988.

LAINSON, R. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In M Service, *Demography and Vector Borne Diseases*, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 85-106, 1989.

LAINSON, R. & RANGEL, E. F. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: E. *Fiocruz*, 368 p. 2003.

LAINSON, R. & RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100(8), p. 811-827, 2005.

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, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol.* v. 152(1), p.35-46, 2007.

LINCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol.* v. 3, p. 91-99, 1994 .

LOPES, U. G.; MOMEM, H.; GRIMALDI JR., G.; MARZOCHI, M. C. A.; PACHECO, R. S. & MOREL, C. M. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol.* v. 70, p. 89-98, 1984.

LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHL, K.; QUISPE-TINTAYA, W.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORAK, A.; AYALA, F.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 104(22), p. 9375-9380, 2007.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection on different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, p. 566-567, 1988.

MARTIN-SANCHEZ, J.; GRAMMICA, M.; DI MUCCIO, T.; LUDOVISI, A.; MORILLAS-MARQUES, F.; READY, P. D. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 98(4), p.228-32, 2004.

MARTINS, A. V.; WILLIAMS, P.; FALCÃO, A. L. American sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Acad Bras Ciênc*, Rio de Janeiro, 195 p., 1978.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, JR.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitol.* v. 119, p.237-246, 1999.

MAURÍCIO, I.L., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, 16(5): 188-189, 2000.

MAURICIO, I. L.; GAUNT M. W.; STOTHARD, JR.; MILES, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitol.* v.122(Pt 4), p.393-403, 2001.

MAURÍCIO, I. L.; YEO, M.; BAGHAEI, M.; DOTO, D.; PRATLONG, F.; ZEMANOVA, E.; DEDET, J. P.; LUKES, J.; MILES, M. A. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* v. 36(7), p. 757-69, 2006.

McMAHON-PRATT, D. M.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*, v. 291, p. 581-583, 1981.
McMAHON-PRATT, D. M.; BENNETT, E.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*, v. 129, p. 926-927, 1981.

McMAHON-PRATT, D. M.; BENNETT, E.; GRIMALDI, G.; JAFFE, C. L. Subspecies and species-specific antigens of *Leishmania mexicana* characterized by monoclonal antibodies. *J Immunol*, v. 134, p. 1935-1940, 1985.

McMAHON-PRATT, D. M.; BENNETT, E.; DAVID, J. R.; JAFFE, C. L.; GRIMALDI, G. Studies employing monoclonal antibodies for the analysis of the genus *Leishmania* Ross, 1903. In: RIOUX, J. A. (Ed). *Leishmania*. Taxonomy and phylogeny. Montpellier. IMEEE, p. 173-178, 1986.

MEIJA, A. M.; TRIANA, O. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. *Biomedica*. v. 25(1), p.76-86, 2005.

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.

MIGONE, L. E. Un cas de Kala-zar à Assuncion (Paraguay). *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, v. 6, p. 118-120, 1913.

MILLES, 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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, Brasil, 122 p. 2003.

MOLINA, R.; LOSHE, J. M.; PULIDO, F.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; ALVAR, J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.* v. 60(1), p.51-3, 1999.

MOMEN, H.; SALLES, C. A. Enzyme markers for *Vibrio cholerae*; identification of classical, el tor and environmental strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* v. 79, p. 773-776, 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.

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.

MORALES, M. A.; CHICHARRO, C.; ARES, M.; CANAVATE, C.; BARKER, D.C.; ALVAR, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 95(1), p. 104-107, 2001.

MORALES, M. A.; CRUZ, I.; RUBIO, J. M.; CHICHARRO, C.; CANAVATE, C.; LAGUNA, F.; ALVAR, J. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis.* v. 15, p.1533-1537, 2002.

MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprint of kinetoplast DNA minicircle. *Am J Trop Med Hyg.* v. 29(suppl.), p. 1070-1074, 1980.

MORENO, E. C.; MELO, M. N.; LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; ANDRADE, A. S.; ANTUNES, C. M.; GENARO, O.; CARNEIRO, M. Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 39(5), p. 421-7, 2006.

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.* v. 83(1), p. 150-154, 1996.

MULLIS, K. B.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol.* v.155, p.335-350, 1987.

MYLER, P. J.; STUART, K. D. Recent developments from the *Leishmania* genome project. *Curr Opin Microbiol.* v. 3(4), p. 412-6, 2000. Review.

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.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de *Leishmania* (ou organisms voisins) du gondi. *C R Acad Sci.* v. 146, p. 207-209, 1908.

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. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nat.* v. 342, p. 705-708, 1989.

NOYES, H. A.; BELLI, A. A.; MAINGON, R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *Am J Trop Med Hyg.* v. 55(1), p. 98-105, 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. 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.

OLIVEIRA, C. L.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA S. D. An alternative approach to evaluating the intraespecific genetic variability of parasites. *Parasitol Today*, v. 13, p. 196-200, 1997.

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.

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., p. 57-65, IMEEE, Montpellier, 1986.

PACHECO, R. S. ; BRITO, C. M.; Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;94 v. 1, p.199-201, 1999.

PAGÉS, M.; BSTIEN, P.; VEAS, F.; ROSSI, V.; BELLI, M.; WINCKER, P.; RIOUX, J. A.; ROIZES, G. Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol Biochem Parasitol*, v. 36, p. 161-168, 1989.

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics*. v. 39, p. 839-47, 2007.

PENA, S. D. J. & NUNES, A. C. DNA – POP and DNA – PATTERN, two simple computer programs for population studies and paternity analysis with DNA fingerprintings. *Fingerprintings 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.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico*. v. 48, p. 949-950, 1934.

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 India. *Ann Trop Med Parasitol*. v. 5, p. 247-249, 1981.

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.

POGUE, G. P.; KOUL, S.; LEE, N.S.; DWYER, D. M.; NAKHASI, H. L. Identification of intra- and interspecific *Leishmania* genetic polymorphisms by arbitrary primed polymerase chain reactions and use of polymorphic DNA to identify differentially regulated genes. *Parasitol Res*. v. 81(4), p. 282-290, 1995.

PRATLONG, F.; RIOUX, J. A.; MARTY, P.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; DEREURE, J.; LANOTTE, G.; DEDET, J. P. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol*. v. 42(9), p. 4077-82, 2004.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BELO HORIZONTE. Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose visceral no município de Belo Horizonte. Disponível em <http://portal1.pbh.gov.br/pbh/index.html?id_conteudo=11580&id_nivel=1&ver_servico=N> Acesso 28 de setembro 2007.

PROFETA, Z. M. L.; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A. L.; FIÚZA, V. O.; RABELLO, A. Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 34(3), p. 249-254, 2001.

QUISPE TINTAYA, K. W.; YING, X.; DEDET, J. P.; RIJAL, S.; DE BOLLE, X.; DUJARDIN, J. C. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J Infect Dis.* v. 189(6), p.1035-43, 2004.

RIOUX, J. A. *Leishmania*. Taxonomy and phylogeny. Montepplier.IMEEE. 1986.

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

RODRIGUES, N. B.; COURA FILHO, P.; DE SOUZA, C .P.; JANNOTI PASSOS, L. K.; DIAS-NETO, E.;ROMANHA, A. J. Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites. *Int J Parasitol.* v.32(7), p.843-851, 2002.

RODRIGUES-BONFANTE, C.; BONFANTE-GARRIDO, R.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; CUPOLLILO, E. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect Genet Evol.* v. 3 (2), p. 119-24, 2003.

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.

ROMANHA, A. J. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. 1982. 110 f.(Tese Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, Belo Horizonte.

ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J.* v. 14, p. 70-72, 1903.

- 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. 271-282, 1994.
- RUNCIMAN, D.; ZANN, R. A.; MURRAY, N. D. A. W-chromosome linked marker for gender identification in the zebra finch. *Anim Genet*, v. 30, p. 66-67, 1999.
- SAIKI, R. B.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARHEIN, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S. & ERLICH, H. A. Primer direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. v. 239, p. 487-491, 1988.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2 ed. Cold Spring harbor Laboratory Press, USA. 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 74(12), p. 5463-7, 1977.
- 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 Gene*. v. 90, p. 655-656, 1993.
- SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, V. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.88, [s.n.], p.21-30, 2002.
- 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 metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol Biochem parasitol*, v. 129, p.103-114, 2003.
- 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.

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 Parasitol*. v. 75, p. 131-144, 1981.

SCHOTELIUS, J. Lectin binding strain-specific carbohydrates on the cell surface of *Leishmania* strains from the Old World. *Z Parasitenkd*, v. 66, p. 237-293, 1982.

SCHOTELIUS, J.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Studies on the relationships between lectin binding carbohydrates and different strains of *Leishmania* from the New World. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 77, p. 19-27, 1982.

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

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: Present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 89, p. 471-478, 1994.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 101(5), p. 577-9, 2006.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C .M. F.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O. P. & BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 96(3), p.285-291, 2001a.

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

STALLINGS, R. L.; FORD, A. F.; NELSON, D.; TORNEY, D. C.; HILDEBRAND, C. E. & MOYZIS, R. K. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, v. 10, p. 807-815, 1991.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res*. v. 25, p. 4127-4138, 1984.

- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* v. 17(16), p.6463-6471, 1989.
- TAVARES, C. C.; GRIMALDI, G.; 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.
- TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol.* v. 114(4), p. 279-288, 2006.
- 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.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G.; RIOX, 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.
- TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 87(7), p. 2414-2418, 1990.
- TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, 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.1335-1339, 1993.
- TIBAYRENC, M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol.* v. 36, p.47-115, 1995.
- TOLEDO, A.; MARTIN-SANCHEZ, J.; PESSON, B.; SANCHIZ-MARIN, C.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol Biochem Parasitol.* v. 119(2), p. 257-264, 2002.
- 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. 2153-2159, 1996.

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.

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 Appllic Biosci.* v. 10, p. 569-570, 1994.

VICTOIR, K.; BAÑULS, A. L.; AREVALO, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; HAMERS, R.; NOEL, S.; DE DONCKER, S.; LE RAY, D.; TIBAYRENC, M.; DUJARDIN, J. C. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitol.* v. 117(Pt 1), p.1-13, 1998.

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*, v. 87(12), p. 1056-1059, 2001.

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. 388-396, 1989.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.* v. 18, p. 7213-7218,. 1990.

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.* v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WIRTH, D. F.; McMAHON-PRATT, D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad USA*, v. 79, p. 6999-7003, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Tech. Rep. Ser. 793. World Health Organization Committee, Geneva, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). TDR diseases/Diseases current portfolio Available < <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm> > 30/12/2003

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.

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.

ZEMANOVÁ, E.; JIRKU, M.; MAURÍCIO, I. L.; MILES, M. A.; LUKES, J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg.* v. 70(6), p.613-7, 2004.

ZERPA, O.; PRATLONG, F.; ULRICH, M.; CONVIT, J. Isolation of *Leishmania infantum*, zymodeme MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 96(7), p.901-2, 2001.

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.

ANEXOS

10 ANEXOS - Sistemas de revelação de enzimas

Enzimas	Tampão de Reação Tris HCl 0,05 M	H ₂ O (mL)	Substratos 200 mg/10 mL	Coenzimas 40 mg/10 mL	Ativadores 4 g/20 mL	Enzimas de ligação	Métodos de visualização	Observações
MDH (1)	4 mL pH 8,0	-	1 mL 1M malato de sódio	2 mL NAD	-	-	2 mL MTT/ 1 mL pms 10 mL de garose	2,7 g ácido L-málico/20 mL H ₂ O ajustar com NaOH p/ pH 7,0
ME (1)	4 mL pH 7,4	1 mL	1 mL 1M malato de sódio	1 mL NADP	200 µL MgCl ₂	-	Idem MDH	Idem MDH
NH (2)	4 mL pH 7,4	3 mL	30 mg inosine	-	-	10 µL xantine oxidase	Idem MDH	-
PEP D	4 mL pH 7,4	5 mL	10 mg L-leucil-prolina	-	20 mg MnCl ₂	2 mg amino oxidase (100 4U peroxidase	1 mL 3 amino etil carbazole (100 mg/5 mL de etanol) 10 mL de agarose	-
PGM (2)	4 mL pH 7,4	-	2 mL glicose-1-fosfato	1 mL NADP	200 µL MgCl ₂	2U G6PDH	Idem MDH	-
ACON (1)	4 mL pH 8,0	-	2 mL cis-aconitato	1 mL NADP	1 mL MgCl ₂	2U IDH	Idem MDH	40 mg cis-aconit. + 2 mL H ₂ O + 4 mL TRIS-HCl pH 8,0 Ajustar c/ NaOH p/ pH 8,0
GPI (2)	4 mL pH 8,0	1 mL	1 mL frutose-6-fosfato	1 mL NADP	200 µL MgCl ₂	2U G6PDH	Idem MDH	-
G6PDH (1)	4 mL pH 7,4	-	1 mL glicose-6-fosfato	2 mL NADP	300 µL MgCl ₂	-	Idem MDH	-
IDH (1)	4 mL pH 8,0	-	2 mL isocitrato	1 mL NADP	200 µL MgCl ₂	-	Idem MDH	1 mL de esocitrato
6PGD (2)	4 mL pH 8,0	-	2 mL 6-fosfo-gluconato	1 mL NADP	500 µL MgCl ₂	-	Idem MDH	Trisodium 1 mL Bário 2 mL

