



**Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima**

**Tese de Doutorado**

**“Estudo da Variabilidade Genética de  
*Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911  
de Diferentes Regiões do Brasil”**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte - MG  
Dezembro - 2010**

**Ana Cristina Vianna Mariano da Rocha Lima**

**“Estudo da Variabilidade Genética de  
*Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911  
de Diferentes Regiões do Brasil”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Parasitologia do Departamento de Parasitologia  
do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutor em Ciências  
**Área de concentração:** Protozoologia

**Orientadora:** Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, Laboratório de Leishmanioses,  
Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG.

**Co-orientadores:** Dra. Maria Norma Melo, Laboratório de Biologia de  
Leishmania, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.  
Dr. Jeffrey Jon Shaw, Universidade de São Paulo, USP.

**Belo Horizonte - MG  
Dezembro-2010**

**ATA**

## Sumário

<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	2
1.1	Leishmaniose Tegumentar	2
1.2	Leishmaniose Tegumentar Americana	5
1.3	Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil	8
1.4	Biomos e Leishmaniose Tegumentar	14
1.5	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	17
1.6	Estudo da diversidade genética de <i>Leishmania</i>	20
1.7	Estudo da diversidade genética de <i>Leishmania braziliensis</i>	28
<b>2.</b>	<b>Justificativa</b>	36
<b>3.</b>	<b>Objetivos</b>	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
<b>4.</b>	<b>Material e métodos</b>	41
4.1	Parasitos	41
4.2	Obtenção de massa de promastigotas	48
4.2.1	Contagem dos parasitos em câmara de Neubauer	48
4.2.2	Lavagem e estocagem dos parasitos para utilização em técnicas moleculares	49
4.2.3	Lavagem e estocagem dos parasitos para a eletroforese de isoenzimas	49
4.3	Eletroforese de isoenzimas (Multi Locus Enzyme Electrophoresis) em gel de agarose	50
4.3.1	Análise dos géis de isoenzimas	55

## Sumário

4.4	Extração de DNA	55
4.5	Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR)	56
4.6	Reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de seqüência simples (SSR-PCR)	57
4.7	Gel de Poliacrilamida	61
4.7.1	Coloração do gel de poliacrilamida pela prata	61
4.8	PCR-RFLP	62
4.8.1	PCR específico direcionado para a região ITS-1-rDNA	62
4.8.1.1	RFLP dos produtos da PCR da região ITS-1-rDNA	64
4.8.2	PCR específico direcionado para a região <i>hsp70</i>	64
4.8.2.1	RFLP dos produtos da PCR da região <i>hsp70</i>	66
4.9	Eletroforese dos produtos de digestão (RFLPs)	66
4.10	Análise dos resultados	67
5.	<b>Resultados</b>	70
5.1	Eletroforese de isoenzimas (MLEE) em gel de agarose	70
5.2	Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR)	81
5.3	Reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de seqüências simples (SSR-PCR)	86
5.4	PCR-RFLP	96
5.4.1	Amplificação da região ITS-1 rDNA (ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO 1 de rDNA)	96
5.4.1.1	Produção de perfis de restrição (RFLPs) da região ITS-1-rDNA	96
5.4.2	Amplificação da região <i>hsp70</i>	101
5.4.2.1	Produção de perfis de restrição (RFLPs) da região <i>hsp70</i>	101

6.	<b>Discussão</b>	108
7.	<b>Conclusões</b>	124
8.	<b>Referências bibliográficas</b>	126

## Lista de tabelas e quadros

<b>Tabela 1:</b>	Características demográficas e clínicas dos casos de LTA. Brasil, 2008	12
<b>Tabela 2:</b>	Biomassas do Brasil	15
<b>Tabela 3:</b>	Características das amostras de <i>Leishmania braziliensis</i> estudadas	45
<b>Tabela 4:</b>	Amostras de Referência da OMS utilizadas	47
<b>Tabela 5:</b>	Tampões utilizados nos eletrodos e na eletroforese de enzimas	51
<b>Tabela 6:</b>	Preparação do gel de agarose para isoenzimas	51
<b>Tabela 7:</b>	Solução de corantes indicadores da velocidade e do término da corrida eletroforética	52
<b>Tabela 8:</b>	Sistema de revelação de enzimas	54
<b>Tabela 9:</b>	Concentração dos reagentes utilizados na PCR-CARY	59
<b>Tabela 10:</b>	Concentração dos reagentes utilizados na PCR-K7	59
<b>Tabela 11:</b>	Concentração dos reagentes utilizados na PCR - ITS1	63
<b>Tabela 12:</b>	Concentração dos reagentes utilizados na PCR - <i>hsp70</i>	65
<b>Tabela 13:</b>	Eletromorfos observados nas amostras de <i>Leishmania braziliensis</i> estudadas e nas cepas de referência	72
<b>Tabela 14:</b>	Número de alelos encontrados por <i>locus</i> enzimático nas espécies estudadas	74
<b>Quadro 1:</b>	Principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas causadores de doença em humanos nas Américas	07
<b>Quadro 2:</b>	Distribuição das amostras de <i>L. braziliensis</i> estudadas segundo região geográfica e bioma	43

## Lista de tabelas e quadros

<b>Quadro 3:</b>	Diagrama dos perfis das enzimas	73
<b>Quadro 4:</b>	Perfis encontrados nas amostras de <i>L. braziliensis</i> de diferentes biomas e regiões geográficas do Brasil	75
<b>Quadro 5:</b>	Índice de similaridade entre as amostras estudadas e as cepas de referência das espécies <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> e <i>L. naiffi</i>	76
<b>Quadro 6</b>	Resumo da distribuição das amostras por biomas e regiões com diferentes marcadores moleculares	106

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b>	Casos e coeficiente de detecção de LTA. Brasil, 2000 a 2008	10
<b>Figura 2:</b>	Casos de LTA e percentual, segundo região de residência. Brasil 2000 a 2008	11
<b>Figura 3:</b>	Densidade de casos e circuitos de produção de LTA por município. Brasil, 2005 a 2007, e casos em 2008	13
<b>Figura 4:</b>	Localização dos estados e regiões geográficas de origem das amostras de <i>Leishmania braziliensis</i> utilizadas no estudo	41
<b>Figura 5:</b>	Localização das amostras utilizadas no estudo em relação aos biomas brasileiros	42
<b>Figura 6:</b>	Seqüência dos iniciadores para a amplificação das regiões inter-repetições de seqüências simples (primer (CA) <sub>8</sub> RY) e regiões de SSR e inter SSR (primer (CAA(CT) <sub>6</sub> ) conhecido como “primer K7”)	58
<b>Figura 7:</b>	Organização do locus do rDNA de tripanozomatídeos. Subunidades conservadas: SSU (subunidade menor) e LSU (subunidade maior) Subunidade variável: ITS1 e ITS2	62
<b>Figura 8:</b>	Perfil enzimático de isocitrato desidrogenase (IDHNADP)	77
<b>Figura 9:</b>	Perfil enzimático de glicose - 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e malato desidrogenase (MDH)	78
<b>Figura 10:</b>	Perfil enzimático de 6-fosfo-glico desidrogenase (6PGDH), enzima málica (ME) e fosfo-gluco mutase (PGM)	79
<b>Figura 11:</b>	Perfil enzimático de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), isocitrato desidrogenase (IDH) e malato desidrogenase (MDH)	80
<b>Figura 12:</b>	Perfil obtido das amostras estudadas pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata	83
<b>Figura 13:</b>	Dendograma, construído pelo método UPGMA programa NTSYS com a técnica de RAPD com o iniciador M1340F	84

## Lista de figuras

- Figura 14:** Dendograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F, o agrupamento das cores representa os Biomas 85
- Figura 15:** Dendograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F, o agrupamento das cores representa os Biomas 85
- Figura 16:** Dendograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F, o agrupamento das cores representa as regiões 85
- Figura 17:** Dendograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F, o agrupamento das cores representa as regiões 85
- Figura 18:** Perfil obtido das amostras estudadas pela técnica de SSR com o iniciador Cary em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata 89
- Figura 19:** Dendograma, gerado pelo método UPGMA programa NTSYS, pela técnica de SSR com o iniciador CARY 90
- Figura 20:** Dendograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa os Biomas 91
- Figura 21:** Dendograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa os Biomas 91
- Figura 22:** Dendograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa as regiões 91
- Figura 23:** Dendograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa as regiões 91

## Lista de figuras

<b>Figura 24:</b>	Perfil obtido das amostras estudadas pela técnica de SSR para o iniciador K7, aplicados em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata	92
<b>Figura 25:</b>	Dendograma gerado pelo método UPGMA programa NTSYS, pela técnica de SSR com o iniciador k7	93
<b>Figura 26:</b>	Dendograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador K7, agrupamento das cores representa os Biomas	94
<b>Figura 27:</b>	Dendograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador K7, o agrupamento das cores representa os Biomas	94
<b>Figura 28:</b>	Dendograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador K7, o agrupamento das cores representa as regiões	94
<b>Figura 29:</b>	Dendograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador K7, o agrupamento das cores representa as regiões	94
<b>Figura 30:</b>	Árvore consenso gerada pelo programa Dollop com os dados concatenados	95
<b>Figura 31:</b>	Árvore consenso gerada pelo programa Mix com os dados concatenados	95
<b>Figura 32:</b>	Gel de agarose mostrando a amplificação da região ITS-1-rDNA	97
<b>Figura 33:</b>	Perfil do PCR-RFLP de ITS1 - HAEIII, gel de agarose	98
<b>Figura 34:</b>	Perfil 1 e 2 das amostras para PCR-RFLP de ITS1-HAEIII em relação ao bioma e região geográfica	99
<b>Figura 35:</b>	Perfil do PCR-RFLP de ITS1 - BstUI, gel de agarose	100
<b>Figura 36:</b>	Gel de agarose mostrando a amplificação da região <i>hsp70</i>	102

<b>Figura 37:</b>	Perfil do PCR-RFLP de <i>hsp70</i> - HAEIII, gel de agarose	103
<b>Figura 38:</b>	Perfil do PCR-RFLP de <i>hsp70</i> - BstUI, gel de agarose	103
<b>Figura 39:</b>	Perfis 1, 2 e 3 das amostras para <i>hsp70</i> -BstUI. Agrupamento relativo ao bioma de cada localidade (cor do fundo) e por região geográfica (cor das letras)	104

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

BH: Belo Horizonte

Cm: centímetros

CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou

DNA: Ácido desoxirribonucleotídico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos 5' fosfato

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

*hsp-70*: Proteína do choque térmico

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ITS-1: Internal Transcribed Spacers-1

kDNA: DNA do cinetoplasto

*L.*: *Leishmania*

LIT: Liver Infusion Tryptose - (Infusão de fígado e triptose)

LT: Leishmaniose Tegumentar

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

*Lu.*: *Lutzomyia*

LV: Leishmaniose visceral

LVC: Leishmaniose visceral canina

MFF: MACS FACS FIX

MG: Minas Gerais

MLEE: Eletroforese de enzimas multilocus

MS: Ministério da Saúde

µL: microlitros

mM: Milimolar

µM: micromolar

ng: nanograma

NNN: Meio de cultura de Novy, McNeal e Nicolle

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Phosphate Buffer Solution – (Tampão salina fosfato)

pb: Pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction – (Reação em cadeia da polimerase)

PM: Peso Molecular

RAPD: Amplificação aleatória de DNAs polimórficos

RFLP: Restriction Fragment Length Polimorfism – (Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição)

SINAN: Sistema Nacional de Agravos Notificados

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

SSR: Região de sequência simples

SVS: Sistema de vigilância sanitária

Un: unidades

UnB: Universidade de Brasília

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV: ultravioleta

WHO: World Health Organization

Este trabalho é dedicado à melhor pessoa que já conheci, exemplo de vida, honestidade e sabedoria, meu querido pai, Amaro

Agradeço ao Marcelo, João Pedro e Zely (mamãe) pelo amor, apoio e paciência durante todo o trabalho

“É graça Divina começar bem.  
Graça maior persistir na caminhada.  
Mas graça das graças é não desistir nunca.”  
(D. Hélder Câmara)

## Agradecimentos

À Deus, pela força em todos os momentos difíceis

À toda minha família, Cynthia, Luizinho, Heron (meu afilhado), tia Jane, Léo, pelo companheirismo nesta caminhada

À meus cunhados, Adriana, Zé Roberto, Alex, a minha sogra Zenaide e a Stephanie pelo incentivo sempre

À Dra. Célia Gontijo, pela orientação, pelos ensinamentos, pela oportunidade, amizade e apoio durante toda esta caminhada. Obrigada por tudo!!!

À professora Maria Norma Melo, pela paciência, disponibilidade em ajudar sempre, amizade e exemplo de vida

Ao Dr. Shaw pela consideração e exemplo de profissionalismo

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa de seu coordenador professor Marcos Horácio, pela oportunidade de crescimento científico

Aos professores e funcionários do departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG, ao Dr. Álvaro Romanha, pela oportunidade e apoio.

Ao Dr. Edelberto Santos Dias, chefe do laboratório de *Leishmanioses* (LALEI) do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG pelo apoio e consideração

A todos os pesquisadores que disponibilizaram as amostras para o estudo

Ao Dr. Gustavo Romero da Universidade de Brasília (UNB) por ter codificado e enviado as amostras para cultura

À Dra. Elisa Cupolillo do laboratório de Referência Nacional para tipagem de *Leishmania* (LRNTL)/IOC/FIOCRUZ/RJ pela oportunidade de aprendizado e a colaboração, permitindo que eu realizasse a técnica de isoenzimas

Ao pessoal do CBIO, Dr. Roney Coimbra, Dr. Fabiano Pais e Francislton pelo esforço na construção dos dendogramas por parcimônia

À Marcela (LEM) por me ensinar a usar o NTSYS, ao Dr. Rodrigo Soares e Junara (LEM) pelos ensinamentos e a tentativa de isolarmos e caracterizar o LPG de amostras *L. braziliensis*

Aos funcionários e amigos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, especialmente a todos os técnicos pelo apoio

Aos amigos do laboratório de Leishmanioses, da professora Norma, Nino, Iara, Lara, Soraya, pela companhia e incentivos e especialmente a Rosângela, pela ajuda com os géis de poliacrilamida

Aos colegas do laboratório de Leishmanioses (LALEI) e do CRNIF pelo apoio, incentivo e amizade: Érika (amiga, obrigada pela força), Dú (obrigada pela ajuda com a bibliografia e etc..), Patrícia, Rafael, Felipe, Raquel, Janaina, Eloisa, Débora, Laura (obrigada pela ajuda com a bibliografia e etc..), Agnes, Lutiana, Fabiana, Ailton, Luciana Moura, Gustavo Paz, Lisiane, Karina, Josiane, Shara, D. Alda, Regina, Leco, Cris, Helbert, Gustavo, Rogério

A todos que colaboraram no decorrer deste trabalho. Obrigada!!!

**Resumo** – ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

*Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie mais prevalente nos casos humanos da leishmaniose tegumentar nas Américas. Polimorfismo genético têm sido encontrado em populações naturais de diferentes espécies de *Leishmania*, o que explicaria a adaptação destes parasitos às mudanças observadas nas condições ambientais. Neste estudo utilizou-se um painel significativo de isolados *L. braziliensis* de focos de LTA de diferentes regiões geográficas e biomas do Brasil. Os polimorfismos do DNA genômico foram analisados utilizando-se diferentes marcadores genéticos, comparou-se a variabilidade genética intra-específica das amostras e determinou-se as relações fenéticas entre elas. Na eletroforese de isoenzimas (MLEE), a maioria das amostras (87,3%) apresentou o perfil de migração idêntico ao da cepa padrão de *L. braziliensis* (M2903); 8 amostras (10,2%) apresentaram apenas um eletromorfo diferente para a enzima IDHNADP. Duas amostras (2,6%) apresentaram o perfil mais heterogêneo, com padrões diferentes de *L. braziliensis* para 3 enzimas (G6PDH, IDHNADP e MDH). Estas amostras foram designadas como variantes. Para o RAPD-PCR com o iniciador M1340F pode-se observar que o conjunto dos isolados formaram claramente dois grandes clusters, pela análise com o programa NTSYS, refletindo a diversidade genética entre as amostras de *L. braziliensis* testadas. A análise dos perfis gerados pela SSR-PCR evidenciou que os iniciadores CARY e K7 foram capazes de mostrar variabilidade intra-específica. Observou-se que com o iniciador CARY, as amostras agruparam-se em um cluster, incluindo a cepa de referência de *L. braziliensis*. Por outro lado, com o iniciador K7 observou-se a formação de dois “clusters”. Uma árvore consenso foi gerada por parcimônia com os dados concatenados dos três marcadores utilizados (M1340F, CARY e K7) e observou-se a formação de dois “clusters” onde a maioria das amostras do bioma Amazônia /região Norte (58%) e região Nordeste (62%) estão juntas em um grupo e o bioma Cerrado /região Centro-Oeste (100%), Cerrado e Mata Atlântica (67%) e a região Sul (80%) estão em outro grupo, o que concorda com a análise feita pelo método de distância genética. Foram encontrados dois perfis para ITS1-HAEIII e após a análise dos géis foram identificados três perfis para *hsp70*-BstUI. Observou-se que o índice de similaridade médio entre as amostras para os testes de isoenzimas, RAPD-PCR com o iniciador M1340, SSR-PCR com o iniciador CARY e K7 foi de aproximadamente 70%, demonstrando a existência de variabilidade de *L. braziliensis* confirmada através das diferentes técnicas utilizadas. Combinando os resultados da análise por biomas e por região, podemos dizer que a maioria das amostras do bioma Amazonas, região Norte e bioma Caatinga estão sempre agrupadas em um mesmo “cluster” e o bioma Cerrado, região centro-oeste em outro “cluster”. Este estudo refletiu a diversidade genética existente em *L. braziliensis* sugerindo a possibilidade de uma associação entre variabilidade e origem geográfica.

**Abstract-** STUDY OF GENETIC VARIABILITY OF *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 FROM DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL

*Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most prevalent species in human cases of ACL in Americas. Studies have shown genetic polymorphism in natural populations of different species of *Leishmania* which would explain the adaptation of these parasites to changes in environmental conditions. In this study we used a significant panel of isolates of *L. braziliensis* from different geographical regions and biomes of Brazil. The polymorphisms of genomic DNA were analyzed using different genetic markers and the intraspecific genetic variability of samples was compared to determine phenetic relationships between them. In isoenzyme electrophoresis (MLEE), most of samples (87.3%) showed a migration profile similar to the standard strain of *L. braziliensis* (M2903) and 8 samples (10.2%) showed only one electromorph different. Two samples (2.6%) presented a more heterogeneous profile, with different patterns of *L. braziliensis* for three enzymes (G6PDH, and MDH IDHNADP). These samples were designated as variants. For RAPD-PCR using M1340F primer it was observed the formation of two major clusters by the analysis with the NTSYS program, reflecting the genetic diversity among samples of *L. braziliensis* tested. The analysis of profiles generated by SSR-PCR showed that the primers K7 and CARY were able to show intra-specific variation. With CARY primer it was observed that samples were grouped in one cluster, including the reference strain of *L. braziliensis*. On the other hand with K7 primer it was observed the formation of two clusters. The consensus tree was generated by parsimony with the concatenated data of the three markers used (M1340F, CARY and K7) and observed the formation of two clusters where most of the samples from the Amazon / North (58%) and region Northeast (62%) are put together in one group and the Cerrado / Midwest (100%), Cerrado and Atlantic Forest (67%) and South (80%) are in another group, which agrees with the analysis by the method of genetic distance. Two profiles were found for ITS1-HaeIII and after analysis of the hsp70-BStU gels were identified three profiles. It was observed that the average index of similarity between samples tested for isoenzymes, RAPD-PCR using primer M1340, SSR-PCR with primer CARY and K7 was approximately 70%. Combining the results of analysis by region and biome, we can say that most of the samples from Amazon biome/ North and Caatinga biome are always grouped in one cluster and the Cerrado/ Midwest in another cluster. This study reflected the genetic diversity in *L. braziliensis* suggesting the possibility of an association between variability and geographic origin.

## ***1.Introdução***

### 1. Introdução

#### 1.1 Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar compreende um grupo de doenças crônicas causadas por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem a ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae. Os parasitos possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando estádios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados. Apresentam duas formas distintas em seu ciclo biológico: as promastigotas que são formas extracelulares, flageladas e móveis, encontradas no tubo digestivo dos insetos vetores e as formas amastigotas que são obrigatoriamente intracelulares, sem flagelo livre, imóveis e que são encontradas no interior das células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), sobretudo, os macrófagos dos hospedeiros mamíferos. Após a internalização das promastigotas nas células hospedeiras dos vertebrados, estas se transformam em formas amastigotas e se multiplicam, ocorre então o rompimento da célula e liberação dos parasitos que vão infectar outros macrófagos. Os flebotomíneos são contaminados a partir de reservatórios infectados, que são fundamentais para o estabelecimento da doença humana. O desenvolvimento de *Leishmania* no tubo digestivo do inseto é complexo, as formas promastigotas passam por várias mudanças até se diferenciarem em formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, que são denominadas promastigotas metacíclicas (Bates, 2007).

A *Leishmania* é transmitida para o vertebrado através da picada de fêmeas hematófagas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, conhecidos como flebotomíneos, sendo os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* distribuídos no Novo e no Velho Mundo, respectivamente. No Novo Mundo, a leishmaniose humana apresenta duas formas clínicas básicas: a Leishmaniose Visceral (LV) que é causada por *L. chagasi* (= *L. infantum*) (Maurício et al., 2000; Lukes et al., 2007), e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) que é

causada por várias espécies de *Leishmania* que parasitam principalmente macrófagos da pele.

A nomenclatura de *Leishmania* vem sendo discutida e novas taxonomias vêm sendo propostas. A grande diversidade de espécies de *Leishmania* no Novo Mundo tem sugerido que estes parasitos se originaram nas Américas e que a dispersão do gênero *Leishmania* para o Velho Mundo se deu pelo Estreito de Bering (Noyes et al. 1997). Outros autores concordam com esta hipótese e postulam a introdução de um parasito ancestral de *Leishmania* no Velho Mundo e a evolução de *L. donovani* e *L. infantum*, se diversificando após migração para Europa e Ásia. 500 anos atrás, *L. infantum* da Europa (cepa MON-1) foi transferida para América do Sul e denominada *L. chagasi* (sinônimo de *L. infantum*), o parasito teria entrado no Novo Mundo através dos colonizadores (Lukes, 2007).

Para Lainson (2010) não só a evolução de *L. donovani* e *L. infantum* se deu no Velho Mundo como também a evolução de membros do complexo *L. (L.) tropica*; outro processo evolucionário de um parasito ancestral comum continuou no Novo Mundo, produzindo o parasito viscerotrópico *L. chagasi* e dermatotrópicos do subgênero *Leishmania*. Ao mesmo tempo outra linhagem ancestral divergiu para formar o subgênero *Viannia*, onde seus membros retêm a característica primitiva de desenvolvimento no intestino posterior do flebotomíneo (mas os parasitos também migram para os intestinos médio e anterior), este subgênero só esta presente no Novo Mundo.

O gênero *Leishmania* formou um grupo monofilético com três subgêneros distintos *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)* em estudos utilizando-se seqüência de hsp70 (proteína do choque térmico) e suportou a existência de somente oito espécies de relevância médica (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*) comparada a dezessete espécies definidas por isoenzimas (Fraga et al. 2010).

A LT é uma doença que desde a antigüidade vem atingindo o homem e existem relatos sobre ela na literatura desde o primeiro século D.C., na Ásia Central. A doença era conhecida como “úlceras de Balkh”, nome derivado da cidade de Balkh que é uma área altamente endêmica de LT, no norte do Afeganistão. Outros nomes já foram dados a estas lesões, tais como “botão do Oriente”, “úlceras de Delhi”, “botão de Biskra”, “úlceras de Bagdad”, “úlceras de Ashkabad” e outros, normalmente baseados na região onde elas ocorriam de forma endêmica (Brumpt & Pedroso 1913, Grevelink & Lerner, 1996).

As leishmanioses cutâneas do Velho Mundo são conhecidas há milênios, encontrando-se referência a elas nos textos bíblicos e nos manuscritos orientais. As primeiras descrições científicas foram feitas no século XVIII, e os parasitos descobertos por Borovski, 1897.

Os parasitos que causam as formas tegumentares no Velho Mundo pertencem ao complexo *L. (L.) tropica*, e são eles *L. tropica*, *L. major* e *L.aethiopica*. *L. tropica* é o agente etiológico da leishmaniose antroponótica ou urbana. Produz úlceras crônicas e indolores na pele, cicatrizando espontaneamente; *L. major* causa leishmaniose cutânea zoonótica ou rural, também apresentam úlceras indolores quando não se complicam, as lesões evoluem para úlcera úmida e com freqüência são múltiplas; *L.aethiopica* de modo geral produz lesões cutâneas simples, mas podem produzir leishmaniose cutânea difusa (Neves, 2005).

Atualmente são conhecidas cerca de 15 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem e causar a leishmaniose tegumentar em diferentes regiões do mundo. A leishmaniose tegumentar ocorre no Velho Mundo desde o Senegal e Namibia na África, até a Índia e Mongólia e no sul da França. No Novo Mundo tem sido registrada em quase todos os países americanos, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (Lainson, 1983). É uma doença re-emergente e encontra-se em franca expansão em várias regiões do Brasil.

A leishmaniose ocorre em diferentes climas e zonas ecológicas, sendo endêmica em países de quatro continentes - Ásia, África, Europa e América. A incidência da leishmaniose cutânea e mucocutânea estão estimadas entre 1.000.000 e 1.500.000 casos novos por ano. Entretanto, em várias áreas endêmicas o número de casos é subestimado considerando-se as falhas e dificuldades inerentes à notificação compulsória (WHO, 2002).

Entre os casos da forma tegumentar, 90% ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Sudão; a maioria destes países é classificado como em desenvolvimento sendo que, em todos, as leishmanioses ocorrem nas regiões mais pobres. Assim, a morbi-mortalidade desses agravos é motivo de grande preocupação uma vez que, nas áreas sob maior risco, há grande proporção de miseráveis em situação de má-nutrição, debilidade imunológica e inadequadas condições de higiene e moradia o que pode ser ainda mais grave quando ocorre a coinfeção com HIV (WHO, 2002). Atualmente as leishmanioses apresentam uma distribuição geográfica mais ampla do que antigamente, sendo agora reportadas em áreas onde não eram endêmicas (WHO, 2002).

Nas áreas periurbanas, as taxas de infecções subclínicas ou inaparentes decorrentes da permanente exposição do homem às picadas infectantes com leishmanias dermatrópicas e viscerotrópicas, prenunciam um grave problema associado à circulação do vírus HIV, neste caso transformando as leishmanioses em importante parasitose oportunista (Marzochi & Marzochi, 1994).

### **1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana**

As leishmanioses neotropicais são zoonoses, doenças naturalmente transmitidas entre o homem e outros vertebrados. No ciclo natural da doença zoonótica os parasitos circulam naturalmente entre animais silvestres. O homem se infecta quando penetra neste ambiente e provoca um desequilíbrio na relação

entre o parasito e seus hospedeiros naturais. A doença é transmitida através dos vetores infectados entre reservatórios silvestres e domésticos, sendo o homem um hospedeiro acidental. O ciclo, inicialmente silvestre e rural, já se encontra presente em grandes cidades, como resultado da adaptação de vetores e reservatórios ao ambiente urbano, processo este conhecido como a urbanização das leishmanioses no Novo Mundo (Silva et al., 2005).

No Novo Mundo, existem evidências de que a LTA já ocorria no continente antes mesmo da chegada dos colonizadores. A leishmaniose tegumentar foi documentada na América desde 400-900 D.C., em cerâmicas pré-colombianas feitas pelos índios do Peru, apresentando mutilações de lábios e narizes e os conquistadores espanhóis também relataram a ocorrência da doença na população que habitava o continente (Lainson & Shaw, 1998). As primeiras descrições clínicas datam do século XVI por Oviedo, 1535 e Pizarro, 1571, como uma doença que destruía o nariz e as cavidades bucais de índios na encosta da Cordilheira dos Andes.

A LTA é causada por espécies de *Leishmania* dermatrópicas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, que inclui um grupo de doenças comumente referidas por suas características clínico-patológicas como forma cutânea, cutâneo-mucosa e cutânea difusa.

Nas Américas, são reconhecidas atualmente 13 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana (quadro 1).

**Quadro 1.** Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadores de doença em humanos nas Américas.

<b>Subgênero <i>Viannia</i> Lainson &amp; Shaw, 1972</b>	<b>Acometimento clínico no homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> Vianna, 1911	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao norte da Argentina
<i>Leishmania (V.) peruviana</i> Velez, 1913	Predominantemente lesões cutâneas	Vales elevados interandinos e encosta oeste dos Andes
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> Floch, 1954	Predominantemente lesões cutâneas	Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sulamericano
<i>Leishmania (V.) panamensis</i> Lainson & Shaw, 1972	Predominantemente lesões cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i> Silveira et al, 1987	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Norte do Estado do Pará
<i>Leishmania (V.) shawi</i> Shaw et al, 1991	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Região amazônica
<i>Leishmania (V.) naiffi</i> Lainson et al., 1990	Lesões cutâneas, raramente acomete o homem	Região amazônica
<i>Leishmania(V.) colombiensis</i>	Lesões cutâneas, únicas ou múltiplas	
<i>Leishmania(V.) lindenberg</i> Silveira et al., 2002	Lesões cutâneas	Região do Estado do Pará
<b>Subgênero <i>Leishmania</i> (Saf'janova, 1982)</b>	<b>Acometimento clínico no homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Leishmania (L.) mexicana</i> Biagi, 1953	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	México e América Central
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	América Central e regiões Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil
<i>Leishmania (L.) venezuelensis</i> Bonfante-Garrido, 1980	Lesões cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania (L.) pifanoi</i> Medina & Romero, 1959	Lesões cutâneas (eventualmente, cutâneo-difusas)	Venezuela

Fonte: Marzochi, Schubach & Marzochi (1999).

### **1.3 Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil**

No Brasil, a LTA ocorre em todos os Estados e era conhecida por Cerqueira desde 1855 (Neves, 2005). Nos últimos anos o Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35.000 novos casos de LT. Provavelmente devido a sua baixa taxa de mortalidade a LT não tem recebido tanta atenção das autoridades públicas como a LV, que apresenta taxa de mortalidade bem mais elevada, apesar das duas estarem incluídas entre as cinco grandes endemias a serem estudadas com prioridade pela OMS.

Até o momento, sete espécies de *Leishmania*, pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, foram identificadas no Brasil como causadoras da LT humana.

O ressurgimento da LTA a partir dos anos 70, coincide com a suspensão do controle da malária pela utilização intradomiciliar de inseticidas organoclorados, a proibição do uso de inseticidas de ação residual nas lavouras e ao intenso movimento migratório de colonização, associado sobretudo ao ciclo de mineração do ouro na Região Amazônica (Marzochi & Marzochi, 1994).

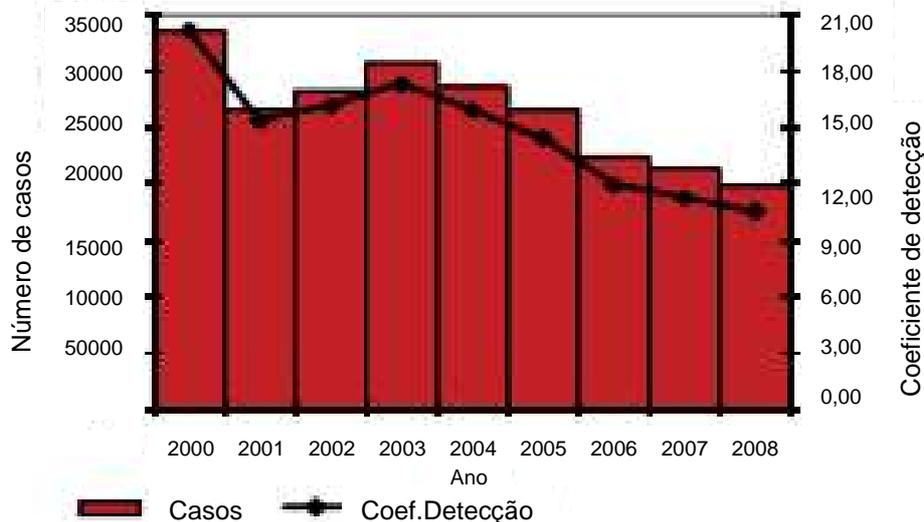
A LTA foi inicialmente associada a áreas de mata primária e zonas rurais, estando a maior diversidade de espécies destes parasitos na região amazônica (Marzochi, 1989). Acomete mais freqüentemente os trabalhadores que invadem as florestas tropicais ou moram próximo a elas. O ciclo biológico nesses ambientes mantém-se a partir dos vários hospedeiros vertebrados que podem atuar como reservatórios: roedores, edentados (tatu, tamanduá e preguiça) e marsupiais (gambá) (Lainson 1988). Além disso, a transmissão das leishmanioses esteve associada a algumas espécies de flebotomíneos que até então apresentavam comportamento silvestre (Marzochi 1989).

Assim, a LT apresenta diferentes padrões epidemiológicos, podendo caracterizar-se conforme a transmissão, como: silvestre, em áreas de colonização recente (zoonose de animais silvestres); periflorestal, em áreas de ocupação situadas dentro do raio de vôo de vetores silvestres (zoonose ou antroponose); rural, em áreas de colonização antiga (zoonose de matas residuais); e periurbana, em áreas de colonização antiga, onde houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose e/ou antroponose doméstica) (Marzochi & Marzochi, 1997).

Evidências epidemiológicas e parasitológicas sugerem a possibilidade da *L. braziliensis* continuar se introduzindo em novas áreas urbanizadas onde existam espécies vetoras de flebotomíneos em densidade adequada, dando origem a novos focos e propiciando assim a expansão clonal com maior homogeneidade genética dos parasitos (Marzochi & Marzochi, 1997).

No início dos anos 80 foram registrados casos de LT em 19 unidades federativas do Brasil e em 2003 todos os estados já registravam autoctonia. A partir da década de 90, o Ministério da Saúde notificou uma média anual de 32 mil novos casos de LTA. De 2000 a 2008 foram registrados 238.749 casos de LTA no país, com média anual de 26.528 casos novos. No entanto, observa-se uma redução de 41% dos casos em 2008, quando comparado a 2000. O coeficiente de detecção passou de 20,3 casos por 100 mil habitantes no primeiro ano, para 10,5 casos por 100 mil habitantes no último ano do período analisado (Figura 1) (Sinan/SVS/MS, Abril, 2010), no entanto, esta diminuição no número de casos pode representar uma flutuação que ocorre normalmente no ciclo da doença. Em 2009 foram registrados 21.824 casos de LTA no Brasil (SINAN/SVS/MS, outubro, 2010).

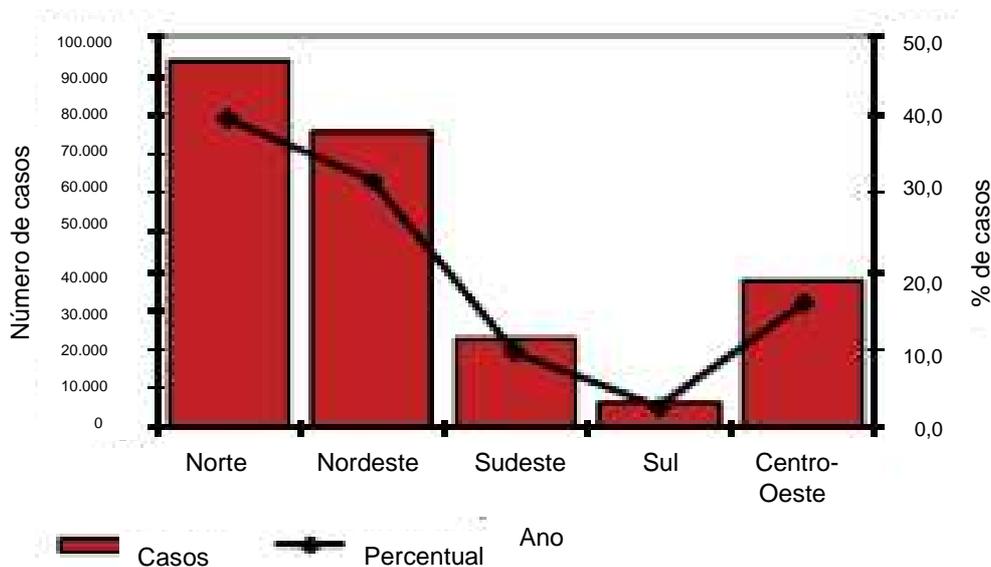
**Figura 1: Casos e coeficiente de detecção de LTA.**  
Brasil, 2000 a 2008.



Fonte: Sinan/SVS/MS. Ano 10, nº 2, abril, 2010

As regiões Norte e Nordeste vêm contribuindo, ao longo dos anos, com os maiores percentuais de casos do país, de modo que, do total confirmado no período de 2000 a 2008, 39,4% (94.169/238.749) ocorreram na região Norte; 31,7% (75.657/238.749), na região Nordeste; 15,9% (37.853/238.749), na região Centro-Oeste; 9,6% (22.903/238.749), no Sudeste; e 2,6% (6.161/238.749), na região Sul (Figura 2).

**Figura 2.** Casos de LTA e percentual, segundo região de residência. Brasil, 2000 a 2008.



Fonte: Sinan/SVS/MS. Ano 10, nº 2, abril, 2010

Em 2008 foram registrados 19.992 casos novos de LTA no país, cujas características estão descritas na Tabela 1.

\

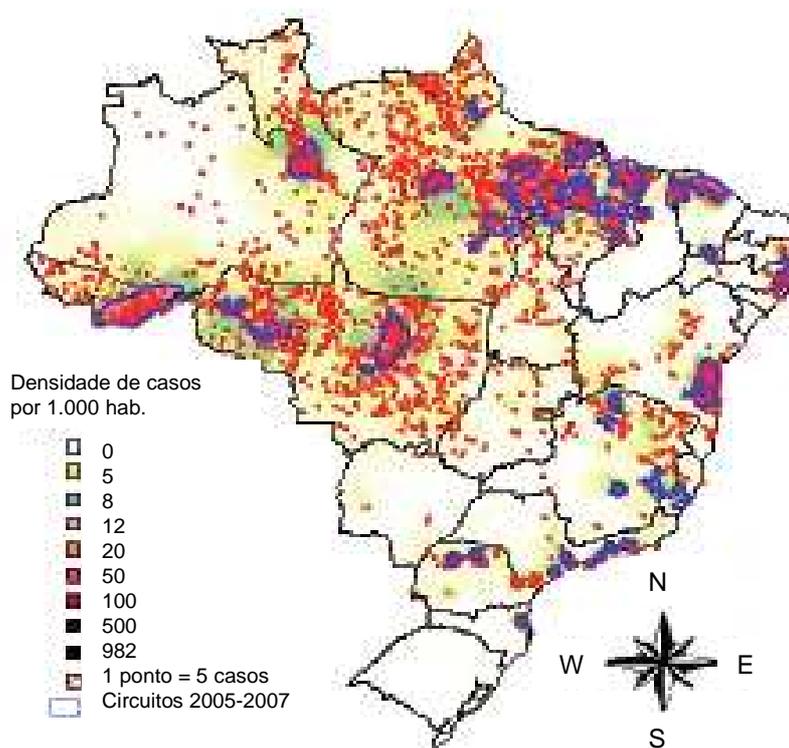
**Tabela 1.** Características demográficas e clínicas dos casos de LTA. Brasil, 2008.

Características	Nº	%
Sexo Masculino	14.658	73,3
Idade > 10 anos	18.175	90,9
Até 4º série completa	8.198	41,0
Forma cutânea	18.919	94,6
Cura clínica	14.949	74,8

Fonte Sinan/SVS/MS. Ano 10, nº 2, abril, 2010

Análises parciais, realizadas considerando-se o indicador de densidade de casos, no período de 2005 a 2007, mostram que existem 25 circuitos ativos de produção de LTA de importância epidemiológica no Brasil. Verifica-se que aproximadamente 47% dos casos registrados em 2008 estão inseridos nos circuitos de produção da doença, distribuídos em 463 municípios (Figura 3).

**Figura 3:** Densidade de casos e circuitos de produção de LTA por município. Brasil, 2005 a 2007, e casos em 2008.



Fonte: Sinan/SVS/MS. Ano 10, nº 2, abril, 2010

Na clínica, é fundamental o diagnóstico precoce da doença e a identificação do agente etiológico, pelo menos em áreas onde possam estar circulando espécies de potencial patogênico distinto. No Novo Mundo, enquanto existem cepas que induzem alterações cutâneas não complicadas, há outras que são capazes de induzir lesões evolutivas, disseminando-se por todo o corpo ou comprometer secundariamente a região nasofaríngea. Portanto, a identificação parasitária é importante para a abordagem terapêutica, envolvendo esquemas específicos e o acompanhamento do doente, uma vez que a sensibilidade às drogas pode também variar em função da espécie de *Leishmania*.

### 1.4 Biomas e Leishmaniose Tegumentar

O Bioma é conceituado como um conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelo agrupamento de tipos de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, com condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças, o que resulta em uma diversidade biológica própria.

São seis os biomas continentais do território brasileiro: **Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa.**

O bioma continental brasileiro de maior extensão, a Amazônia, e o de menor extensão, o Pantanal, ocupam juntos mais da metade do território brasileiro: o bioma Amazônia, com 49,29%, e o bioma Pantanal, com 1,76% (Tabela 2).

**Tabela 2.** Biomas do Brasil

Biomas Continentes Brasileiros	Área aproximada (KM2)	Área/Total Brasil
Bioma AMAZONIA	4.196.943	49,29%
Bioma CERRADO	2.036.943	23,92%
Bioma MATA ATLANTICA	1.110.182	13,04%
Bioma CAATINGA	844.453	9,92%
Bioma PAMPA	176.496	2,07%
Bioma PANTANAL	150.355	1,76%
Area total Brasil	8.514.877	-

Fonte: Sinan/SVS/MS. Ano 10. nº 2. abril. 2010

Os nomes adotados para identificar os biomas foram os mais usuais e populares, em geral associados ao tipo de vegetação predominante, ou ao relevo, como no caso do bioma Pantanal, que constitui a maior superfície inundável interiorana do mundo. O bioma Amazônia é definido pela unidade de clima, fisionomia florestal e localização geográfica. O bioma Mata Atlântica, que ocupa toda a faixa continental atlântica leste brasileira e se estende para o interior no Sudeste e Sul do País, é definido pela vegetação florestal predominante e relevo diversificado, é o bioma de maior diversidade de fauna e flora. O Pampa, restrito ao Rio Grande do Sul, se define por um conjunto de vegetação de campo em relevo de planície. A vegetação predominante dá nome ao Cerrado, segundo bioma do Brasil em extensão, que se estende desde o litoral maranhense até o Centro-Oeste e ao Bioma Caatinga, típico do clima semi-árido do sertão nordestino, único bioma exclusivamente brasileiro (IBGE, 2011).

As modificações estruturais dos biomas afetam os nichos ecológicos dos mamíferos hospedeiros de *Leishmania*. O aumento no número de casos de leishmanioses no Brasil tem sido atribuído a inúmeros fatores como a melhora na detecção de casos, ao processo de urbanização da doença e as interferências humanas no ambiente tais como desmatamento, construção de represas e

estradas. Os artigos e livros publicados nas décadas de 60 e 70 previam que a LT iria desaparecer das Américas uma vez que a infecção humana se dava no interior das matas e que estas seriam destruídas pelo “progresso”. Mas o que aconteceu foi que o desmatamento funcionou como um fator de pressão seletiva de flebotomíneos vetores fazendo com eles se adaptassem ao ambiente modificado dos centros urbanos.

O Brasil apresenta uma diversidade de patógenos em todos os biomas e alguns deles podem causar problemas maiores como a leishmaniose tegumentar.

A leishmaniose tegumentar apresenta ciclos de transmissão específicos variando conforme as interações com o ambiente onde se encontram (diferentes vetores, hospedeiros, reservatórios, vegetação, clima etc..).

Uma análise das características do bioma no qual a doença ocorre pode contribuir para compreender melhor sua distribuição e as especificidades encontradas. Um estudo dos diferentes tipos fitofisionômicos do bioma cerrado no estado de Goiás mostrou uma correlação entre a presença de flebotomíneos e algumas das características ecológicas observadas em determinadas áreas (Filho & Garcia-Zapata, 2006).

Segundo Ávila-Pires (2005) costuma-se reduzir a complexidade das cadeias de transmissão aos hospedeiros, reservatórios, vetores e parasitos, construindo modelos estáticos e pouco adequados que deixam de considerar outros fatores do ambiente tanto físico quanto biótico. No caso das zoonoses, os componentes bióticos são subavaliados e os fatores abióticos comumente analisados fora do contexto imediato. Assim, a área endêmica de uma zoonose é caracterizada por condições bióticas e abióticas particulares que permitem a existência e as interações entre os elementos de sua cadeia de transmissão.

A LTA tem causado um grande impacto econômico e social nas regiões onde é endêmica.

### 1.5 *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A LTA apresenta grande variedade de agentes etiológicos relacionados a diferentes espécies vetoras e reservatórios, com diferentes padrões epidemiológicos de transmissão. Portanto, seu controle é difícil e depende das condições específicas de cada foco. Devido a estas diferenças eco epidemiológicas é importante a caracterização e o estudo da evolução destes parasitos.

No Brasil, sete espécies de *Leishmania* têm sido reportadas como agentes etiológicos de LTA (Shaw, 2003 e Silveira et al., 2002), sendo seis do subgênero *Leishmania (Viannia)* e somente uma do subgênero *Leishmania (Leishmania)*. A *L.(L.) amazonensis* está presente no Norte, Nordeste, Sudeste e Centro Oeste do Brasil, causa lesões cutâneas localizadas e ocasionalmente a forma difusa da doença. As espécies do subgênero *Leishmania (Viannia)* são: *Leishmania (V.) braziliensis*, causa úlceras cutâneas e mucosas; *Leishmania (V.) guyanensis*, causa predominantemente lesões cutâneas ulcerativas e ocorre ao norte da região amazônica. As outras três espécies deste subgênero, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) shawi*, são mais restritas ao ciclo silvestre na região amazônica e raramente são encontradas infectando o homem. Recentemente, foi descrita para o subgênero *L. (Viannia)* a espécie *L. lindenbergi*, (Silveira et al., 2002), que foi isolada de soldados brasileiros que praticavam manobras próximas a florestas primárias degradadas ao norte do Estado do Pará.

A *Leishmania braziliensis* é a espécie mais prevalente no homem nas Américas e a LTA representa um importante problema de saúde pública em diversos países, especialmente no Brasil. Este parasito é capaz de produzir uma

variedade de manifestações clínicas, como a leishmaniose cutânea (pode ter cura espontânea), a leishmaniose mucosa (com úlcera invasiva) e a leishmaniose cutânea disseminada. Os hospedeiros vertebrados de *Leishmania braziliensis* e potenciais reservatórios no ciclo silvestre ainda não estão claramente identificados.

Algumas espécies de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos já foram encontradas naturalmente infectadas como *Rattus rattus* (Alencar et al., 1960; Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005), *Oryzomys capito* (Forattini et al., 1973), *Bolomys lasiurus* (Brandão-Filho et al., 2003, 2009), *Nectomys squamipes* (Brandão-Filho et al., 2003), *Oryzomys subflavus* (Oliveira et al., 2005), *D. albiventris* (Brandão-Filho et al., 2003; Schallig et al., 2007). No trabalho de Melo (2008), o número de animais positivos para *Leishmania* subgênero *Viannia*, em Belo Horizonte, foi bastante significativo (29%), sendo 89% destes, infectados por *L. braziliensis* e pela primeira vez foi detectada a infecção natural em *D. aurita* (marsupial), *Galictis sp.* (carnívoro), *Mus musculus* e *R. norvegicus* (roedores sinantrópicos).

Com relação aos animais domésticos o papel do cão como reservatório de *Leishmania braziliensis* ainda é uma questão polêmica. Reithinger & Davies (1999), em revisão de mais de 90 estudos de LTA em cães, concluiu que existem somente evidências circunstanciais para suportar a hipótese dos cães atuarem como reservatórios de *L. braziliensis* sendo necessários mais estudos. Os achados de Madeira et al. (2005) em Barra do Guaratiba e de Padilla et al. (2002) na Argentina, corroboram esta idéia, uma vez que os cães apresentam poucas lesões sendo estas com poucos parasitos. Gontijo et al. (2002) em área endêmica no Vale do Jequitinhonha, MG isolaram de cães e humanos amostras cuja caracterização bioquímica e molecular foi idêntica à cepa de referência de *Leishmania braziliensis*. O mesmo fato foi observado por Falqueto et al. (2003) no Espírito Santo. Este último autor sugere que os cães podem ter importância na manutenção do ciclo peridomiciliar, pelo menos na região estudada, uma vez que a ocorrência de casos é mais freqüente

na presença de cães infectados com *L. braziliensis* (Falqueto et al., 1991; 2003). Neste estudo houve uma correlação entre doença humana e alta prevalência e ampla distribuição da infecção em cães. Interessante foram os resultados da caracterização molecular onde os isolados de casos de LTA humano e de cães eram similares (representavam o mesmo genótipo), o que também foi observado no Paraná (Castro et al., 2007), sugerindo o cão como reservatório de *L. braziliensis*.

Outros animais domésticos já foram encontrados infectados por espécies de *Leishmania* dermatrópicas, tais como eqüinos (Rolão et al., 2005), suínos (Brazil et al., 1987) e gatos (Pennisi, 2004). Estes últimos, no Brasil, já foram encontrados infectados por *Leishmania braziliensis* (Passos et al., 1996) e *L. amazonensis* (Souza, 2005). Gramiccia & Gradoni (2005) ressaltam a importância de se avaliar melhor o papel de gatos e eqüinos na epidemiologia da LTA.

Várias espécies de flebotomíneos são incriminadas como possíveis vetores de *L. braziliensis*. A doença vem se espalhando devido à destruição das florestas e a invasão e adaptação de vetores ao peridomicílio. *Lu. intermedia*, *Lu. witmani* e *Lu. migonei* estão bem distribuídas em todas as regiões do Brasil e *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani* e *Lu. wellcomei* apresentam um alto grau de antropofilia.

A infecção por *L. braziliensis* apresenta um período de incubação que pode variar de duas semanas a vários meses e as lesões cutâneas constituem úlceras rasas, circulares, com bordas elevadas e bem definidas e com assoalho da úlcera de aspecto granular. Nas infecções pela *L. (V). braziliensis*, a linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento de ulcerações por uma a doze semanas. O diagnóstico definitivo depende do encontro e identificação de amastigotas em tecido ou promastigotas em meio de cultura (Gontijo e Carvalho, 2003).

### 1.6 Estudo da diversidade genética de *Leishmania*

Com o advento da biologia molecular e a utilização de suas técnicas nos estudos de epidemiologia genética e filogenia, muitos conhecimentos estão sendo gerados, contribuindo para o estabelecimento das relações inter e intra-específicas de diversos organismos incluindo os parasitos. Estudos da estrutura da população são indispensáveis para avaliar a relevância epidemiológica e médica dos isolados.

As leishmanias apresentam poucas diferenças morfológicas, mas estas têm sido utilizadas em diferentes classificações, aliadas a critérios extrínsecos do parasita como manifestações clínicas, distribuição geográfica e uma variedade de critérios biológicos. Apesar destas características serem bastante variáveis, elas são fatores importantes que devem ser considerados na diferenciação biológica dos parasitos.

Métodos bioquímicos e moleculares têm demonstrado que os dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania* são bastante distintos (Thomaz-Soccol et al., 1993; Fernandes et al., 1994; Cupolillo et al., 1994), talvez apresentando um tempo de divergência bastante longo, o que reforça a classificação proposta por Lainson & Shaw em 1987.

Diversos estudos sobre a evolução e a variabilidade genética em *Leishmania* vêm sendo realizados e diferentes metodologias têm sido empregadas na caracterização destes parasitos. Resultados obtidos pela análise de isoenzimas apontam o subgênero *Leishmania* (*Viannia*) como um grupo monofilético e o subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) parece ser polifilético (Cupolillo, 1994).

O perfil complexo de bandas obtido na análise eletroforética de proteínas, dificulta a interpretação dos resultados. Para solucionar este problema passou-se

a utilizar proteínas com ação enzimática, uma vez que as enzimas podem ser facilmente identificadas pela especificidade dos seus substratos. A eletroforese de enzimas permite que muitas amostras sejam comparadas, uma vez que cada banda enzimática é um caráter separado (Romanha, 1982).

Existem enzimas que se apresentam sob múltiplas formas moleculares e são conhecidas como isoenzimas (Market & Moller, 1959). As isoenzimas podem ocorrer devido a diversos fatores tais como: presença de mais de um loco que codifica a enzima; presença de mais de um alelo para o loco codificador da enzima; modificações ou alterações pós-translacionais na cadeia polipeptídica formada e enzimas poliméricas cujos componentes são de alelos ou locos diferentes (Cupollilo, 1992).

A utilização da eletroforese de enzimas permite determinar as similaridades e diferenças entre os organismos possibilitando o conhecimento das relações genéticas empregadas na identificação e classificação taxonômica de diversos parasitos.

As variabilidades podem ser diretamente atribuídas às diferenças genéticas e os perfís eletroforéticos encontrados considerados como expressão fenotípica do organismo. A similaridade entre organismos será tanto maior quanto maior forem os caracteres idênticos entre eles. Cada banda isoenzimática no perfil

eletroforético (denominada eletromorfo) é considerada um marcador molecular, que representa os alelos de um determinado loco, proporcionando o uso de vários caracteres na identificação parasitária. Nesta análise as cepas são divididas em grupos com padrões enzimáticos idênticos ou homogêneos e são chamados zimodemas. Os zimodemas podem representar diferenças enzimáticas simples ou conjunto de diferenças ocorrendo entre grupos populacionais de organismos (Momen, 1984).

A técnica é considerada bastante sensível e cada variante enzimática é considerada como um genótipo e os eletromorfos como alelos. Logo, dois organismos não podem ser considerados idênticos por possuírem a mesma migração para uma ou duas enzimas. Esse tipo de interpretação errônea é evitada aumentando-se o número de enzimas estudadas e, portanto, o número de caracteres observados (Romanha, 1982).

Em *Leishmania*, variações isoenzimáticas podem ser vistas entre as formas evolutivas ou em uma única cepa do parasita mantida sob diferentes condições de cultivo (Grimaldi et al., 1982).

Vários autores utilizaram a técnica de isoenzimas em estudos taxonômicos de *Leishmania* e observaram que há um considerável grau de diversidade enzimática entre as espécies distintas e uma variabilidade significativamente menor, ou mesmo não detectável, entre membros de um mesmo complexo (Miles et al., 1981; Momen et al., 1987; Grimaldi et al., 1991). Os resultados demonstram que certas enzimas servem para o diagnóstico de determinadas espécies ou grupos de organismos, enquanto outras não são capazes de permitir a diferenciação de organismos distintos.

Portanto, é importante se conhecer o potencial de cada enzima em discriminar complexos, espécies e até mesmo cepas.

O loco 6PGDH é bastante polimórfico em *Leishmania* apresentando alelos capazes de separar os parasitos entre grupos ou espécies. A evolução deste loco pode ter seguido uma divergência evolutiva do gênero, resultando na separação dos diferentes grupos, que podem ser distinguidos utilizando este loco enzimático (Cupolillo et al., 1995).

Atualmente, este método é amplamente utilizado na identificação e classificação do gênero *Leishmania*. A caracterização de amostras de *Leishmania* através da eletroforese de isoenzimas associada à taxonomia numérica contribui para o conhecimento dos focos de infecção, da biogeografia dos parasitos e da ecoepidemiologia das leishmanioses.

Informações taxonômicas importantes podem ser obtidas por análise numérica das bandas produzidas pela eletroforese de enzimas, que podem variar de acordo com diferentes alelos ou frequências genotípicas de um loco que está presente em cepas distintas do parasita (Avisé, 1975).

A análise de isoenzimas (Multilocus Enzyme Electrophoresis - MLEE) (Lanotte et al., 1981; Momem & Salles, 1985; Cupolillo et al., 1994) é considerada o procedimento padrão ouro para caracterização e identificação de cepas de *Leishmania* inclusive todas as espécies circulantes no Brasil. A ampla distribuição de um único zimodema pode indicar a estrutura populacional clonal, como proposto para *Leishmania* (Tibayrenc, 1990). Entretanto esta metodologia tem a desvantagem de requerer o isolamento e o cultivo do parasito, isto impede a caracterização de algumas amostras.

O desenvolvimento de ferramentas moleculares tem contribuído para a realização de estudos taxonômicos e epidemiológicos destes parasitos de forma segura.

O método de DNA “fingerprint”, que utiliza sondas marcadas para identificação das espécies, foi realizado para a identificação de cepas isoladas de pacientes do Mato Grosso, e 94% dos parasitos foram classificados como pertencentes ao complexo *L. braziliensis*, somente quatro pacientes (5,6%) estavam infectados com espécies do complexo *L. mexicana* (Carvalho et al., 2006). A confirmação da identificação de todas as amostras foi realizada através da análise de isoenzimas.

Entre as ferramentas moleculares mais empregadas está a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) que é utilizada na identificação de gênero e espécie (Yang e Rothman, 2004) bem como em estudos sobre diversidade genética e evolução de *Leishmania*.

Passos et al, 1999, utilizando a PCR observaram que, em Minas Gerais, 98% dos casos humanos estudados estavam infectados com espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) provavelmente a *L. braziliensis*.

Desde o primeiro uso da PCR para detecção de *Leishmania* (Rodgers et al., 1990) vários métodos baseados na PCR vem sido desenvolvidos.

Iniciadores específicos para o complexo *L. braziliensis* como B1/B2 (Bruijn and Barker, 1992), e específicos para o complexo *L. mexicana* M1/M2 (Eresh et al., 1994) foram empregados na identificação de amostras isoladas em Minas Gerais e de 60 amostras analisadas 97% foram incluídas no complexo *L. braziliensis* (Gontijo, 2000).

O estudo do polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente - RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utiliza iniciadores curtos, que se ligam arbitrariamente ao DNA molde em condições de baixa estringência sendo que o conhecimento prévio da seqüência alvo não é necessário. A técnica de RAPD foi descrita simultaneamente por Williams et al.(1990) e por Welsh e McClelland (1990) e é bastante utilizada para caracterizar e avaliar a heterogeneidade genética em amostras de diferentes organismos (Steindel et al. 1993 , Dávila et al.' 2006).

A técnica tem sido muito utilizada para estudos de população, de variabilidade genética inter e intra específica em parasitos do gênero *Leishmania* (Gomes et al., 1995; Noyes et al., 1996; Gontijo et al., 2000; Martinez et al., 2003). Utilizando-se o RAPD com o iniciador OPC-20 várias espécies de *Leishmania* puderam ser diferenciadas com alto nível de especificidade, reprodutibilidade e simplicidade de reconhecimento de cada padrão característico das espécies (Martinez et al., 2003).

A técnica SSR-PCR vem sendo utilizada por alguns autores para estudo da variabilidade inter ou intraespecífica de *Leishmania* (Oliveira et al., 1997 ; Gontijo, 2000; Volpini et al., 2001; Ferreira et al., 2004; Oliveira et al., 2007).

O método de PCR com repetições de seqüências simples, ou Simple Sequence Repeats (SSR-PCR), utiliza como iniciadores regiões de repetições de seqüência simples (microsatélites) que podem amplificar os segmentos inter repetições (Zietkiewicz et al., 1994) ou amplificar tanto a região inter repetição quanto as repetições (Wu et al., 1994).

Oliveira et al. (1997), testaram a aplicabilidade do SSR-PCR em estudos com diferentes espécies de parasitos. Eles observaram padrões altamente polimórficos e discriminativos para cepas de *Trypanosoma cruzi*, *L. braziliensis* e *Schistosoma mansoni*. A informatividade dos padrões obtidos foi comparável à do

RAPD, sendo que o SSR-PCR, por utilizar alta estringência, apresentou algumas vantagens em relação ao RAPD, como aumento da reprodutibilidade dos perfis. O SSR apresentou vantagens também sobre a impressão digital de DNA, por requerer uma quantidade de DNA dez vezes menor para sua execução.

A SSR-PCR oferece uma alternativa metodológica para o estudo de variabilidade genética intra-específica de *Leishmania*.

O genoma de eucariotas contem várias cópias de rDNA, em diversos cromossomos, sendo estes genes constituídos de várias subunidades. Em *Leishmania* as regiões SSU e LSU são conservadas, mas as regiões ITS (Internal Transcribed Spacers) ou espaçadores transcritos internos do DNA têm alto nível de variação intra e interespecífica, sendo útil no estudo de genética populacional, através da técnica IRT (Tipagem da região intergênica). A maioria das espécies de *Leishmania* de importância médica foram distinguidas pelo ITS1 com a enzima RsaI, com 85,7% de sensibilidade em biópsias (Rotureau et al., 2006). Outros autores também obtiveram esse diagnóstico utilizando outras enzimas como HaeIII e etc..(Schonian et al.,2003, 2004; Cuervo,et.al., 2004).

A resposta ao choque térmico é um mecanismo genético muito conservado ao longo da evolução, descrito em todos os organismos, desde arqueobactérias até eucariotas superiores. A atividade das proteínas de choque térmico, as HSPs (heat shock proteins), é desencadeada quando os organismos estão expostos a temperaturas superiores as normais para seu crescimento. Estas proteínas (HSPs) protegem as células dos efeitos do calor e de outras formas de stress (HARTL,F. U, 1996). As HSPs incluem tanto proteínas de expressão constitutiva quanto de expressão induzida, elas se agrupam em famílias que podem diferir em sua localização, função e indução em resposta ao choque térmico. Durante a transmissão de *Leishmania*, o aumento de temperatura e a diminuição do pH são os principais agentes desencadeantes do processo de diferenciação promastigota-amastigota.

Neste processo o parasito deve ser capaz de adquirir mecanismos de termotolerância, como a resposta ao choque térmico, e a HSP70 é uma das proteínas envolvidas. Recentemente, o locus *hsp70* vem sendo estudado em *L. braziliensis* (Zurita e col. 2003) e postula-se a existência de um único gene *hsp70* no genoma deste parasito.

Vários trabalhos têm utilizado o gene *hsp70* em estudos de identificação e variabilidade de *Leishmania*. Resultados promissores foram obtidos utilizando o *hsp70*, entretanto o método não foi capaz de discriminar todas as espécies do subgênero *Viannia* (Garcia et al., 2004, 2005, 2007). Silva et al., 2010, utilizando como alvo o *hsp70* para identificação de espécies com base no polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), evidenciaram a capacidade da técnica em distinguir espécies e mostrar níveis de polimorfismo. Entretanto, em muitos casos mais de uma enzima de restrição foi necessária para a identificação das espécies.

A utilização da amplificação de fragmento do *hsp70* seguido de corte com a enzima de restrição HAEIII foi capaz de distinguir várias espécies de *Leishmania* (Garcia et al., 2004). Neste estudo, a visualização dos perfis de restrição foi realizada através de eletroforese micro capilar, o que aumenta a performance dos ensaios de PCR/RFLP. Genes *hsp70* representam um alvo adequado para tipagem de espécies de *Leishmania* neotropicais em tecidos dos hospedeiros

A análise do perfil gerado por enzimas de restrição - RFLP baseia-se na amplificação pela PCR de um fragmento específico de qualquer região do genoma e na digestão deste fragmento com diversas enzimas de restrição que clivam o DNA em sítios específicos conhecidos como sítios de restrição, gerando perfis que podem ser visualizados em géis. Volpini et al. (2004), utilizando a PCR-RFLP da região conservada do minicírculo do kDNA de *Leishmania*, conseguiram diferenciar as cepas de *L. (V.) braziliensis* de *L. (L.) amazonensis*.

Microssatélites correspondem a repetições de seqüência curtas com poucos nucleotídeos (1-6 pb) e estão distribuídos em todo genoma de eucariotas. O

genoma de *Leishmania* é relativamente rico destas regiões. Inicialmente foram identificados 3 microssatélites para este parasito, (CA)<sub>n</sub> (GGT)<sub>n</sub> e (GCA)<sub>n</sub> (Rossi et al., 1994). Estas regiões têm altos níveis de polimorfismo (Tautz, 1989) em relação ao número de unidades repetitivas e são bastante utilizadas como marcadores genéticos no estudo de populações.

Ultimamente diversos autores vêm buscando iniciadores para um maior número de loci polimórficos de microssatélites para o estudo de polimorfismo intra e inter espécies. Em 2004, essa metodologia ficou conhecida como tipagem de microssatélites em múltiplos loci ou “Multilocus microsatellites typing”(MLMT). Regiões de microssatélites polimórficos para *L. braziliensis* estão sendo investigadas e novos iniciadores para identificá-las vêm sendo desenvolvidos, doze marcadores de microssatélites foram estudados e representam boas ferramentas para o estudo de genética de populações para *L. braziliensis* (Rougeron et al., 2008). Esta metodologia poderá ser utilizada como importante fonte de informação sobre a biologia e a epidemiologia destes protozoários causadores da LTA.

### 1.7 Estudo da diversidade genética de *Leishmania braziliensis*

Existem poucos estudos enfocando a variabilidade genética em amostras de *Leishmania braziliensis*. Nenhum deles utilizou um painel significativo de isolados provenientes de focos de LTA localizados em diferentes regiões e biomas do Brasil. A maioria dos estudos foi realizada utilizando isoenzimas como método para a análise.

Estudos taxonômicos de isolados de *Leishmania* sp. indicam grande diversidade e heterogeneidade populacional entre os parasitos e o subgênero *Viannia* parece ser monofilético (Cupollilo et al., 1994). Grande diversidade também foi encontrada para o subgênero *Viannia* (Cupollilo et al., 1997).

Utilizando a técnica IRT seguida da digestão dos produtos do PCR com enzimas de restrição, foram observados diferentes padrões no subgênero *Leishmania* (*Viannia*) (Cupolillo et al.,1995), que levam a concluir que com este método é possível identificar considerável diversidade molecular. Em outro trabalho a técnica de isoenzimas e a tipagem de região intergênica(IRT-ITS/RFLP), demonstrou que o grupo de *L. braziliensis* e *L. naiffi* apresentou uma alta heterogeneidade populacional, com 15 e 11 zimodemas(MLLE) (Cupollilo et al., 1998), respectivamente.

Gomes et al., 1995, utilizando impressão digital do DNA e RAPD, com cepas de *L. braziliensis* isoladas em duas diferentes áreas geográficas do Brasil, mostraram que as cepas do estado de Minas Gerais eram diferentes das cepas do Pará, as cepas de Minas Gerais constituem um grupo relativamente homogêneo apresentando padrão de DNA fingerprinting com 76% das bandas compartilhadas e 93% das bandas de RAPD compartilhadas. Ao contrário, cepas do Pará mostram alta variabilidade genética, com somente 17 e 45% das bandas compartilhadas em DNA fingerprinting e RAPD, respectivamente. Este estudo sugere que as diferenças genéticas entre as cepas de *L. braziliensis* de ambas as áreas possam ter um significado eco epidemiológico, e possam ser explicadas pelas diferentes ecoepidemiologias dos parasitos, o isolamento ambiental e geográfico são fatores envolvidos na variabilidade.

Através de um estudo em Minas Gerais constatou-se a predominância de amostras geneticamente muito similares, independentemente da origem geográfica e do tipo de ciclo de transmissão, se florestal, rural, periurbano ou urbano, (Gontijo, 2000).

Ishikawa et al. 2002, utilizando RAPD com o primer M1340, observaram a diferenciação entre cepas do subgênero *Leishmania* e *Viannia*, e que as cepas de *L. braziliensis* foram agrupadas de acordo com sua origem geográfica, um grupo incluía as cepas de Paragominas (Estado do Pará) e cepas do Paraná e em outro grupo estavam as cepas da Serra dos Carajás (Estado do Pará) e Peru. Um alto grau de polimorfismo foi observado nas cepas de Paragominas. Os resultados

suportam a estrutura populacional clonal de isolados de *Leishmania* e sugere que sua distribuição está relacionada a origem do gene bem como a presença dos vetores e movimentação dos reservatórios.

Cupollilo et al. 2003 observaram polimorfismos (MLEE e ITS/RFLP) em *L. braziliensis* de diferentes regiões e hospedeiros, principalmente na Amazônia. As cepas de diferentes hospedeiros e regiões ecológicas no Brasil indicam uma estrutura de população clonal, com alguns zimodemas amplamente distribuídos (IOC/Z27) e outros aparentemente únicos e localizados em um foco endêmico particular. Este estudo revelou 15 zimodemas para *L. braziliensis*, que podem ser separados em dois grupos maiores, um grupo com as amostras da costa Atlântica (Espírito Santo, Rio de Janeiro e Pernambuco) e o outro com amostras da região Amazônica. A técnica de ITS/RFLP discriminou os isolados das diferentes regiões e agrupou os parasitos estritamente relacionados. A diversidade encontrada em parasitos da Amazônia é aparentemente relacionado ao grande número de vetores e reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão. As populações de *L.(V.) braziliensis* circulando na costa Atlântica brasileira (81,2% dos isolados do estudo) mostraram menor heterogeneidade do que as cepas da Amazônia, elas apresentam espécies vetoras no peridomicílio e tem *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* como os principais suspeitos de serem os vetores. Um total de 49% dos parasitos coletados em áreas do Rio de Janeiro e Espírito Santo, onde os animais silvestres provavelmente não estão envolvidos no ciclo de transmissão, agruparam-se em um mesmo zimodema (IOC/Z-27, amplamente distribuído) que é o mesmo da cepa de referência M2903, que foi isolada de paciente no Estado do Pará e neste caso o flebotomíneo silvestre, *Psychodopygus wellcomei*, tem sido determinado como vetor. Ao contrário, em Pernambuco, *Necromis lasiurus* e *Rattus rattus*, tem sido incriminados como reservatórios do parasito (Abstr. Wordleish 2000, abstr. 100, 2000). Algumas cepas de *L. braziliensis* que apresentaram o mesmo perfil de isoenzimas mostraram variabilidade para o perfil

de ITS com as enzimas HhaI e BstUI. Os resultados reforçam a teoria clonal para parasitos de *Leishmania* mostrando a diversidade genética destes parasitos e uma associação dos genótipos de *L.(V.) braziliensis* com ciclos de transmissão específicos, provavelmente refletindo uma adaptação de diferentes clones para a espécie vetora envolvida o que está de acordo com o trabalho de Ishikawa et al. 2002.

Cepas de *L. braziliensis* de Minas Gerais se mostraram mais homogêneas (com menor grau de variabilidade) que as cepas de *L. braziliensis* do Mato Grosso utilizando-se a técnica de RAPD (Carvalho et al., 2006). Através da construção de um fenograma baseado em valores de distância genética foram formados dois clusters maiores separando cepas de *L. braziliensis* de Mato Grosso das de Minas Gerais.

Através da MLEE foram identificados 10 zimodemas circulando na região nordeste do Brasil (Paudalho, Moreno e Amaraji em Pernambuco), sendo a maioria relacionados ao zimodema IOC/Z27 de *L. braziliensis* (M2903); mas cinco isolados foram classificados como *L. shawi* (Brito et al., 2009). Três zimodemas encontrados, só tem sido observados na região estudada e todos os zimodemas foram agrupados em dois clusters, entretanto a distância entre eles é muito pequena. O zimodema IOC/Z27 é o mais frequente para *L. braziliensis* circulando na maioria das regiões onde LTA é endêmica, estes resultados sugerem que este zimodema está associado com o ciclo de transmissão doméstica e provavelmente não é capaz de infectar e/ou ser mantido em um ambiente silvestre. A presença de variantes intra-específicos pode ser resultado de seleção por diferentes reservatórios, incluindo roedores silvestres e sinantrópicos envolvidos em ciclos de transmissão peridomésticos (zoonóticos) e silvestres (enzooticos) que ocorrem simultaneamente na mesma região (Brandão-Filho et al., 2003). *Lutzomyia whitmani* e *Lu complexa* tem sido sugeridas como vetores de *L. braziliensis* e

podem participar do ciclo de transmissão nesta região (Brandão-Filho, 2001). *Lutzomyia whitmani* tem sido encontrada com parasitos que apresentam o zimodema IOC/Z74, indicando que este vetor pode ser a espécie de ligação entre ambos os ciclos de transmissão. Esta espécie é mais abundante no peridomicílio mas também é encontrada em florestas primárias restantes (Brandão-Filho et al., 2003).

Amostras de *Leishmania* isoladas de homens e cães infectados por LTA, no Espírito Santo, foram identificadas por dois métodos de caracterização molecular, usando anticorpos monoclonais e MLEE (Falqueto et al., 2003). Todas as amostras apresentaram o mesmo zimodema e sorodema da cepa de referência *L. (V.) braziliensis*. Ao contrário, os estudos de genotipagem mostraram variação intra-específica nestes parasitos. (pela técnica de ITS/RFLP). Dois clusters maiores foram observados, onde eram considerados como sendo envolvidos em dois ciclos de transmissão, um grupo de parasitos isolado de áreas urbanas era menos diverso, comparado com o grupo isolado de áreas rurais. Isto reflete a transmissão em regiões que apresentam diferentes fatores eco epidemiológicos. Foram observados 11 genótipos para *L. braziliensis* (em 22 estudados) através de ITS/RFLP, a maioria era específica para a mesma localidade geográfica, mas um genótipo (A16) estava distribuído em três municípios (Afonso Cláudio, Conceição do Castelo e Muniz Freire) que são localizações geográficas contínuas. A infecção com este patógeno está associada com características das formas da doença, clínica e a resposta ao tratamento pode estar relacionada ao polimorfismo genético dos isolados.

Em estudos realizados no Paraná, todas as cepas isoladas foram identificadas como *L. braziliensis* e apresentaram três zimodemas, para RAPD as cepas mostraram padrão homogêneo (Castro et al., 2005). Também no Paraná,

um estudo revelou a presença de *L. braziliensis* em cães, através de métodos moleculares, incluindo RAPD (Castro et al., 2007) e uma diversidade genética foi observada nos isolados destes cães.

A taxa de troca genética tem um impacto na estrutura de populações e estabilidade genotípica das espécies. A evolução clonal de *Leishmania* é sugerida em vários trabalhos e reflete a situação encontrada, onde a reprodução sexual é muito rara ou ausente, os genótipos podem ser extremamente estáveis, a ligação em desequilíbrio é forte (Bañuls et al., 1999, 2000). Bañuls et al. (2002), observaram a correlação estatística entre isoenzimas e RAPD(primer A10). Observaram também variabilidade de *L. braziliensis* no RAPD. O significado adaptativo dos polimorfismos de cromossomos variáveis foi sugerido pela correlação entre polimorfismo cromossomal e variabilidade fenotípica (tipo de lesão e virulência *in vitro*), por exemplo todos parasitos de *L. braziliensis* com um cromossomo pLb-134Sp de 700kb causa espondia e parasitos com este cromossomo mas apresentando 610-kb(*L.peruviana*) não. Outro significado adaptativo dos polimorfismos foi dado pela associação entre diminuição de tamanho do cromossomo contendo gp-63 de *L. braziliensis* e *L. peruviana*, a variação cromossômica mostrou ser mais dependente das diferenças eco-geográficas que de variações isoenzimáticas, variações cromossômicas e variação enzimáticas provavelmente diferem em significância adaptativa (Dujardin et al., 1995).

Em Corte de Pedra, nordeste do Brasil, *L. braziliensis* causa três formas distintas de LTA, isolados de pacientes que apresentavam diferentes formas clínicas foram submetidos ao teste de RAPD para testar a hipótese que polimorfismos das cepas podem estar envolvidos na distinção destas formas da doença. Foram obtidos oito padrões para os isolados, através do RAPD, e o dendograma (UPGMA) apresentou cinco clados que foram relacionados

estatisticamente com as formas da doença. Dois clados estavam relacionados a LC, dois a L disseminada e um a LM, o que sugere que genótipos de *L.braziliensis* podem ser acompanhados por manifestações específicas da doença após infecção (Schriefer et al., 2004).

Cepas do Rio de Janeiro apresentaram perfil similar a cepa *L.braziliensis* padrão para MLEE, foram observados nove genótipos para RAPD e LSSR, sendo que 2 clusters foram formados em LSSR. O cluster 1 apresentou o genótipo LbmtDNAGen1 para a maioria das amostras(64,7%), a detecção de um genótipo prevalente em isolados obtidos tanto de pacientes que apresentam condições clínicas típicas quanto atípicas, suporta a idéia de uma menor diversidade genotípica entre *L. braziliensis* circulando no Estado do Rio de Janeiro(Baptista et al., 2009).

A utilização de *hsp70* /RFLP, revelou sua capacidade em distinguir as espécies e também demonstrou níveis de polimorfismo para *L.braziliensis* através da enzima BstUI (Silva et al., 2010).

A LTA é uma endemia de grande complexidade, pois envolve diferentes espécies de vetores, reservatórios e agentes etiológicos que, em conjunto com a ação do homem sobre o meio ambiente, dificultam as ações de controle. As ações recomendadas são específicas para cada área, segundo a situação epidemiológica e estão centradas no diagnóstico precoce, no tratamento adequado dos casos humanos – além da identificação do agente etiológico circulante e do vetor predominante – e na redução do contato homem-vetor, através da adoção de medidas de proteção individuais e coletivas específicas (SVS/MS,2010).

Os vários métodos existentes tem contribuído cada vez mais para o diagnóstico, estudo da dispersão, evolução e epidemiologia das Leishmanioses.

## *2. Justificativa*

## **2. Justificativa**

A *Leishmania braziliensis* é a espécie mais prevalente nos casos de LTA no homem nas Américas. Tem uma ampla distribuição geográfica ocorrendo em diferentes biomas e apresenta um importante problema de saúde pública, especialmente no Brasil. Este parasito é capaz de produzir uma variedade de manifestações clínicas, como a leishmaniose cutânea (com cura espontânea), a leishmaniose mucosa (com úlcera invasiva) e a leishmaniose cutânea disseminada. Os hospedeiros vertebrados de *Leishmania braziliensis* e potenciais reservatórios no ciclo silvestre ainda não estão claramente identificados, mas já foram encontradas várias espécies infectadas. Várias espécies de flebotomíneos são incriminadas como possíveis vetores de *L. braziliensis*. A doença vem se espalhando devido a destruição das florestas e a invasão e adaptação de vetores ao peridomicílio.

Estudos têm revelado polimorfismo genético em populações naturais de diferentes espécies de *Leishmania* (Cupolillo et al., 1998) o que explicaria a adaptação destes parasitos às mudanças observadas nas condições ambientais (Cupolillo et al. 2003).

É importante identificar a variabilidade genética de *Leishmania* na natureza e correlacionar esta variabilidade com a localização geográfica, biomas, formas clínicas e características biológicas do parasito como virulência, patogenicidade, resistência a drogas e variação antigênica, pois esta variabilidade genética pode ter como consequência a produção de diferentes fenótipos, que podem estar associados com a diversidade das manifestações clínicas. Os estudos epidemiológicos são importantes não só para o controle das leishmanioses, mas também para auxiliar na elucidação da biologia evolucionária destes parasitos.

Apesar de já existirem alguns estudos genéticos utilizando amostras de *Leishmania braziliensis* nenhum deles utilizou um painel significativo de isolados de diferentes focos de LTA do Brasil e comparando várias técnicas. Portanto, nosso projeto é o primeiro a empregar um número considerável de amostras de

*Leishmania braziliensis* provenientes de diferentes regiões do Brasil com o objetivo de estudar o grau de variabilidade genética existente entre elas.

Assim, nossa intenção com este projeto é contribuir para o conhecimento da *Leishmania braziliensis* através de estudos moleculares e inserir os nossos achados no quadro eco epidemiológico da LTA no Brasil.

### *3. Objetivos*

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a variabilidade genética intra-específica de amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas em diferentes regiões do Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Analisar polimorfismos do DNA genômico utilizando diferentes marcadores genéticos
2. Determinar as relações fenéticas entre as amostras.
3. Associar os resultados obtidos da variabilidade genética com a ecoepidemiologia da Leishmaniose Tegumentar no Brasil.

## *4. Material e métodos*

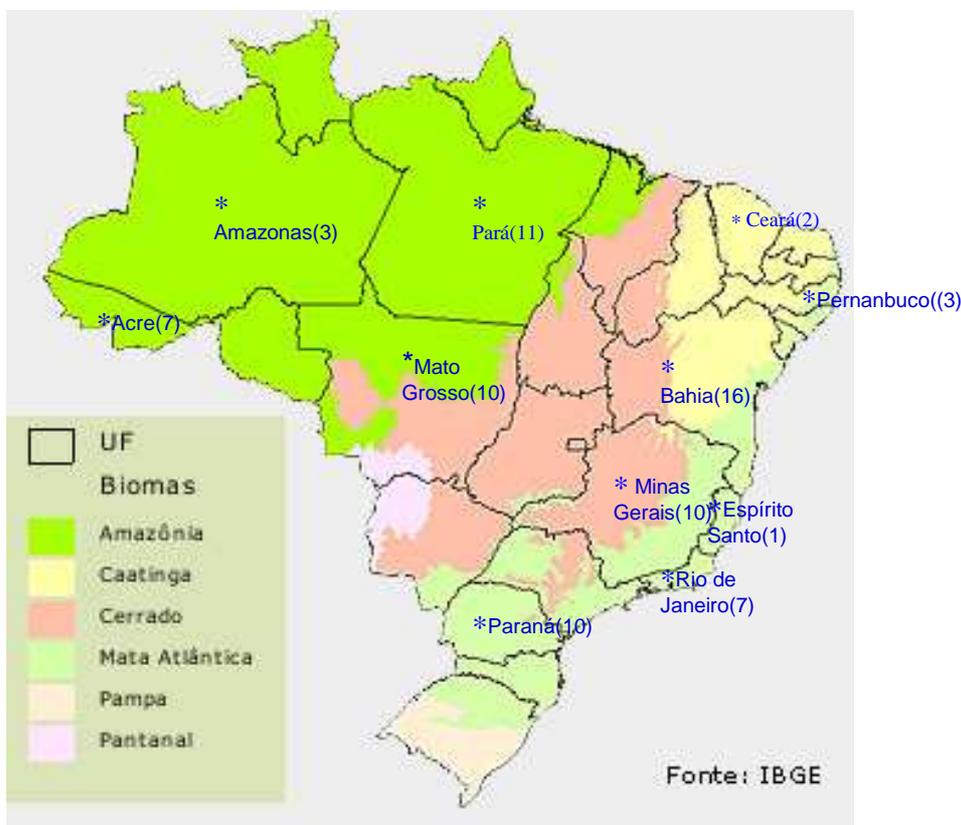
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Parasitos

As amostras de *Leishmania braziliensis* utilizadas no presente estudo foram isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar, com a forma cutânea, provenientes de 11 Estados (Amazonas, Pará, Acre, Ceará, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná) localizados em diversas regiões do Brasil (Figura 4) e pertencentes a diferentes biomas (Figura 5). As amostras encontravam-se criopreservadas e depositadas no Banco de Cepas do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade de Brasília (UnB).



**Figura 4:** Localização dos estados e regiões geográficas de origem das amostras de *Leishmania braziliensis* utilizadas no estudo



**Figura 5:** Localização das amostras utilizadas no estudo em relação aos biomas brasileiros.

As oitenta amostras de *L. braziliensis* foram codificadas pela equipe do NMT da UnB e enviadas para o Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou / Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG. A codificação das amostras somente foi revelada após a realização de todas as técnicas moleculares e da construção dos fenogramas. As amostras foram descongeladas e mantidas em meio NNN(Novy–MacNeal–Nicolle)/LIT (Liver infusion Tryptose) (Camargo, 1964) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 20% e antibióticos (penicilina e estreptomicina 100-200µg/ml), a 25°C ± 1°C. Os tubos foram mantidos, em repouso, em estufa incubadora B.O.D.(modelo 347),

durante um período de aproximadamente sete dias, quando as culturas eram examinadas e repicadas para tubos contendo meio novo. Os parasitos foram expandidos para serem criopreservados e preparados para serem utilizados nas diferentes técnicas moleculares. As amostras encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou.

As amostras de *L. braziliensis* são provenientes de diferentes biomas e regiões geográficas do Brasil. O quadro 2 e as figuras 4 e 5 mostram a distribuição das amostras por região geográfica e bioma.

**Quadro 2:** Distribuição das amostras de *L. braziliensis* estudadas segundo região geográfica e bioma

Estado	Região geográfica	Bioma	Nº de amostras estudadas
Amazonas	Norte	Amazônia	3
Pará	Norte	Amazônia	11
Acre	Norte	Amazônia	7
Ceará	Nordeste	Caatinga	2
Mato Grosso/MG	Centro Oeste/sudeste	Cerrado	10/1
Minas Gerais	Sudeste	Cerrado/Mata Atlântica	6
Minas Gerais	Sudeste	Mata Atlântica	3
Pernambuco	Nordeste	Mata Atlântica	3
Bahia	Nordeste	Mata Atlântica	16
Espírito Santo	Sudeste	Mata Atlântica	1
Rio de Janeiro	Sudeste	Mata Atlântica	7
Paraná	Sul	Mata Atlântica	10
TOTAL			80

As 21 (26,6%) amostras provenientes dos estados do Amazonas, Pará e Acre foram isoladas em localidades pertencentes ao bioma Amazônia; as 10 amostras do Mato Grosso e 1 amostra de MG (14,0%) são provenientes do Cerrado; todas as amostras do Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pernambuco, 15 amostras da Bahia e 3 amostras de Minas Gerais foram coletadas no bioma de Mata Atlântica dando um total de 39 amostras (49,4%). As duas (2,5%) amostras do Ceará são provenientes de áreas de Caatinga e 6 (7,6%) amostras de Minas Gerais foram isoladas em regiões localizadas em área de transição dos biomas Mata Atlântica e Cerrado (Figura 5).

A tabela 3 mostra as características das amostras estudadas. Como parâmetro de comparação nas várias técnicas realizadas para a caracterização dos parasitos foram utilizadas as cepas Padrão de Referência da OMS, que estão listadas na Tabela 4.

**Tabela 3.** Características das amostras de *Leishmania braziliensis* estudadas

	<b>Código Internacional</b>	<b>Código para o estudo</b>	<b>Cidade/Estado de procedência</b>	<b>Forma clínica</b>	<b>Bioma</b>
1.	MHOM/BR/2000/1655	4777	São Jorge do Ivaí /PR	LC	Mata Atlântica
2.	MHOM/BR/2001/1877	3372	Doutor Camargo/PR	LC	Mata Atlântica
3.	MHOM/BR/2001/1972	3825	São Jorge do Ivaí/PR	LC	Mata Atlântica
4.	MHOM/BR/2001/1977	9784	São Jorge do Ivaí/PR	LC	Mata Atlântica
5.	MHOM/BR/2001/1949	9969	São Jorge do Ivaí/PR	LC	Mata Atlântica
6.	MHOM/BR/2001/1911	9626	Lobato/PR	LC	Mata Atlântica
7.	MHOM/BR/2001/1909	2501	São Jorge do Ivaí/PR	LC	Mata Atlântica
8.	MHOM/BR/2001/1936	9732	São Jorge do Ivaí/PR	LC	Mata Atlântica
9.	MHOM/BR/2001/1925	4590	Maringá/PR	LC	Mata Atlântica
10.	MHOM/BR/2001/1918	4425	Lobato/PR	LC	Mata Atlântica
11.	MHOM/BR/2001/M19814	3785	Tomé Açu/PA	LC	Amazônia
12.	MHOM/BR/1997/M16089	5064	Moju/PA	LC	Amazônia
13.	MHOM/BR/2000/M19445	5617	Portel/PA	LC	Amazônia
14.	MHOM/BR/2000/M19371	2726	Paragominas/PA	LC	Amazônia
15.	MHOM/BR/2000/M19282	0344	Paragominas/PA	LC	Amazônia
16.	MHOM/BR/1999/M17465	4003	Paragominas/PA	LC	Amazônia
17.	MHOM/BR/1999/M17323	2810	Paragominas/PA	LC	Amazônia
18.	MHOM/BR/1999/M17593	0367	Itaituba/PA	LC	Amazônia
19.	MHOM/BR/1994/M14945	8295	Parauapebas/PA	LC	Amazônia
20.	MHOM/BR/1997/M16077	0679	Acará/PA	LC	Amazônia
21.	MHOM/BR/1994/BH205	2280	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
22.	MHOM/BR/1997/BH272	2605	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
23.	MHOM/BR/1997/BH275	4991	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
24.	MHOM/BR/1997/BH276	5810	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
25.	MHOM/BR/1997/BH285	5034	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
26.	MHOM/BR/1997/BH301	1226	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
27.	MHOM/BR/1997/BH302	1476	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
28.	MHOM/BR/1997/BH304	4530	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
29.	MHOM/BR/1997/BH295	3036	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
30.	MHOM/BR/1997/BH277	2586	Cuiabá/ MT	LC	Cerrado
31.	MHOM/BR/1993/RR017	3316	Rio Acima/MG	LC	Mata Atlântica
32.	MHOM/BR/1995/RR025	7672	Araxá/MG	LC	Cerrado
33.	MHOM/BR/1997/RR035	8445	Contagem/MG	LC	Cerrado/M.Atlântica
34.	MHOM/BR/1992/RR004	7867	BH/MG	LC	Cerrado/M.Atlântica
35.	MHOM/BR/1996/RR029	4451	Araçuaí/MG	LC	Cerrado/M.Atlântica
36.	MHOM/BR/1998/RR041	9314	Diamantina/MG	LC	Cerrado/M.Atlântica
37.	RR008	0272	Timóteo/MG	LC	Mata Atlântica

38.	MHOM/BR/1998/RR056	8996	Pitangui/MG	LC	Cerrado/M.Atlântica
39.	MHOM/BR/1998/RR085	5807	Santa Luzia/MG	LC	Cerrado/M.Atlântica
40.	MHOM/BR/1998/RR083	7537	Juatuba/MG	LC	Mata Atlântica
41.	MHOM/BR/1987/H-210	9776	CE	LC	Caatinga
42.	MHOM/BR/1975/M2903	5143	Serra dos Carajás /PA	LC	Amazônia
43.	MHOM/BR/1998/JLS	9529	Amaraji /PE	LC	Mata Atlântica
44.	MHOM/BR/1998/EJS	2803	Amaraji /PE	LC	Mata Atlântica
45.	MHOM/BR/1990/IM3690	7416	Porto Velho /AM	LC	Amazônia
46.	MRAT/BR/1987/C18.454	0432	CE	LC	Caatinga
47.	MHOM/BR/1998/MAS	9595	Amaraji /PE	LC	Mata Atlântica
48.	MHOM/BR/1996/MSS	7830	BA	LC	Mata Atlântica
49.	MHOM/BR/1994/HAD-1	7515	Água Doce do Norte /ES	LC	Mata Atlântica
50.	MHOM/BR/1996/ACBF	8345	RJ	LC	Mata Atlântica
51.	MHOM/BR/1996/AFN	7368	Mesquita /RJ	LC	Mata Atlântica
52.	MHOM/BR/1996/MNZ	2930	Mesquita /RJ	LC	Mata Atlântica
53.	MHOM/BR/1996/MLJ-A	3506	Rio de Janeiro/RJ	LC	Mata Atlântica
54.	MHOM/BR/1996/OSC	1241	Rio de Janeiro/RJ	LC	Mata Atlântica
55.	MHOM/BR/1996/SNS	0956	Mesquita /RJ	LC	Mata Atlântica
56.	MHOM/BR/1996/FMG	7921	RJ	LC	Mata Atlântica
57.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10866P	0173	Mutuípe/BA	LC	Mata Atlântica
58.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10937G	3638	Pres.Tancredo Neves/BA	LC	Mata Atlântica
59.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10868	0885	Tancredo Neves, Corte de Pedra /BA	LC	Mata Atlântica
60.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10862P	6736	Tancredo Neves, Corte de Pedra /BA	LC	Mata Atlântica
61.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10865G	6565	Tancredo Neves, Corte de Pedra /BA	LC	Mata Atlântica
62.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10861P	9531	Teolândia/BA	LC	Mata Atlântica
63.	MHOM/BR/1997/NMT-MAO229P	1205	AM	LC	Amazônia
64.	MHOM/BR/1997/NMT-MAO235P	3768	AM	LC	Amazônia
65.	MHOM/BR/2002/NMT-RBO-005	9773	Cabeceira do Rio Acre /AC	LC	Amazônia
66.	MHOM/BR/2002/NMT-RBO-011	5336	Vila do V. Bryari, Km 0/AC	LC	Amazônia
67.	MHOM/BR/2002/NMT-RBO-025	5667	Ramal do Progresso /AC	LC	Amazônia
68.	MHOM/BR/2002/NMT-RBO-018	1565	Seringal Macapá, Riozinho do Rola /AC	LC	Amazônia
69.	MHOM/BR/2002/NMT-RBO-029	1718	Rio Caciriã /AC	LC	Amazônia
70.	MHOM/BR/2002/NMT-RBO-037	1141	Colônia Capitão /AC	LC	Amazônia
71.	MHOM/BR/2002/NMT-RBO-040	2733	Estr. de Sena Madureira /AC	LC	Amazônia
72.	MHOM/BR/1996/NMT-	9899	Tancredo Neves,	LC	Mata Atlântica

	LTCP10881P		Corte de Pedra/BA		
73.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP1874P	6599	Tancredo Neves, Corte de Pedra/BA	LC	Mata Atlântica
74.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10860P	5948	Tancredo Neves, Corte de Pedra /BA	LC	Mata Atlântica
75.	MHOM/BR/1996/NMT-LTCP10922P	6456	Tancredo Neves, Corte de Pedra /BA	LC	Mata Atlântica
76.	MHOM/BR/1996/NMT-10920P	1598	Tancredo Neves, Corte de Pedra /BA	LC	Mata Atlântica
77.	MHOM/BR/1996/NMT – 10883P	4121	Tancredo Neves, Corte de Pedra /BA	LC	Mata Atlântica
78.	MHOM/BR/2006/NMT – 16646P	4863	Taperoá/BA	LC	Mata Atlântica
79.	MHOM/BR/2006/NMT – 16647P	3899	Teolândia/BA	LC	Mata Atlântica
80.	MHOM/BR/2006/NMT – 16624P	3192	Wenceslau Guimarães/BA	LC	Mata Atlântica

**Tabela 4:** Amostras de Referência da OMS utilizadas

<b>Espécie</b>	<b>Código Internacional</b>	<b>Forma Clínica</b>	<b>Origem Geográfica</b>
<b><i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i></b>	MHOM/BR/75/M2903	LC	Serra dos Carajás, PA
<b><i>L. (V.) guyanensis</i></b>	MHOM/BR/75/M4147	LC	Monte Dourado, PA
<b><i>L. (V.) naiffi</i></b>	MHOM/BR/79/M5533	LC	PA
<b><i>L. (L.) chagasi</i></b>	MHOM/BR/74/PP75	LV	Ituaçu, PA

**LC:** Leishmaniose Cutânea

**LV:** Leishmaniose Visceral

Obs: A cepa padrão *L. (L.) chagasi* MHOM/BR/74/PP75, foi utilizada como outgroup na construção dos dendogramas das técnicas de RAPD e SSR.

#### 4.2 Obtenção de massa de promastigotas

Para a obtenção do número suficiente de parasitos (na ordem de  $10^8$  ou  $10^9$  parasitos/total), as amostras cultivadas em meio NNN/LIT foram transferidas na terceira passagem para dois Erlenmeyers de 50 ml contendo 5 ml de ágar base e 10 ml de LIT como fase líquida, com um inóculo de 2,5 ml de meio contendo promastigotas em fase exponencial de crescimento (5<sup>o</sup> dia). Após cinco dias de crescimento, as amostras foram transferidas para dois erlenmeyers de 125 ml contendo 10 ml de ágar base e 15 ml de meio LIT com inóculo de 5,0 ml de cultura dos Erlenmeyers anteriores. A partir destes erlenmeyers e utilizando um inóculo de 5,0 ml de cultura no 5<sup>o</sup> dia de crescimento, as amostras foram transferidas para seis erlenmeyers de 200 ml contendo 15 ml de ágar base e 20 ml de meio LIT, com um total de 150ml de cultura de cada amostra para cada uma das técnicas moleculares ou isoenzimas a serem utilizadas.

##### 4.2.1 Contagem dos parasitos em câmara de Neubauer

Antes da lavagem foi feita a contagem do número de promastigotas para cada amostra. Foram preparadas diluições adequadas com o meio de cultura e solução MFF(MACS FACS FIX, paraformaldeído/cacodilato). Dez microlitros das diluições foram retirados com pipeta automática e transferidos para a câmara de Neubauer, onde foi feita a contagem dos parasitos por quadrante. O número final de parasitos por mililitro de cultura foi calculado de acordo com a fórmula:  $n^o$  de parasitos/ml = média aritmética de quatro contagens  $\times 10^4$  (fator de correção da câmara de Neubauer e transformação para ml)  $\times$  diluição utilizada. Os valores utilizados para as técnicas moleculares foram da ordem de no mínimo  $10^8$  parasitos e para isoenzimas cerca de  $10^9$  parasitos.

#### 4.2.2 Lavagem e estocagem dos parasitos para utilização em técnicas moleculares

Quando os parasitos se encontravam na fase exponencial de crescimento, a massa celular foi preparada transferindo-se o conteúdo dos erlenmeyers para tubos FALCON de 50 ml. O meio LIT contendo cerca de  $10^8$  parasitos (PCR) foi centrifugado, a 1500g, durante 10 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado em solução PBS estéril pH 7,2. Os parasitos foram lavados por 3 vezes com PBS 1x, a 1500g, 4°C por 10 minutos. O sedimento ressuspensionado em 1,5 ml de PBS foi transferido para tubos de criopreservação (NUNC 1,8 ml) e lavado como anteriormente. Parte do sobrenadante foi desprezada e o restante foi deixado em quantidade suficiente para cobrir o sedimento. Os tubos foram estocados a -20°C até o uso.

#### 4.2.3 Lavagem e estocagem dos parasitos para a eletroforese de isoenzimas

Quando os parasitos se encontravam na fase exponencial de crescimento, a massa celular foi preparada transferindo-se o conteúdo dos erlenmeyers para tubos FALCON de 50 ml. O meio contendo cerca de  $10^9$  parasitos foi centrifugado, a 3800g, durante 10 minutos a 4°C, desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado em solução NaCl 0,85% e EDTA 0,1 M, pH 8,0, a 3800g, 4°C por 10'. O material foi lavado nas mesmas condições anteriores, por 3 vezes, o sedimento ressuspensionado em 1,5 ml da solução de lavagem, transferido para tubos de criopreservação (NUNC 1,8 ml) e lavado como anteriormente. Parte do sobrenadante foi desprezado, sendo que o restante foi deixado em quantidade suficiente para cobrir o sedimento. Os tubos foram estocados em nitrogênio líquido até o momento de serem utilizados.

#### 4.3 Eletrofores de isoenzimas (Multi Locus Enzyme Electrophoresis) em gel de agarose

O estudo isoenzimático das amostras foi realizado por eletroforese em gel de agarose, segundo Momem et al.,1985; Cupollilo et al., 1994. Foram utilizados seis sistemas enzimáticos com as seguintes enzimas:

1. G6PDH Glicose-6 fosfato-desidrogenase (E.C.1.1.1.49)
2. IDH-NADP Isocitrato desidrogenase (E.C.1.1.1.42)
3. MDH Malato desidrogenase (E.C.1.1.1.37)
4. ME Enzima Málica (E.C.1.1.1.40)
5. PGM Fosfoglucomutase (E.C.1.4.1.9)
6. 6PG 6 Fosfogluconato desidrogenase (E.C.1.1.1.43)

A presente técnica é empregada como padrão ouro na caracterização de *Leishmania*. O gel de agarose foi preparado a 1% em uma diluição de 1:1 de água destilada e Tampão Fosfato ou Tampão Maléico, de acordo com a enzima a ser testada, estes mesmos tampões eram utilizados também nas corridas eletroforéticas (Tabela 5 e 6).A agarose foi dissolvida aquecendo-se a Solução Tampão (Fosfato ou Maléico) juntamente com a água destilada, em microondas, durante 5 minutos à potência de 70 (médio alto). Aproximadamente 50 ml do gel foram derramados, ainda quente, sobre um filme de poliestireno (Filme Gelbond), o qual era apoiado sobre uma base de vidro para garantir um espalhamento uniforme do material. Após a secagem natural, o gel se encontrava pronto para o uso ou então deveria ser estocado em câmara úmida a 4°C por até 48 horas.

**Tabela 5:** Tampões utilizados nos eletrodos e na eletroforese de enzimas

TAMPÃO FOSFATO pH 8,0 *	TAMPÃO TRIS MALÉICO pH 7,4 **	
A. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O (fosfato monossódico mono hidrato; solução estoque 1 M)	Tris	24,22 g
B. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (fosfato de sódio bibásico heptahidratado; solução estoque 1M)	Ácido maléico	10,0 g
	EDTA	0,74 g
Solução para uso: Misturar 13,6 ml da solução A para 1 litro de água destilada juntamente com 186,4 ml da solução B diluída em 1 litro de água destilada.	MgCl <sub>2</sub>	0,19 g
	Água destilada q.s.p.	2 litros

\* Conservar à temperatura ambiente

\*\* Conservar à 4°C

**Tabela 6:** Preparação do gel de agarose para isoenzimas

COM TAMPÃO FOSFATO		COM TAMPÃO MALÉICO	
Tampão Fosfato	50 ml	Tampão Tris Maléico	50 ml
Água destilada	50 ml	Água destilada	50 ml
Agarose	1 g	Agarose	1 g

No momento do uso, a umidade dos géis era absorvida utilizando-se papel de filtro Whatman nº 3. Sobre o gel era colocada uma fita plástica contendo 24 retângulos equidistantes e vazados, sobre os quais eram aplicadas as amostras. Primeiramente aplicava-se uma solução de corantes (Tabela 7) em dois retângulos do gel, para indicar a velocidade e o término da corrida eletroforética.

**Tabela 7.** Solução de corantes indicadores da velocidade e do término da corrida eletroforética

CORANTE	QUANTIDADE
Azul de bromofenol	34 mg
Xilencianol	28 mg
Água	10 ml

As amostras testadas foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas. Aproximadamente 5 µl de cada amostra foram retirados com pipeta automática e aplicados diretamente em cada retângulo da fita. Estas amostras foram absorvidas pelo gel e quando se encontravam completamente secas, retirava-se a fita plástica e, assim, o gel ficava marcado.

O gel foi colocado em uma cuba de eletroforese horizontal (LKB modelo 2117) ligada no sentido polo negativo para o polo positivo. Foram colocadas esponjas com uma das laterais mergulhada no tampão e a outra bem alinhada sobre as laterais do gel para a condução de energia e manutenção do gel firme no lugar. A temperatura foi mantida a 10°C por um circulador de água refrigerada (LKB modelo 2219) e foi aplicada uma corrente de 40 volts para o Tampão Fosfato e de 60 volts para o Tampão Maléico, para que ocorresse a migração.

Ao término da corrida, a revelação da atividade enzimática no gel foi feita por meio de uma solução contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima (Tabela 8). As isoenzimas eram 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 que ocorresse a revelação das bandas. Assim que estas apareciam, a revelação era interrompida adicionando-se sobre os géis ácido acético a 5%, que eram lavados nesta mesma solução até que o excesso de corante fosse eliminado, deixando-os limpos e com as bandas eletroforéticas marcadas. Os géis eram então deixados para secar a temperatura ambiente e posteriormente analisados.

**Tabela 8:** Sistema de revelação de enzimas

<b>ENZIMAS</b>	<b>TAMPÃO DE REAÇÃO</b> TRIS HCl 0.05 M	<b>H<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>SUBSTRATOS</b> 200 mg/10 ml	<b>COENZIMAS</b> 40 mg/10 ml	<b>ATIVADORES</b> 4 g/20 ml	<b>ENZIMAS DE LIGAÇÃO</b>	<b>MÉTODOS DE VISUALIZAÇÃO</b>	<b>OBSERVAÇÕES</b>
<b>MDH (1)</b>	4 ml pH 8,0	-	1 ml 1M malato de sódio	2 ml NAD	-	-	2 ml MTT/.1MLpms 10 ml agarose**	2,7 g ácido L-málico/20ml H <sub>2</sub> O. Ajustar c/ NaOH p/ pH 7,0
<b>ME (1)</b>	4 ml pH 7,4	1 ml	1 ml 1M malato de sódio	1 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub>	-	Idem MDH	Idem MDH
<b>PGM (2)</b>	4 ml pH 7,4	-	2 ml glicose-1-fosfato	1 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub>	2U G6PDH	Idem MDH	-
<b>6PGDH (2)</b>	4 ml pH 8,0	-	2 ml 6-fosfo-gluconato	1 ml NADP	500 µl MgCl <sub>2</sub>	-	Idem MDH	Trisodium 1 ml Bário 2 ml
<b>G6PDH (1)</b>	4 ml pH 7,4	-	1 ml glicose-6-fosfato	2 ml NADP	300 µl MgCl <sub>2</sub>	-	Idem MDH	-
<b>IDH (1)</b>	4 ml pH 8,0	-	2 ml isocitrato	1 ml NADP	200 µl MgCl <sub>2</sub>	-	Idem MDH	1 ml de isocitrato

\*\* Agarose 1 g

H<sub>2</sub>O destilada 100 ml

Misturar no agitador magnético. Levar ao microondas durante 5 minutos à potência de 70.

(1) Tampão de corrida Fosfato (2) Tampão de corrida Maleico

Todos os reagentes da SIGMA.

#### 4.3.1 Análise dos géis de isoenzimas

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

#### 4.4 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de cultura para os testes moleculares foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio segundo Sambrook et al., 1989. As massas de promastigotas de *Leishmania* foram ressuspensas em 500µl de tampão de lise (SDS 10%, NaCl 5M, EDTA 0,5M), adicionou-se proteinase K (100µg/ml) e incubou-se a 37°C, "overnight". Adicionou-se igual volume de fenol (homogeneizar por 10') e as amostras foram centrifugadas por 5' a 1500g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e repetiu-se a extração agora com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Posteriormente foram adicionados dois volumes de etanol 95%, gelado, para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas durante 10' a 1500g. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi seco ao ar. O sedimento foi ressuscitado em 200µl de LOW TE e estocado a -20°C até o uso. A dosagem do DNA das amostras foi realizada em aparelho Nano Drop<sup>®</sup> Spectrophotometer ND-1000.

#### 4.5 Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR)

A amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD) tem sido utilizada no estudo de polimorfismos de em diversos trabalhos e demonstrado agrupamentos das amostras por região geográfica (Ishikawa et al., 2002; Castro et al., 2005, 2007; Carvalho et al., 2006). No presente trabalho foi utilizado o KIT GE “Ready to Go”, com reagentes em forma de pérolas, que após adição de água apresentam as seguintes concentrações para um volume final de 25µl:

Polimerases → amplitaq DNA polimerase + fragmento “Stoffel”

dNTPs → 0,4 mM de cada dNTP

BSA → 2,5 µg

Tampão → 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 30mM de KCl e 10 mM de tris pH8,3

Para obtenção dos padrões de RAPD, as reações de amplificação seguiram o seguinte protocolo:

Para cada pérola foi adicionado 19µl de água estéril livre de DNA e RNA, 5µl do primer(25pmol/µl) e 6µl de DNA(1ng/µl) perfazendo um volume final de 30 µl para cada amostra.

Foi empregado o iniciador M1340-F : 5`-GTTTTCCCAGTCACGAC-3` (Hu et al., 1982) que já foi utilizado para várias espécies do subgênero *Viannia* .

O ciclo de amplificação utilizado foi o descrito por Gomes et al. (1995) seguindo as etapas:

Desnaturação → 95°C → 5'

2 Ciclos { Anelamento → 30°C → 2'  
Extensão → 72°C → 1'  
Desnaturação → 95°C → 30"

33 Ciclos { Anelamento → 40°C → 2'  
Extensão → 72°C → 1'  
Desnaturação → 95°C → 30"

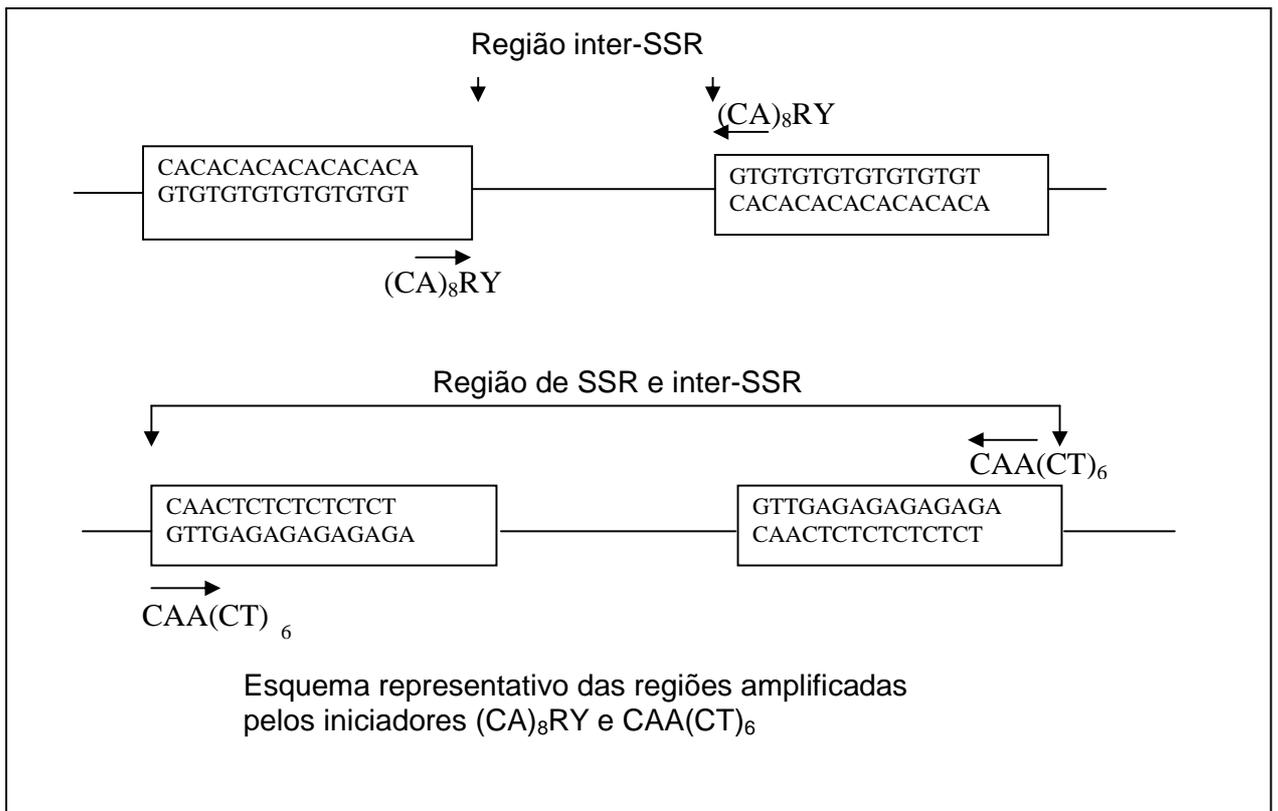
Extensão Final 72°C → 5'

#### 4.6 Reação em cadeia da polimerase ancorada a repetições de seqüência simples(SSR-PCR)

A amplificação do DNA se dá em regiões inter-repetições de seqüências simples utilizando-se o primer (CA)<sub>8</sub>RY conhecido como CARY, em regiões de SSR e inter SSR com o iniciador CAA(CT)<sub>6</sub> conhecido como "primer K7". O primer CARY se liga a repetições CA ancoradas na porção 3' por uma purina R e uma pirimidina Y quaisquer (Zietkiewicz et al., 1994); O primer K7 (Wu et al., 1994) é ancorado na extremidade 5' (Figura 6).

O protocolo de reação para CARY foi aquele desenvolvido por Zietkiewicz et al., 1994 modificado por Oliveira et al., 1997. Para o K7 o protocolo foi aquele descrito por Wu et al., 1994. Os reagentes com suas respectivas concentrações

utilizados nas reações de PCR com os iniciadores CARY e K7 estão mostrados nas tabelas 9 e 10.



**Figura 6:** Seqüência dos iniciadores para a amplificação das regiões inter-repetições de seqüências simples (primer  $(CA)_8RY$  ou CARY) e regiões de SSR e inter SSR (primer  $CAA(CT)_6$  conhecido como “primer K7”).

**Tabela 9:** Concentração dos reagentes utilizados na PCR-SSR com o iniciador CARY

Reagente	Concentração	Volume
H2O livre de DNA e RNA	-	9,9 µl
Tampão	10X	1,5 µl
dNTPs	12,5mM	0,15 µl
Primer	6,4 pmoles	1,5 µl
Formamida	-	0,3 µl
Taq polimerase	(5U/µl)	0,15 µl
DNA	1ng/ µl	2 µl
Volume final	-	15,5 µl

**Tabela 10:** Concentração dos reagentes utilizados na PCR-SSR com o iniciador K7

Reagente	Concentração	Volume
H2O livre de DNA eRNA	-	10,2 µl
Tampão	10X	1,5 µl
dNTPs	12,5mM	0,15 µl
Primer	6,4 pmoles	1,5 µl
Taq polimerase	(5U/µl)	0,15 µl
DNA	1ng/ µl	2 µl
Volume final	-	15,5 µl

O ciclo de amplificação empregado nas reações utilizando o iniciador CARY foi o seguinte:

26X {  
Desnaturação → 94°C → 30"  
Anelamento → 52°C → 45"  
Extensão → 72°C → 2'  
Desnaturação → 94°C → 30"  
Anelamento → 52°C → 45"  
Extensão Final 72°C → 7'

O ciclo de amplificação empregado nas reações utilizando o iniciador K7 foi o seguinte:

26X {  
Desnaturação → 94°C → 3'  
Anelamento → 42°C → 45"  
Extensão → 72°C → 1'  
Desnaturação → 94°C → 30"  
Anelamento → 42°C → 45"  
Extensão Final 72°C → 7'

#### 4.7 Gel de Poliacrilamida

A visualização dos produtos amplificados das amostras estudadas pelas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR foi realizada através de eletroforese em géis de poliacrilamida 5%. Foram aplicados 10µl da mistura contendo 3 µl do produto amplificado e 7 µl do tampão de amostra (blue/orange Loading Dye, 6x, Promega) em cada canaleta do gel, submetido à eletroforese, por aproximadamente 4 h até uma migração de 7 cm. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, com o gel submerso em tampão de eletroforese (TBE 1X), aplicando-se uma corrente de 80/100 volts. O marcador de peso molecular utilizado foi o de 1Kb (Promega).

Após a corrida eletroforética, os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração em nitrato de prata de acordo com o protocolo descrito por Santos et al. 1993. Os géis foram então fotografados, montados e analisados.

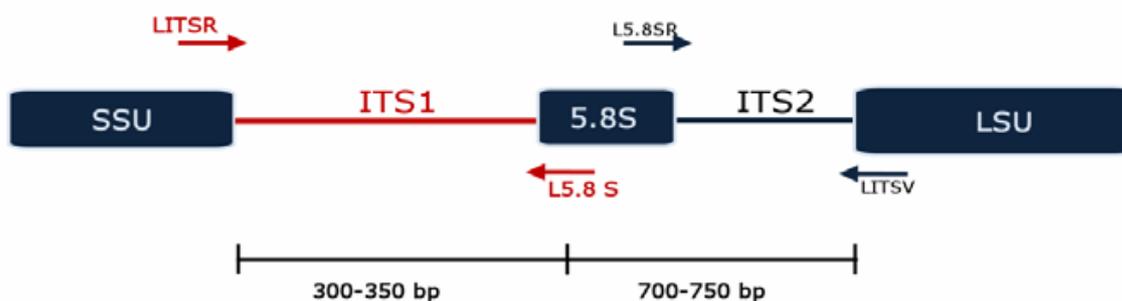
##### 4.7.1 Coloração do gel de poliacrilamida pela prata:

A solução fixadora foi colocada sobre o gel até cobri-lo. Após 10 minutos esta solução foi retirada e adicionou-se a solução de nitrato de prata permanecendo por 10 minutos. O gel foi lavado com água deionizada (dd), por duas vezes rapidamente e mais uma vez por 2 minutos. Adicionou-se a solução reveladora sob agitação leve até que as bandas fossem visualizadas. O gel foi bem lavado em água dd e acrescentada a solução fixadora. Os géis foram então fotografados e montados em papel celofane.

#### 4.8 PCR-RFLP

##### 4.8.1 PCR específico direcionado para a região de ITS1- rDNA (ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO 1 de rDNA)

A PCR direcionada a região de ITS1-rDNA foi utilizada no estudo. A região espaçadora interna transcrita 1 (ITS1- *Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal foi amplificada utilizando os iniciadores LITSR (5'-CTGGATCATTTCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3') que se anelam nas seqüências conservadas SSU e 5.8S (Figura 7) gerando um produto de 300-350 pb, visualizados em gel de agarose a 2%.



**Figura 7:** Organização do locus do rDNA de tripanozomatídeos.

Subunidades conservadas: SSU(subunidade menor) e LSU(subunidade maior)

Subunidade variável: ITS1 e ITS2

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se os reagentes nas concentrações apresentadas na Tabela 11 e seguindo o ciclo de amplificação descrito a seguir:

32 x {  
Desnaturação → 95°C → 2'  
Desnaturação → 95°C → 20"  
Anelamento → 53°C → 30"  
Extensão → 72°C → 1'  
Extensão Final 72°C → 6'

**Tabela 11:** Concentração dos reagentes utilizados na PCR - ITS1

Reagente	Concentração	Volume
H <sub>2</sub> O livre de DNA e RNA	-	35,75 µl
Tampão 10x	15mM	5,0 µl
dNTPs	12,5 mM	0,8 µl
Primer LITSR	10 pmol/µl	2,5 µl
Primer L5.8S	10 pmol/µl	2,5 µl
DMSO	-	1,25 µl
Taq polimerase	5U/µl	0,2 µl
DNA	100ng/µl	2 µl
Volume final	-	50 µl

#### 4.8.1.1 RFLP dos produtos da PCR da região ITS-1-rDNA

A PCR-RFLP direcionada a região de ITS1-rDNA também tem sido utilizada no estudo de polimorfismos de leishmania em diversos trabalhos e demonstrado agrupamentos das amostras por região geográfica (Cupolillo et al., 2003; Falqueto et al., 2003; Garcia et al., 2005).

Os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas de restrição HaeIII e BstUI nas seguintes condições: 10 µl do produto amplificado e 5µ l de solução contendo 1,5 µl de tampão 10X, 1,0 µl da enzima (HaeIII ou BstUI 10U/µl) e 2,5 µl de H<sub>2</sub>O livre de DNA e RNA. A solução foi incubada em banho Maria por 2 horas a 37°C para a enzima HaeIII e por 2 horas a 60°C para a enzima BstUI.

#### 4.8.2 PCR específico direcionado para a região *hsp70*

Os DNAs extraídos das amostras de *L. braziliensis* foram submetidos a PCR com o par de iniciadores *hsp70* FOR 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3' e *hsp70*REV 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (Garcia et al., 2004) que tem como alvo o gene que codifica para a *heat-shock* proteína de 70 kDa (*hsp70*). Para as reações de amplificação foram utilizados os reagentes nas concentrações apresentados na tabela 12.

**Tabela 12:** Concentração dos reagentes utilizados na PCR - *hsp70*

Reagente	Concentração	Volume
H <sub>2</sub> O livre de DNA e RNA	-	36,75 µl
Tampão 10x	15mM	5,0 µl
dNTPs	10,0 mM	1,0 µl
Primer HSP70 FOR	10 pmol/µl	2,0 µl
Primer HSP70 REV	10 pmol/µl	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0,75 µl
Taq polimerase	5U/µl	0,5 µl
DNA	100ng/µl	2,0 µl
Volume final	-	50 µl

O ciclo de amplificação de *hsp70* utilizado foi o seguinte:

Desnaturação → 94°C → 5'  
35 x { Desnaturação → 94°C → 30"  
Anelamento → 61°C → 1'  
Extensão → 72°C → 3'  
Extensão Final 72°C → 10'

#### 4.8.2.1 RFLP dos produtos da PCR da região *hsp70*

Os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas de restrição HaeIII e BstUI nas seguintes condições: 10 µl do produto amplificado e 5µl de solução contendo 1,5 µl de tampão 10X (15mM), 1,0 µl da enzima (HaeIII ou BstUI 10U/µl) e 2,5 µl de H<sub>2</sub>O livre de DNA e RNA. A solução foi incubada em banho Maria por 2 horas a 37°C para a enzima HaeIII e por 2 horas a 60°C para a enzima BstUI.

#### 4.9 Eletroforese dos produtos de digestão (RFLPs)

Os fragmentos resultantes da digestão com as enzimas HaeIII ou BstUI foram separados em gel de agarose 2%. Os géis foram preparados utilizando-se agarose tipo D-1 LOW EEO a 2,0 % diluída em TBE 1X e 5µl da solução de brometo de etídio a 10mg/ml. As placas medindo 15,0 x 10,0 cm e com um volume para 100 ml de agarose permitiram a obtenção de géis com 0,5 cm de espessura. Na parte superior e central do gel foi colocado um pente com 20 dentes e adicionado 19µl da mistura contendo 15µl da RFLP e 4µl do tampão de corrida blue/orange em cada canaleta.

A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente durante cerca de 40 minutos, com o gel submerso em tampão de eletroforese (TBE 1X), aplicando-se uma corrente de 80/100 volts. O marcador de peso molecular utilizado foi de 50pb e 100Pb (PROMEGA).

Os géis foram visualizados em transluminador (Vilber Lourmat) sob luz ultravioleta e fotografados em aparelho UVP BioDoc-IT™ System para posterior análise.

#### 4.10 Análise dos resultados

Os perfis de restrição de ITS1 e *hsp70* foram analisados visualmente.

As fotografias dos géis de poliacrilamida do RAPD e do SSR foram analisadas visualmente e os padrões de bandas inseridos manualmente no computador, numa planilha do programa EXCEL com dados de ausência ou presença de bandas (0/1).

Para a análise da variabilidade genética das amostras de *Leishmania braziliensis* foram utilizados dois pacotes de programas: o NTSYSpc (Versão 2.2) e o Phylip.

O NTSYS (Numerical Taxonomy System) foi originalmente desenvolvido para ser usado no campo da taxonomia numérica. Uma matriz de presença ou ausência de bandas foi construída em EXCEL e importada para o programa NTSYS. A partir desta matriz de 0 e 1 foi gerada uma matriz de distância e foram construídos dendogramas pelo método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean), com base no coeficiente de DICE.

O pacote Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) contém uma série de programas específicos para estudos de filogenia. É um software de uso livre. Um programa de parcimônia que faz parte do “Discrete Character Programs”, que inclui programas para tratamento de dados discretos e dados do tipo presença-ausência (0/1) do pacote Phylip foi utilizado. “Dollop” e “Mix” foram os programas escolhidos dentre os programas de características discretas, não sendo observadas politomias. Dollop foi o primeiro a descrever que, em evolução, é mais difícil ganhar uma característica complexa (0 passar para 1) do que perder (1 passar para 0).

Neste método, o estado ancestral é conhecido (zero). “Dollop” também aceita “?” e “B” para retenção de polimorfismos (“both” – 0 e 1);

No entanto, programas de parcimônia costumam gerar mais de uma solução possível (árvores) e, para cada caso, uma árvore consenso foi gerada com o programa “Consense” (Phylip).

As topologias das árvores consenso permitiram uma boa separação de cada unidade taxonômica. Para tal, foi necessário incluir o símbolo “?” em alguns dos conjuntos de dados (marcadores) para os quais alguma unidade taxonômica não fora testada. Assim, todos os conjuntos de dados passaram a ter o mesmo número de unidades taxonômicas (cada unidade taxonômica sendo representada por uma coluna nas tabelas). Em seguida, os dados obtidos com cada marcador (M1340, cary, e k7) foram agrupados em uma única tabela, para a concatenação destes e foi gerada uma nova árvore. As árvores foram representadas com o programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) que não pertence ao pacote Phylip e possui mais recursos para edição gráfica das árvores.

## *5. Resultados*

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS (MLEE) EM GEL DE AGAROSE**

A análise dos resultados da eletroforese de todas as amostras com as seis enzimas utilizadas possibilitou a determinação dos eletromorfos. Para cada enzima, as bandas com mobilidade eletroforética idêntica foram consideradas como sendo o mesmo eletromorfo.

Os eletromorfos observados para as amostras estudadas e para as cepas de referência estão representadas na tabela 13 e no diagrama do quadro 3.

A maioria das amostras (87,3%) apresentou o perfil de migração idêntico ao da cepa padrão de *L. braziliensis* e estão representadas na tabela 10 como grupo A (n=54) e sub-grupos A1 (n=8) e A2 (n=6). Destas, 54 amostras (79,4%) puderam ser caracterizadas pelas seis enzimas propostas. Com algumas amostras (20,6%, n=14) não foi possível a caracterização com todas as enzimas, porém os resultados obtidos com as enzimas testadas foram suficientes para identificá-las como *L. braziliensis*.

Das amostras que compõem o grupo A1, seis (3316MG, 0272MG, 7537MG, 7672MG, 8345RJ, 1476MT) foram negativas para a enzima PGM, uma (2501PR) foi negativa para ME e uma (6736BA) negativa para MDH. Entretanto, todas as amostras apresentaram eletromorfos idênticos aos da cepa M2903 para as outras cinco enzimas.

As seis amostras 3899BA, 3192BA, 4863BA, 5807MG, 7436, 8996MG incluídas no Grupo A2 foram caracterizadas com quatro enzimas como *L.braziliensis* (não foram testadas as enzimas MDH e ME).

Oito amostras, 9784PR, 5810MT, 3785PA, 7416AM, 6599BA, 7368RJ, 2930RJ, 0956RJ (10,2%) apresentaram somente um eletromorfo diferente (Grupo B) da cepa de referência de *L. braziliensis*, com o perfil de *L. guyanensis* para a enzima IDHNADP. Duas amostras, 5336AC e 1718AC (2,6%) apresentaram o perfil mais heterogêneo, com padrões diferentes (Grupo C) de *L. braziliensis* para 3 enzimas (G6PDH, IDHNADP e MDH), sendo estes semelhantes a *L. guyanensis* e *L. naiffi*. Estas amostras foram designadas como variantes e precisam ser melhor avaliadas com um painel maior de enzimas.

## Resultados

**Tabela 13:** Eletromorfos observados nas amostras de *Leishmania braziliensis* estudadas e nas cepas de referência

AMOSTRAS	ENZIMAS					
	G6PDH	IDHNADP	MDH	ME	6PGDH	PGM
<i>L. guyanensis</i> (M4147 ou 565)	2,4,6	3	3	1	3	2,4
<i>L. naiffi</i> (M5533)	1,2,3	1	2	2	1	1
<b><i>L. braziliensis</i></b> <b>(M2903 ou 566)</b>	<b>2,3,5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Grupo A (n = 54)	2,3,5	2	1	3	2	3
	2,3,5	2	1	3	2	Θ
Grupo A1 (n = 8)	2,3,5	2	1	Θ	2	3
	2,3,5	2	Θ	3	2	3
Grupo A2 (n = 6)	2,3,5	2	1	3	NR	NR
Grupo B (n = 8)	2,3,5	3	1	3	2	3
Grupo C (n = 2)	1,2,3	3	3	3	2	3

**NR** = Não realizado; **Θ** = banda não visualizada

**Grupo A** = Amostras que apresentaram eletromorfos idênticos aos da cepa de referência de *L. braziliensis* (M2903) para as seis enzimas estudadas,

**Grupo A1** = Amostras que apresentaram eletromorfos idênticos aos da cepa de referência de *L. braziliensis* (M2903) com cinco enzimas estudadas,

**Grupo A2** = Amostras que apresentaram eletromorfos idênticos aos da cepa de referência de *L. braziliensis* (M2903) com quatro enzimas estudadas,

**Grupo B** = Amostras que apresentaram somente um eletromorfo diferente da cepa de referência de *L. braziliensis* (M2903),

**Grupo C** = Amostras que apresentaram três eletromorfos diferentes da cepa de referência de *L. braziliensis* (M2903),

**Resultados**

		1	2	3	4	5	6			1	2	3	4	5	6	
G6PDH	6		—					ME								
	5	—			—	—										
	4		—													
	3	—		—	—	—	—		3	—			—	—	—	
	2	—	—	—	—	—	—		2			—				
	1			—			—		1		—					
IDHNADP	3		—			—	—	6PGDH	3		—					
	2	—			—				2	—			—	—	—	
	1			—					1			—				
MDH	3		—				—	PGM	4		—					
	2			—					3	—			—	—	—	
	1	—			—	—			2		—					
	1	—			—	—		1			—					

**Quadro 3:** Diagrama dos perfis das enzimas

1. G6PDH Glicose-6 fosfato-desidrogenase (E.C.1.1.1.49)
2. IDH-NADP Isocitrato desidrogenase (E.C.1.1.1.42)
3. MDH Malato desidrogenase (E.C.1.1.1.37)
4. ME Enzima Málica (E.C.1.1.1.40)
5. PGM Fosfoglucomutase (E.C.1.4.1.9)
6. 6PG 6 Fosfogluconato desidrogenase (E.C.1.1.1.43)

## Resultados

O número médio de alelos presentes em cada *locus* pode exprimir o grau relativo da variabilidade genética entre os organismos. Dentre os seis *loci* estudados alguns se mostraram polimórficos para as amostras em relação a cepa padrão de *L. braziliensis*, apresentando um número médio de alelos por *locus* de 1,8 para as amostras estudadas e 1,3 para a cepa de referência (Tabela 14). O número médio de alelos foi um pouco maior para as amostras estudadas, indicando alguma variabilidade entre este grupo em relação a cepa padrão.

**Tabela 14:** Número de alelos encontrados por *locus* enzimático nas espécies estudadas

Número de alelos por <i>locus</i>		
Enzimas	<i>L.braziliensis</i> M2903	Amostras de <i>L.braziliensis</i>
G6PDH	3	4
IDHNADP	1	2
MDH	1	2
ME	1	1
6PGDH	1	1
PGM	1	1
Total	8	11
Nº médio de alelos por locus	1,3	1,8

## Resultados

O quadro 4 apresenta as amostras agrupadas por perfis, as cores do fundo representam os biomas e as cores das letras representam as regiões geográficas

Perfil 1 (=2903)					Perfil 2 (1 enzima ≠)	Perfil 3 (3 enzimas ≠s)
1565AC	2803PE	4425PR	2605MT	3899BA	7416AM	5336AC
9773AC	9595PE	9969PR	4530MT	3192BA	3785PA	1718AC
1141AC	9529PE	9732PR	3036MT	4863BA	5810MT	
2733AC	4121BA	4590PR	1226MT	3638BA	6599BA	
5667AC	9899BA	9626PR	2586MT	9531BA	7368RJ	
3768AM	0885BA	3825PR	4991MT	7830BA	2930RJ	
1205AM	6565BA	4777PR	1476MT	0173BA	0956RJ	
5617PA	6736BA	3372PR	7672MG	9776CE	9784PR	
0344PA	6456BA	2501PR	9314MG	0432CE		
2726PA	1598BA	0272MG	8445MG			
4003PA	5948BA	7537MG	7867MG			
0679PA		8996MG	7515ES			
0367PA		5807MG	7921RJ			
8295PA		4451MG	3506RJ			
5064PA		3316MG	1241RJ			
5143PA			8345RJ			

**Quadro 4:** Perfis encontrados nas amostras de *L. braziliensis* de diferentes biomas e regiões geográficas do Brasil.

### Legenda

#### Biomassas:

- Amazônia
- Mata Atlântica
- Caatinga
- Cerrado
- Cerrado e Mata Atlântica

#### Regiões geográficas:

- Norte
- Nordeste
- Centro Oeste
- Sudeste
- Sul

## Resultados

As amostras que apresentaram todos os eletromorfos iguais ao da *L. braziliensis* foram incluídas no Grupo A, apresentando, índice de similaridade de 1.0 (100%) com a cepa de referência. As amostras do Grupo B apresentam 83% de similaridade com a cepa de referência *L. braziliensis* e o Grupo A, e 67% com o Grupo C que apresentou 50% de similaridade com o padrão de *L. braziliensis* e o Grupo A (Quadro 5).

As cepas padrão de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. naiffi* apresentaram índice de similaridade de zero entre elas, em relação às enzimas estudadas.

Estudos mostraram que a *L. guyanensis* é muito mais próxima de outras espécies do complexo *braziliensis* (como por exemplo, a *L. panamensis*) do que da *L. braziliensis* (Cupolillo et al., 1994).

**Quadro 5:** Índice de similaridade entre as amostras estudadas e as cepas de referência das espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. naiffi*

	<i>L.braziliensis</i>	<i>L.guyanensis</i>	<i>L. naiffi</i>	Grupo A	Grupo B	Grupo C
<i>L.braziliensis</i>	1					
<i>L.guyanensis</i>	0,00	1				
<i>L. naiffi</i>	0,00	0,00	1			
Grupo A	1	0,00	0,00	1		
Grupo B	0,83	0,17	0,00	0,83	1	
Grupo C	0,50	0,33	0,17	0,50	0,67	1

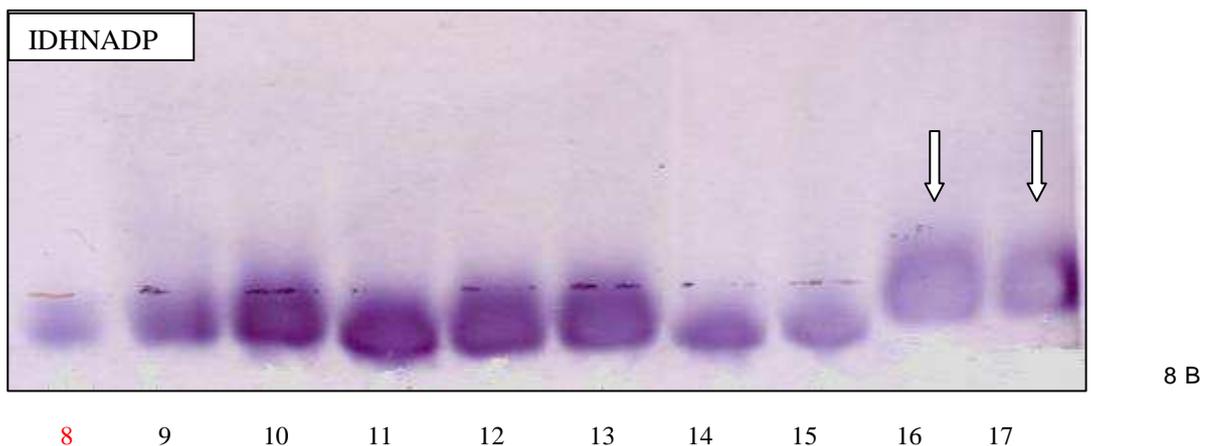
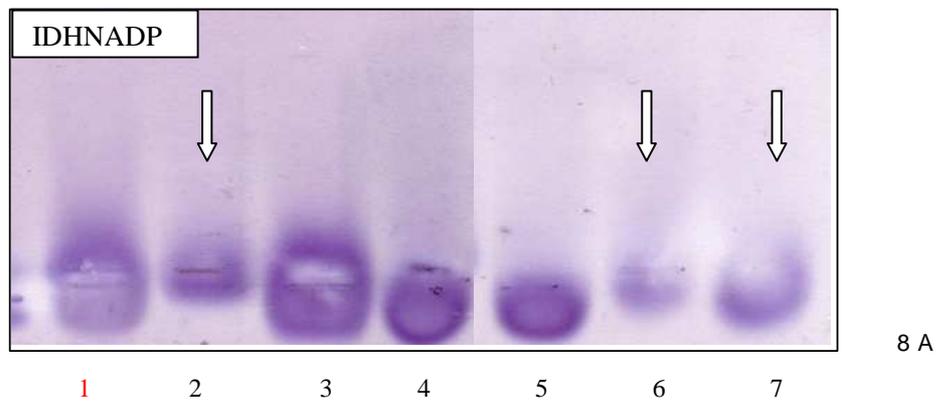
## Resultados

Os resultados obtidos com a eletroforese de algumas das enzimas utilizadas são apresentados nas figuras de 8 a 11.

As figuras 8A e 8B mostram amostras consideradas variantes para a enzima IDH do grupo B, e do grupo C, respectivamente.

A figura 9 mostra o perfil das enzimas glicose - 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e malato desidrogenase (MDH) destacando as amostras variantes pertencentes ao grupo C.

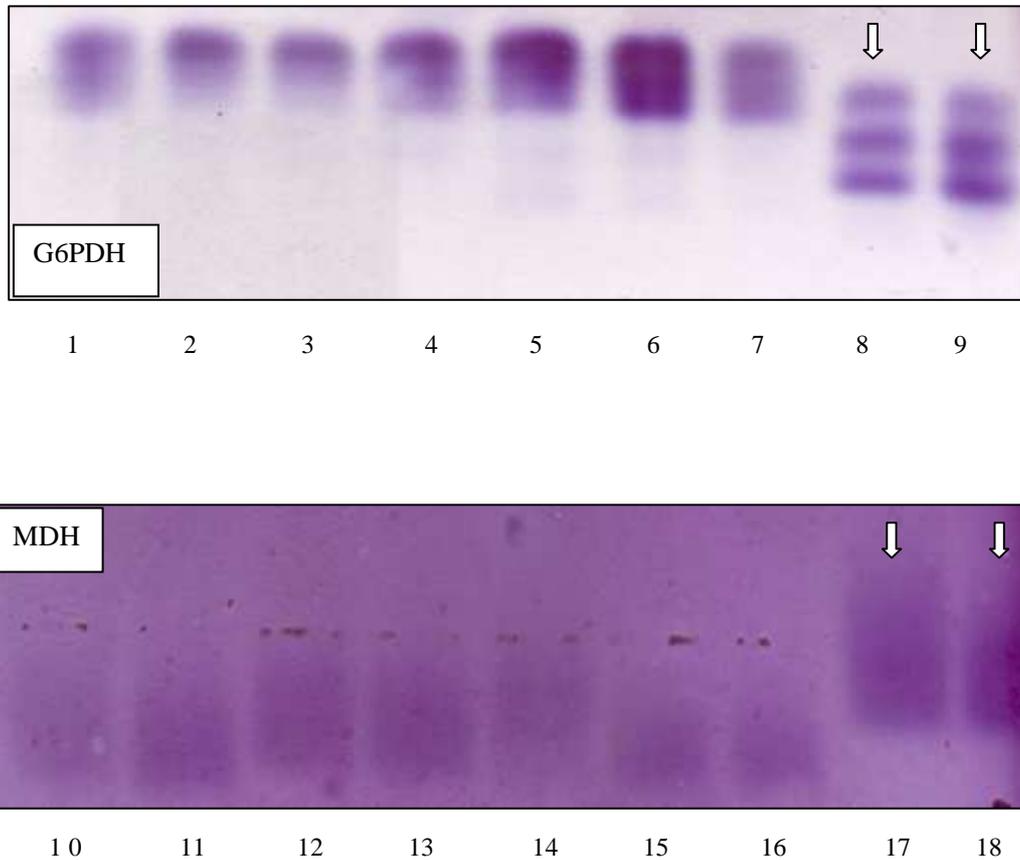
As figuras 10 e 11 apresentam algumas das amostras estudadas que mostraram perfil semelhante ao da cepa referência de *L. braziliensis* (M2903).



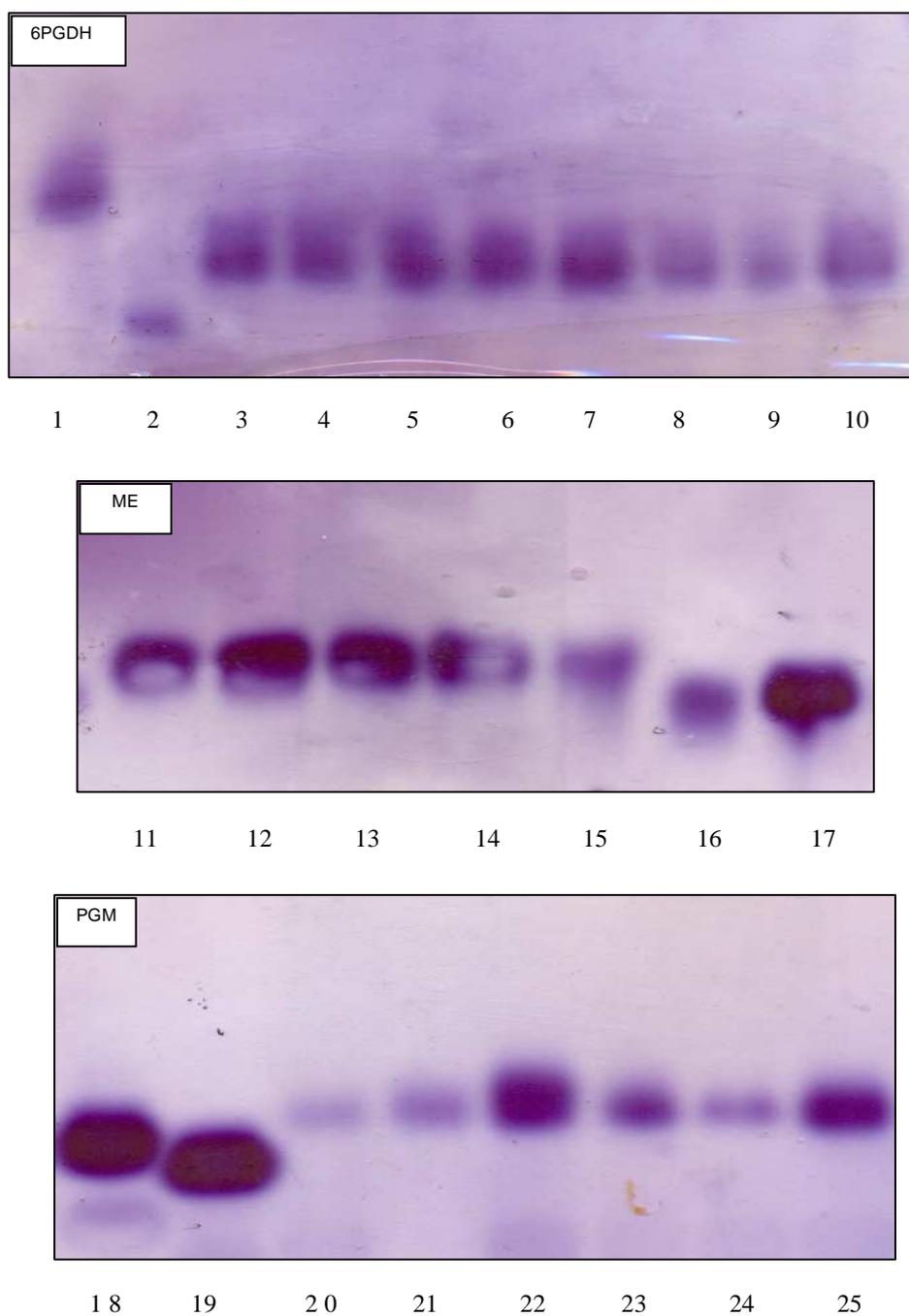
**Figura 8A e 8B:** Perfil enzimático de isocitrato desidrogenase (IDHNADP)

**Canaletas:** 1 e 8 *L.braziliensis*(M2903), 2 a 7 e 9 a 17 - amostras de *L.braziliensis*

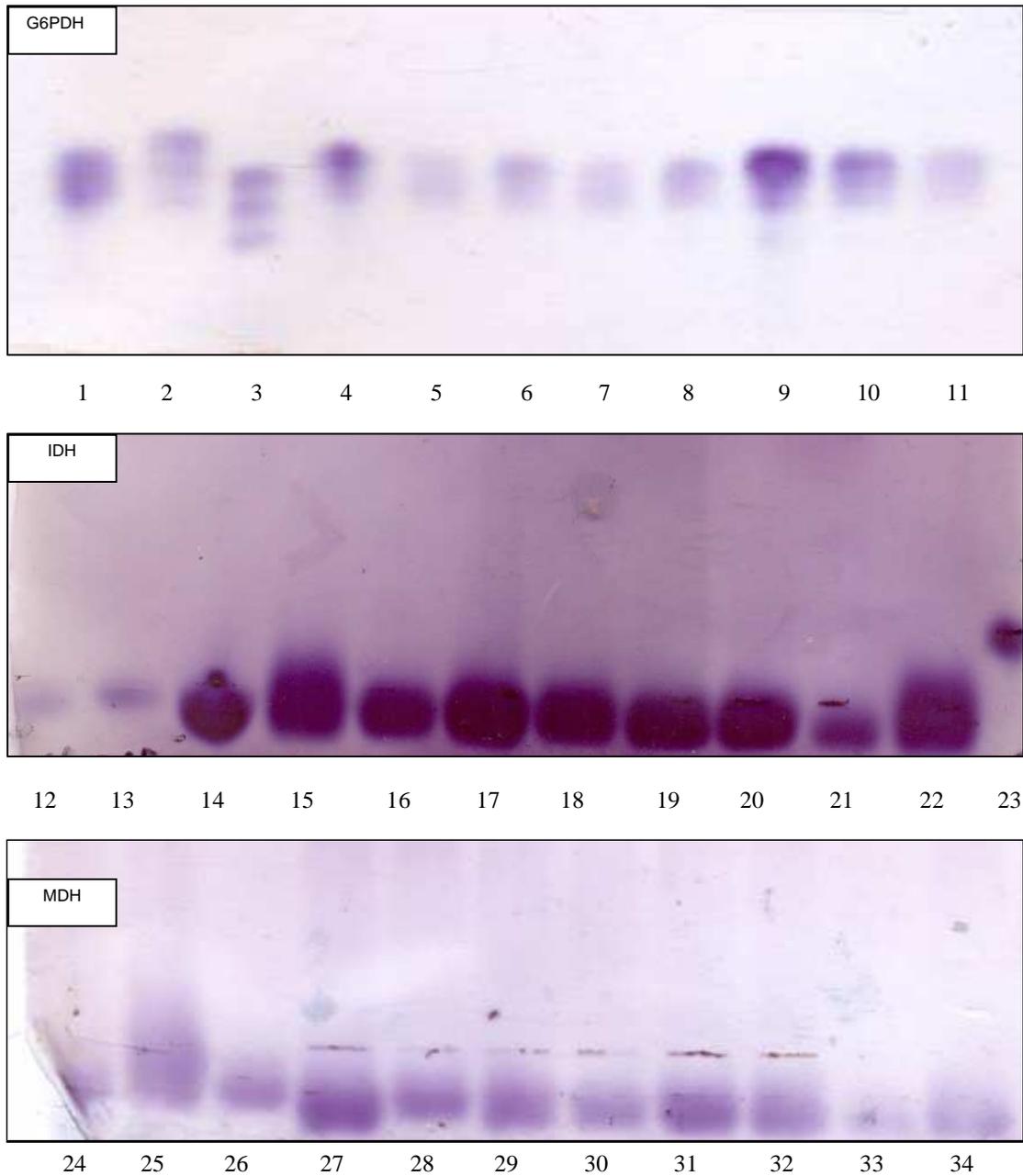
As amostras nas canaletas 2, 6, 7, 16 e 17 são variantes.



**Figura 9:** Perfil enzimático de glicose - 6 fosfato desidrogenase (G6PDH) e malato desidrogenase (MDH). **Canaletas:** 1 e 10 - referência de *L.braziliensis* (M2903), 2 a 9 e 11 a 18 amostras de *L.braziliensis* . As amostras nas canaletas 8, 9, 17 e 18 são variantes.



**Figura 10:** Perfil enzimático de 6-fosfo-glico desidrogenase (6PGDH), enzima málica (ME) e fosfo-gluco mutase (PGM). **Canaletas:** 3, 11 e 20 - referência de *L. braziliensis* (M2903); 1, 16, e 18 - referência de *L. guyanensis* (M4147); 2, 17 e 19 - referência de *L. naiff* (M5956); 4 a 10, 12 a 15 e 21 a 25 amostras estudadas de *L. braziliensis*.



**Figura 11:** Perfil enzimático de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), isocitrato desidrogenase (IDH) e malato desidrogenase (MDH).

**Canaletas:** 1, 12 e 24 - referência de *L.braziliensis* (M2903); 2, 13, e 25 - referência de *L.guyanensis*(M4147); 3, 14 e 26 - referência de *L.naiffi* (M5533); 23 - referência de *L. chagasi* (PP75); 4 a 11, 15 a 22 e 27 a 34 amostras estudadas de *L.braziliensis*.

## **5.2 Amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD-PCR)**

A análise dos perfis de RAPD evidenciou que o iniciador M1340F foi capaz de mostrar variabilidade genética intraespecífica em *L. braziliensis*. Das 80 amostras testadas não obtivemos amplificação somente com uma amostra (4991MT). A figura 12 mostra os perfis de RAPD, de algumas amostras estudadas, em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata. Podem ser observados perfis diferentes entre as amostras, sendo que a cepa de referência *L.braziliensis* 2903 gerou um perfil com 11 bandas, e ao todo foram analisados 19 fragmentos que variaram de 200pb a 800pb.

Um dendograma foi gerado, utilizando-se o programa NTSYS, pelo método de UPGMA (coeficiente de DICE), através da comparação entre todas as amostras considerando-se a presença ou ausência de bandas (Figura 13).

Pode ser observado que o conjunto dos isolados apresentou 70% de similaridade e que se formaram claramente dois grandes “clusters” (A e B) refletindo a diversidade genética entre as amostras de *L.braziliensis* testadas.

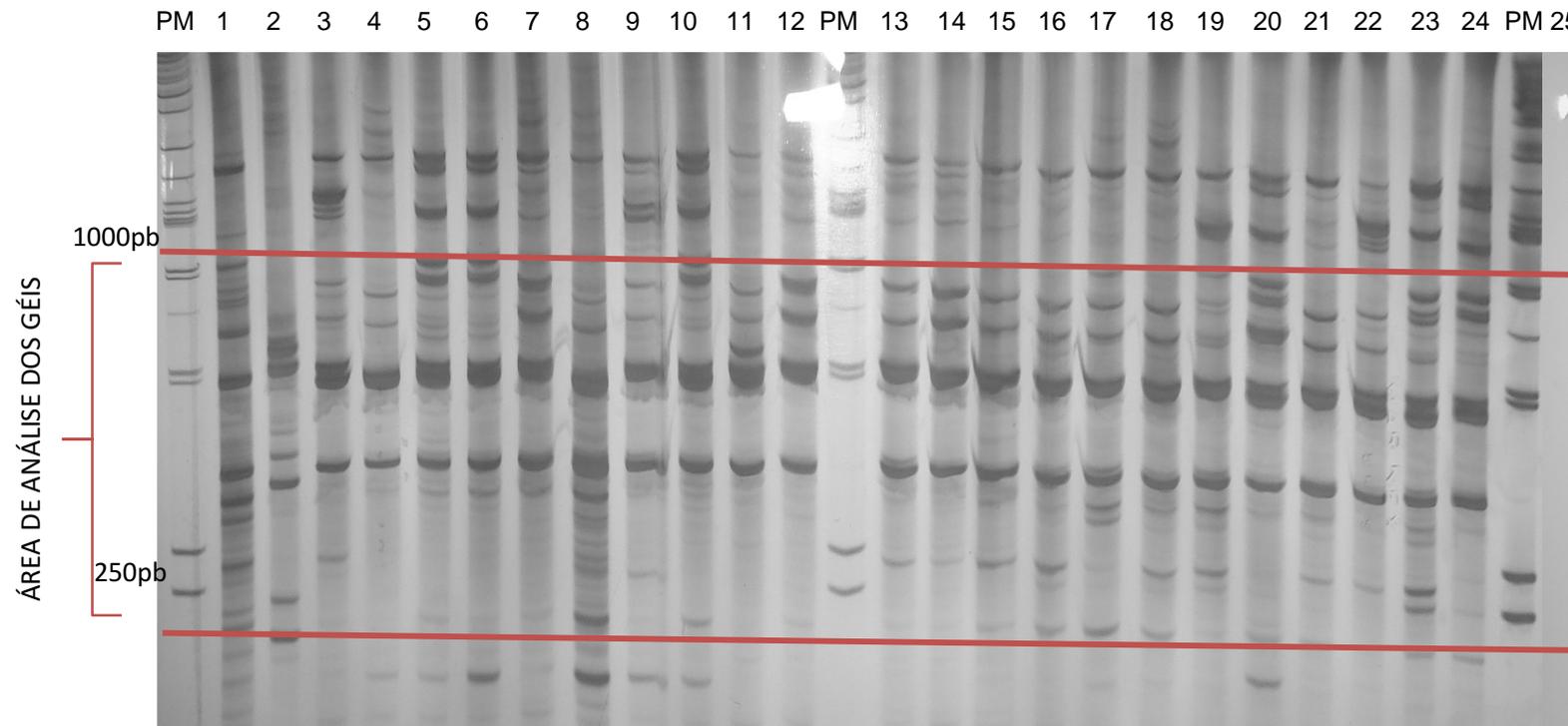
Quando analisamos o agrupamento por biomas notamos que a maioria das amostras do bioma Cerrado (80%) está agrupada no cluster A onde está inserida a cepa padrão M2903. As maioria (66,7%) das amostras da zona de transição Cerrado e Mata Atlântica também estão agrupadas no cluster A. A maioria das amostras do bioma Mata Atlântica (62%) maioria do Nordeste, a maioria das amostras do bioma Amazônia(66,7%) e as duas da Caatinga (100%) se encontram no cluster B,.

Ao separarmos as amostras por região, 90,5% das amostras do Nordeste e 66,7% da região Norte, estão agrupadas no cluster B. As amostras da região Sudeste se dividem nos dois grupos (50%). A maioria das amostras da região Centro-Oeste (77,8%) e Sul (90%) se agrupou no ramo da cepa padrão M2903, cluster A.

Combinando os resultados da análise por biomas e por região, podemos dizer que a maioria das amostras da região Centro-Oeste, e do Cerrado e também

a região Sul se agrupou no cluster A. Amostras do Nordeste incluindo as amostras provenientes da caatinga e a maioria das amostras da região Norte representantes do bioma Amazônia se agruparam no cluster B.

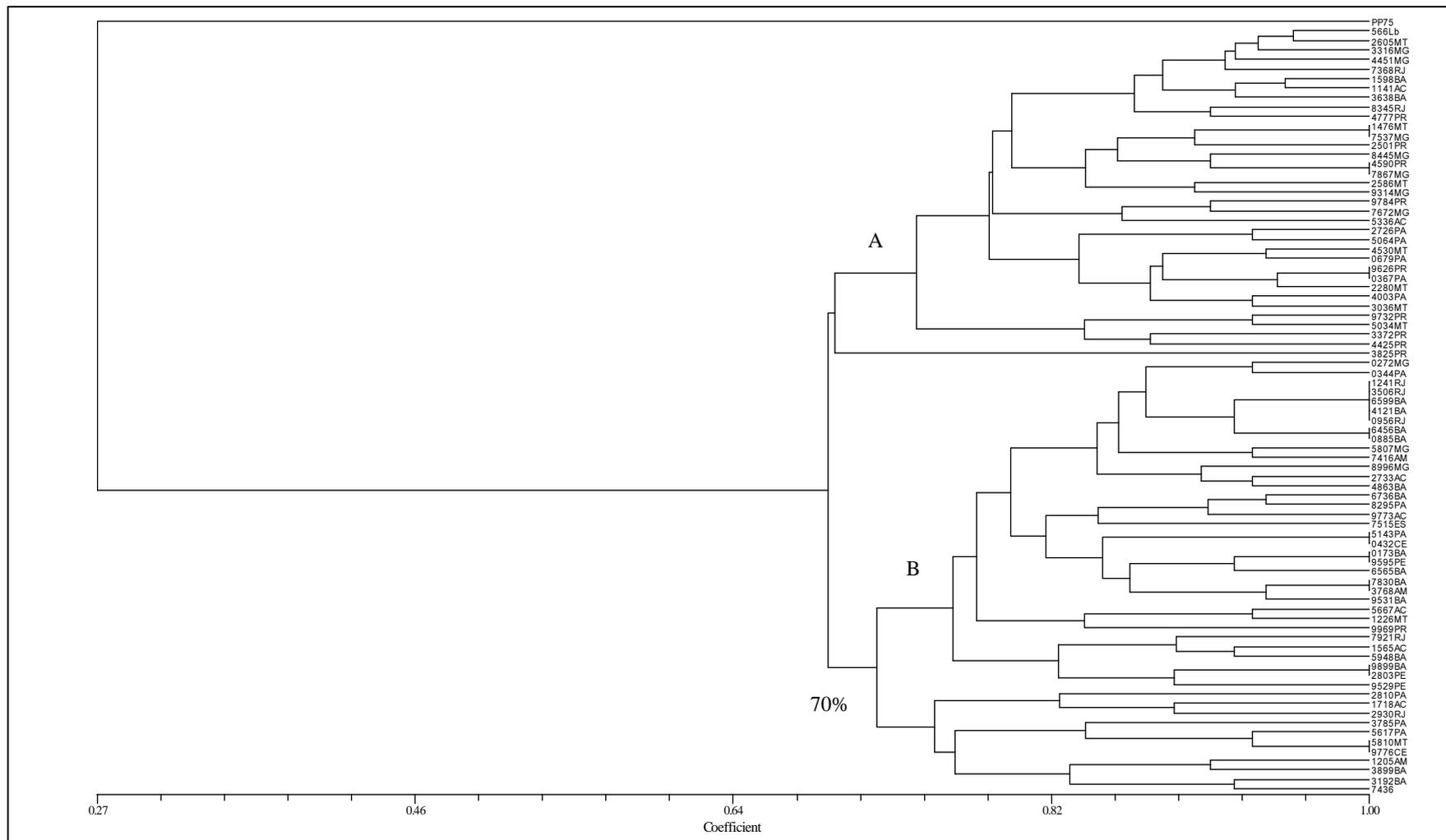
As bandas também foram analisadas pelo método de parcimônia com os programas Mix e Dollop. Observamos que a maioria das amostras se agruparam em um único cluster, nos dois programas utilizados e analisando-se as amostras tanto por biomas quanto por regiões(Figuras 14,15,16 e17).



**Figura 12:** Perfil obtido das amostras estudadas pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata.

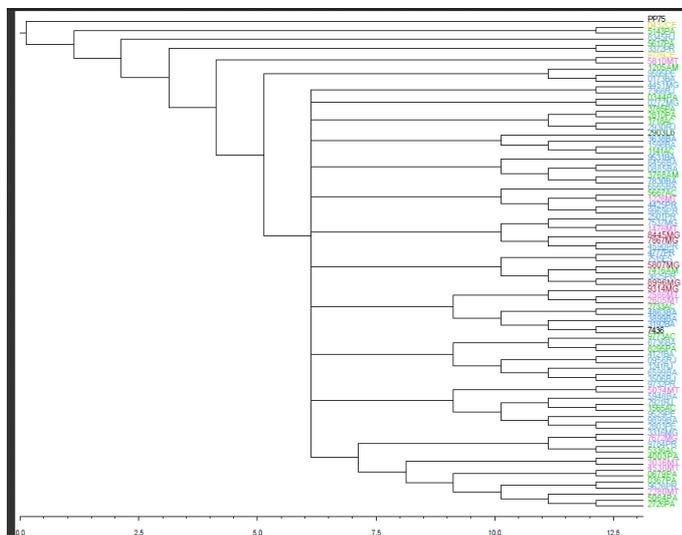
**Canalhas:** PM: peso molecular de 1Kb da PROMEGA, 25. Controle Negativo

**Amostras:** 1. referência de *L.braziliensis*(M2903); 3 a 24 amostras de *L.braziliensis* ; 2. referência de *L. chagasi*(PP75).

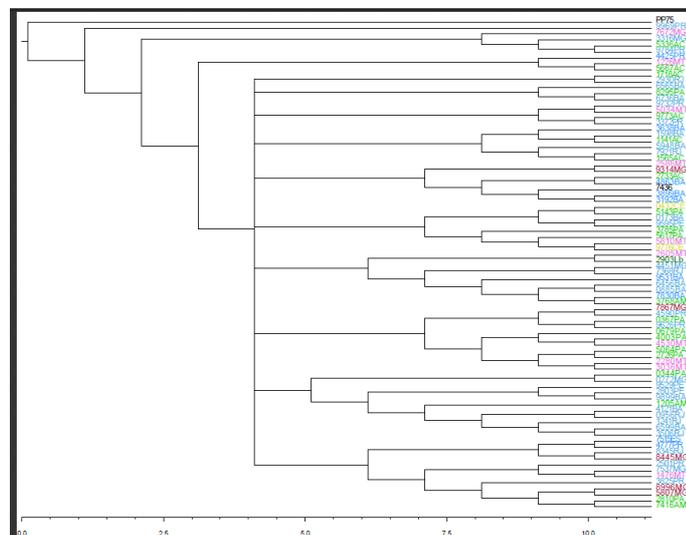


**Figura 13:** Dendrograma, construído pelo método UPGMA programa NTSYS com a técnica de RAPD com o iniciador M1340F, das amostras estudadas e das cepas padrão PP75 (*L.chagasi*) e M2903 (*L.braziliensis*). A = Grupo A e B = Grupo B

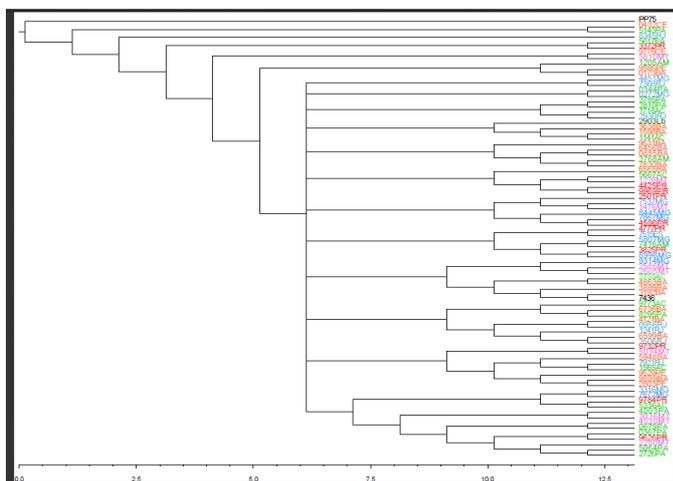
## Resultados



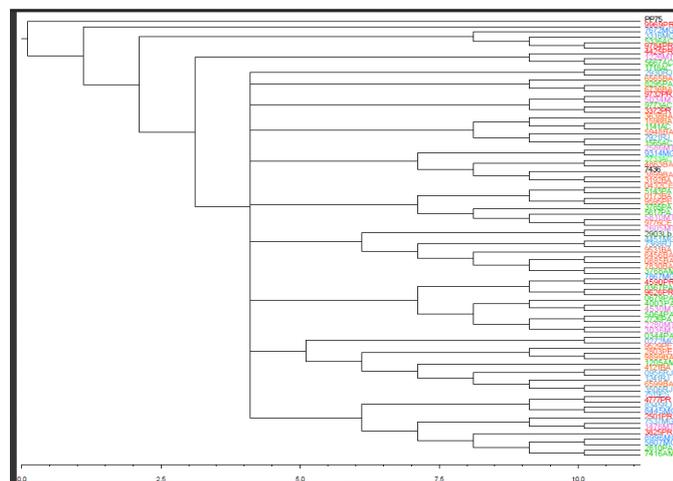
**Figura 14:** Dendrograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340, o agrupamento das cores representa os Biomas



**Figura 15:** Dendrograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F, o agrupamento das cores representa os Biomas



**Figura 16:** Dendrograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F, o agrupamento das cores representa as regiões



**Figura 17:** Dendrograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de RAPD com o iniciador M1340F, o agrupamento das cores representa as regiões

### **5.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ANCORADA A REPETIÇÕES DE SEQUÊNCIAS SIMPLES (SSR-PCR)**

A análise dos perfis gerados por SSR evidenciou que os iniciadores Cary e K7 foram capazes de mostrar variabilidade intraespecífica nas amostras estudadas.

Das 80 amostras, 78 amostras amplificaram com o iniciador Cary (as amostras 4425PR e 4777PR não amplificaram) e 78 amostras amplificaram com o iniciador K7 (as amostras 4425PR e 7416AM não amplificaram).

As figuras 18 e 24 mostram os produtos do SSR-PCR de algumas amostras estudadas, aplicados em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata. A cepa de referência *L.braziliensis* (M2903) gerou um perfil com 13 bandas para o iniciador Cary (e 23 bandas no total) e 12 bandas para o iniciador K7 (e 24 bandas no total).

Foi gerado um dendograma, pela análise da presença ou ausência de bandas de todas as amostras pelo programa NTSYS para o iniciador CARY (Figura 19) e para o iniciador K7 (Figura 25).

Pelo SSR analisou-se múltiplos fragmentos variando de 250pb a 800 bp para o iniciador CARY e 250pb a 1000pb bp para o iniciador K7.

Podemos observar que com o iniciador CARY, os isolados apresentaram 74% de similaridade entre eles e agruparam-se em um clustrer, incluindo a cepa de referência de *L. braziliensis*.

A maioria das amostras apresentou mais de 90% de similaridade com a cepa padrão(M2903). Os resultados mostraram alguma variabilidade entre as amostras de *L.braziliensis* testadas (Figura 19).

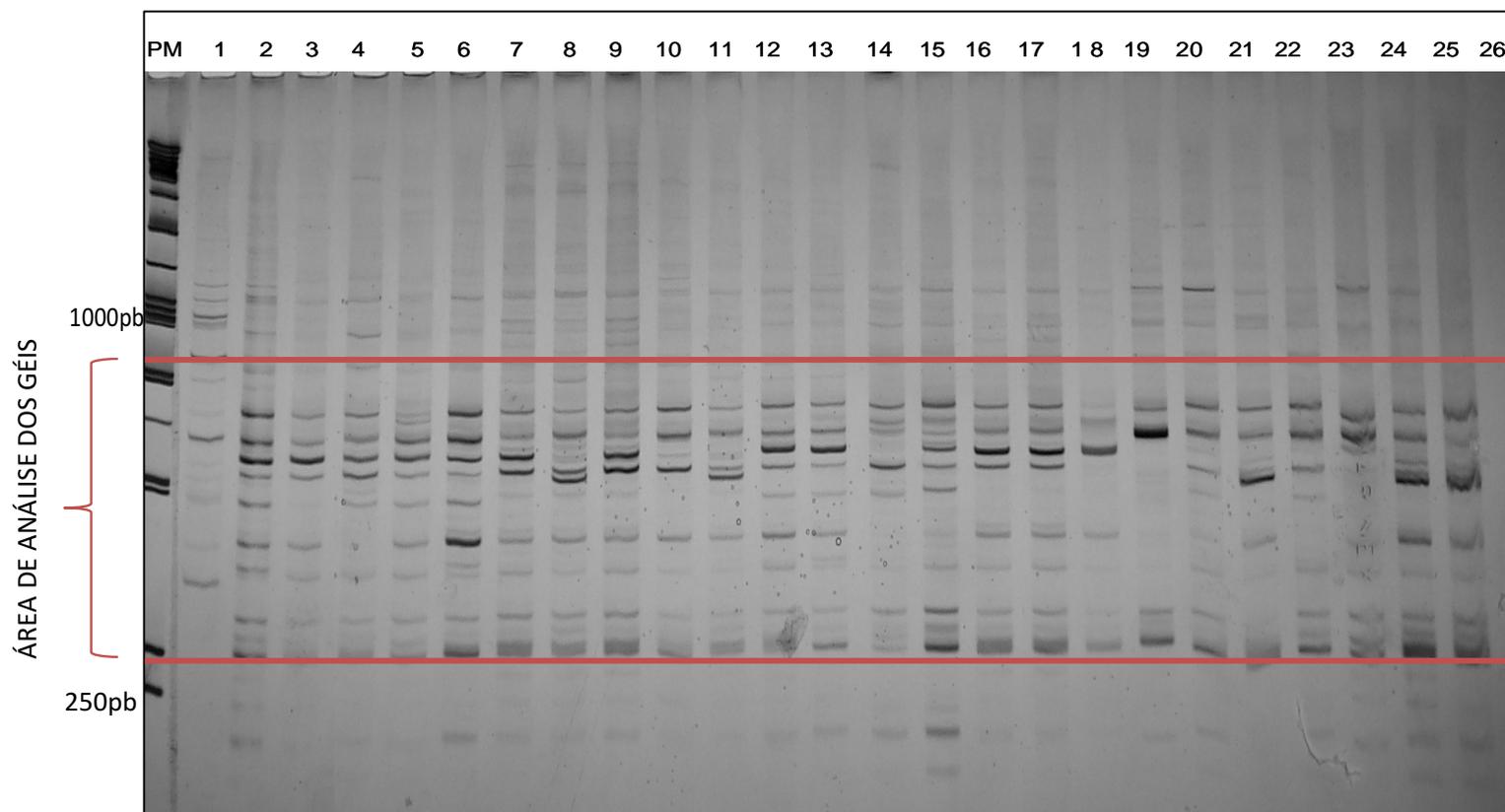
As bandas também foram analisadas pelo método de parcimônia com os programas Mix e Dollop. Observamos que com ambos os programas utilizados a maioria das amostras se agrupou em um único cluster, quando se analisou as amostras tanto por biomas quanto por regiões, para o iniciador CARY (Figuras 20 a 23).

As amostras estudadas utilizando-s o iniciador K7 apresentaram 70% de similaridade entre elas (Figura 25). Para o iniciador k7 observou-se uma formação de 2 grupos, o grupo A que apresentou a maioria das amostras do bioma Cerrado (80%) e o grupo B com a maioria das amostras do bioma Amazonas (67%), Caatinga (50%) e Mata Atlântica (87%), 15 amostras ficaram de fora destes 2 grupos.

Os perfis também foram analisadas pelo método de parcimônia com os programas Mix e Dollop. Observamos que a maioria das amostras se agruparam em um único cluster, nos dois programas utilizados e analisando-se as amostras tanto por biomas quanto por regiões, para o iniciador K7 (Figuras 26 a 29).

Uma árvore consenso foi gerada pelo programa dollop e Mix com os dados concatenados dos três marcadores utilizados (M1340F, CARY e K7). Apesar das amostras não terem separado bem, como no programa NTSYS para M1340F, no programa Mix com os dados concatenados, observamos a formação de 2 grupos onde a maioria das amostras do bioma Amazônia/região Norte (58%) e região Nordeste (62%) estão juntas em um grupo e o bioma Cerrado/região Centro-Oeste

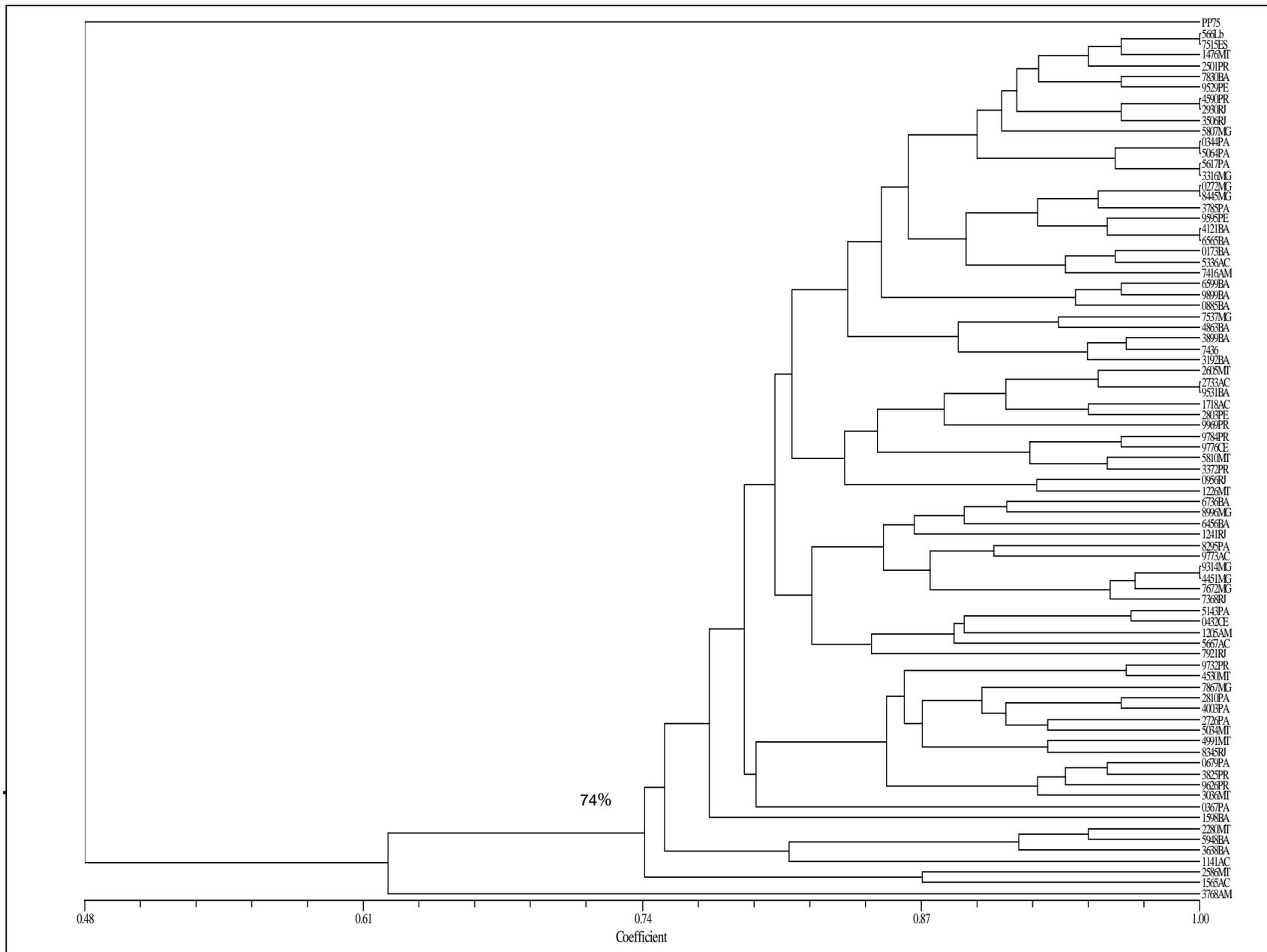
(100%), Cerrado e Mata Atlântica (67%) e a região Sul (80%) estão em outro grupo, o que concorda com a análise com o programa NTSYS (figura 31).



**Figura 18:** Perfil obtido das amostras estudadas pela técnica de SSR com o iniciador Cary em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata

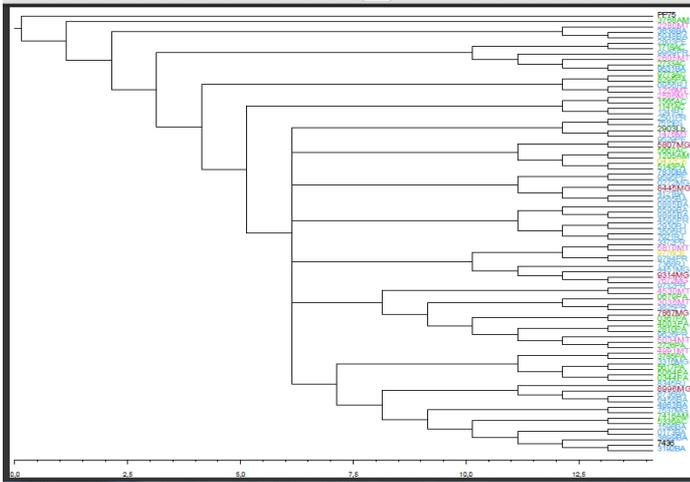
**Canaletas:** PM: peso molecular de 1Kb da PROMEGA,

**Amostras:** 2. referência de *L.braziliensis*(M2903); 3 a 25 amostras de *L.braziliensis* ; 1. referência de *L. chagasi*(PP75); 26. controle negativo.

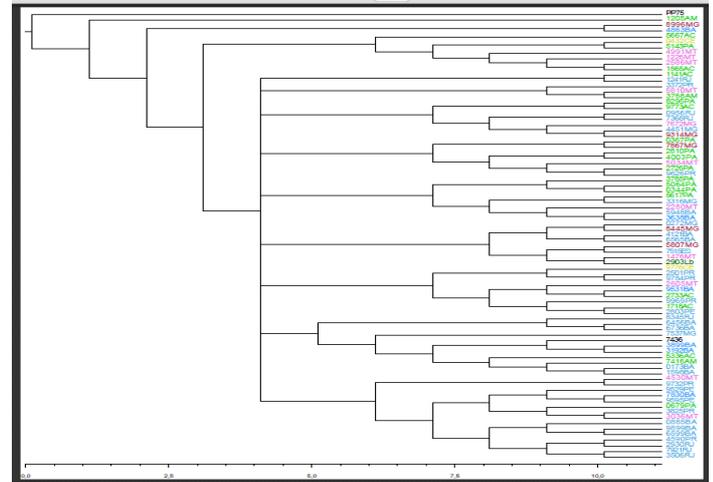


**Figura 19:** Dendrograma, gerado pelo método UPGMA programa NTSYS, pela técnica de SSR com o iniciador CARY

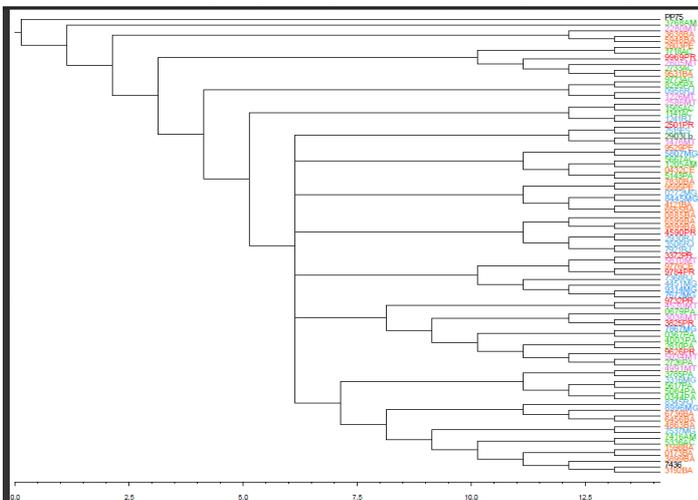
## Resultados



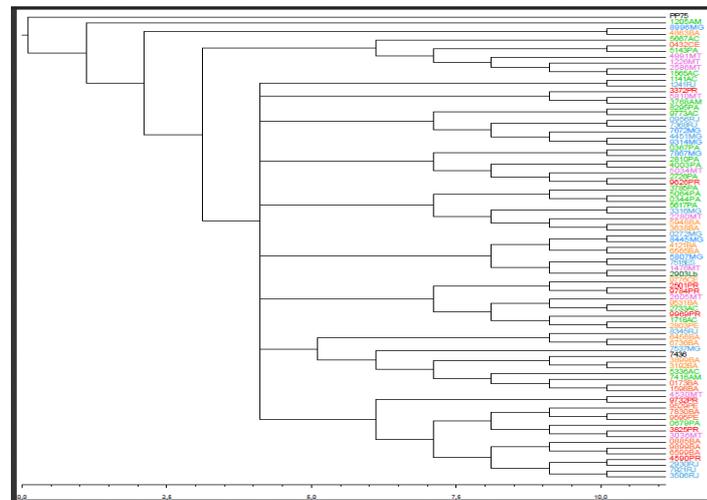
**Figura 20:** Dendrograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa os Biomas.



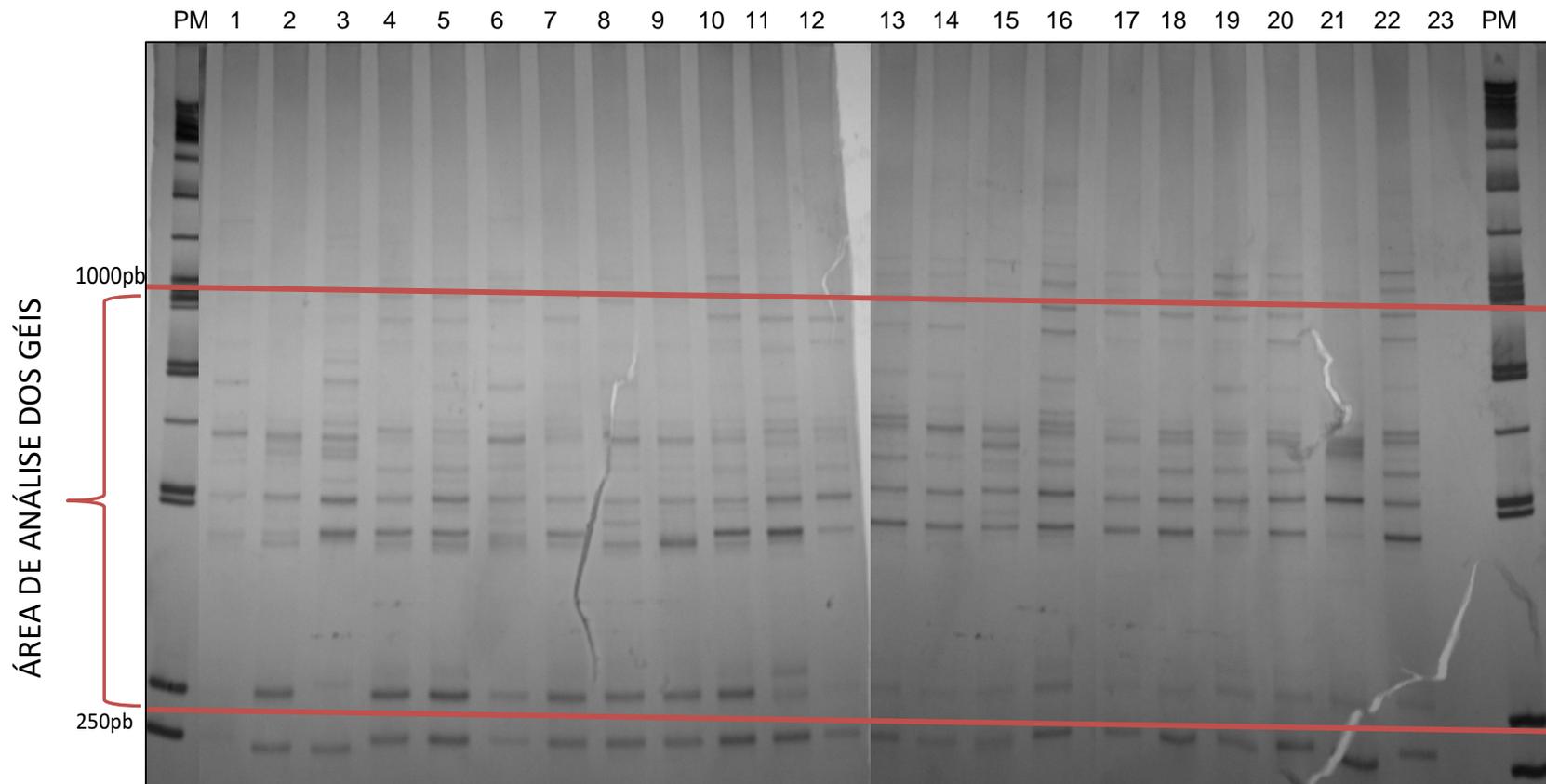
**Figura 21** Dendrograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa os Biomas.



**Figura 22:** Dendrograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa as regiões.



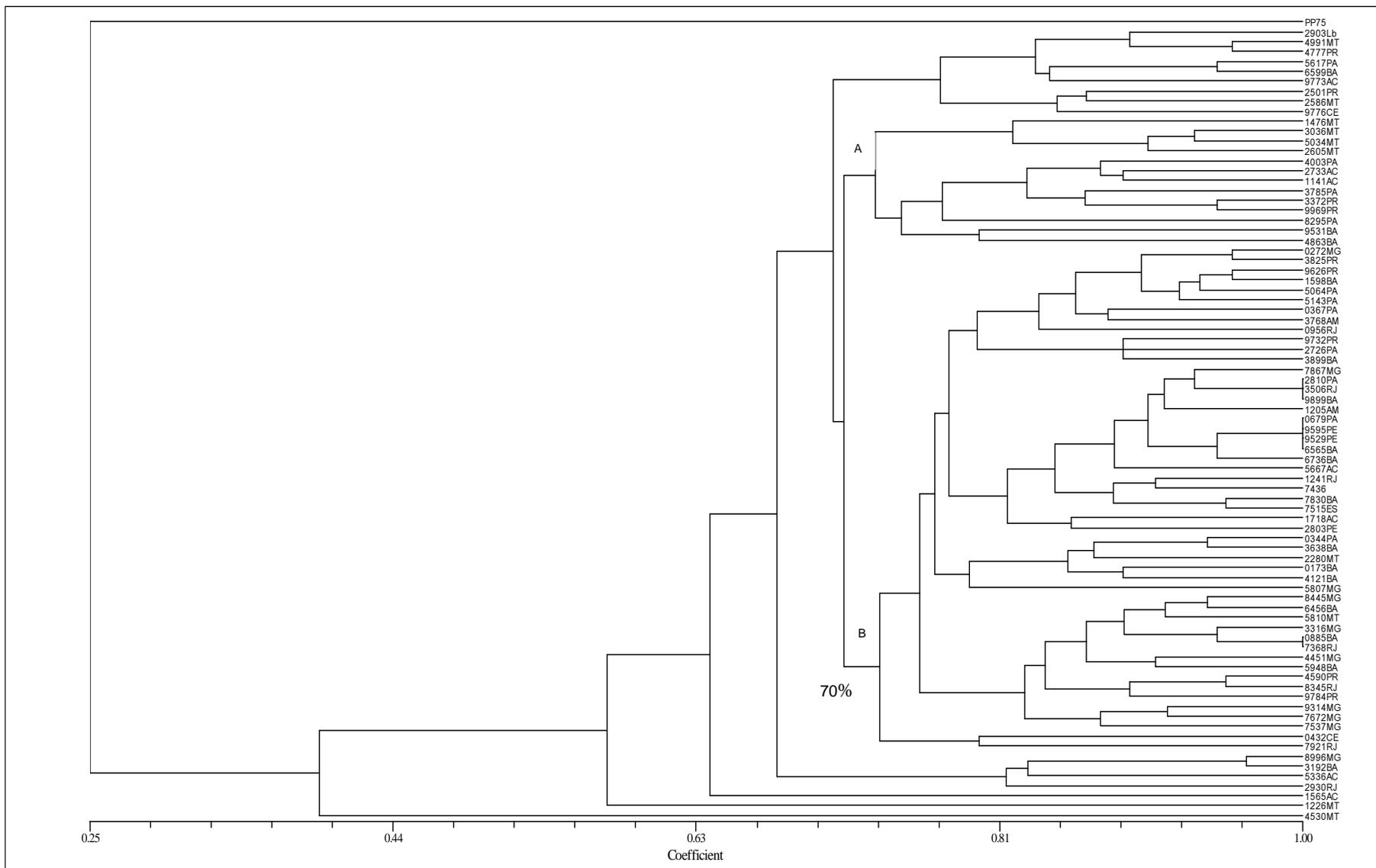
**Figura 23:** Dendrograma, gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador CARY, o agrupamento das cores representa as regiões



**Figura 24:** Perfil obtido das amostras estudadas pela técnica de SSR para o iniciador K7, aplicados em gel de poliacrilamida a 5% e corado pela prata

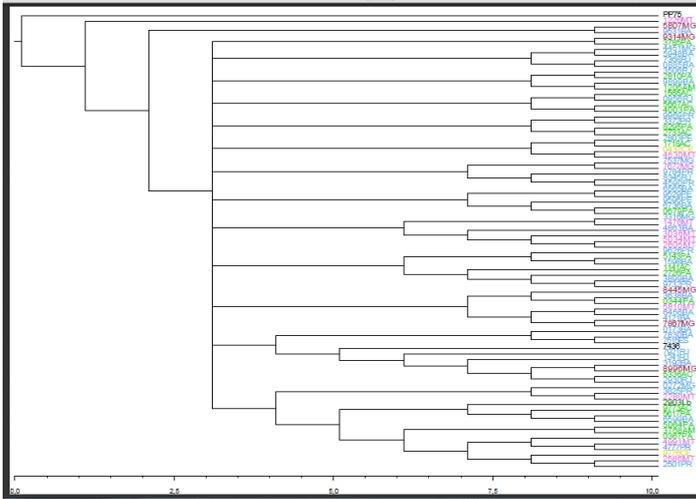
**Canaletas:** PM: peso molecular de 1Kb da PROMEGA,

**Amostras:** 1. referência de *L.braziliensis*(M2903); 2 a 22 amostras de *L.braziliensis* ; 23. controle negativo .

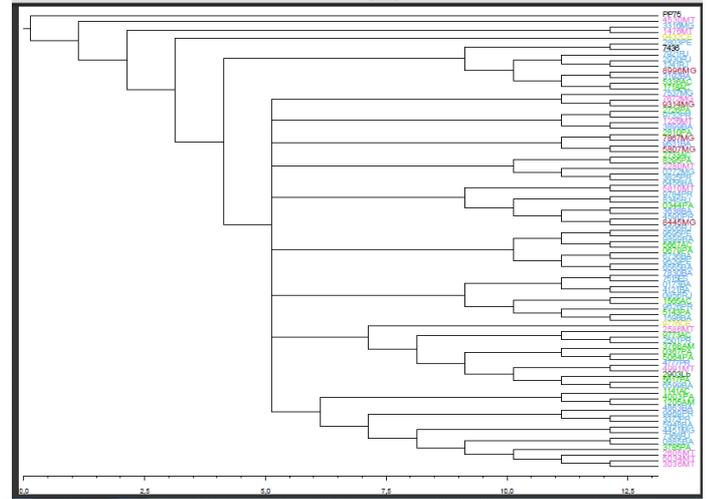


**Figura 25:** Dendrograma gerado pelo método UPGMA programa NTSYS, pela técnica de SSR com o iniciador K7

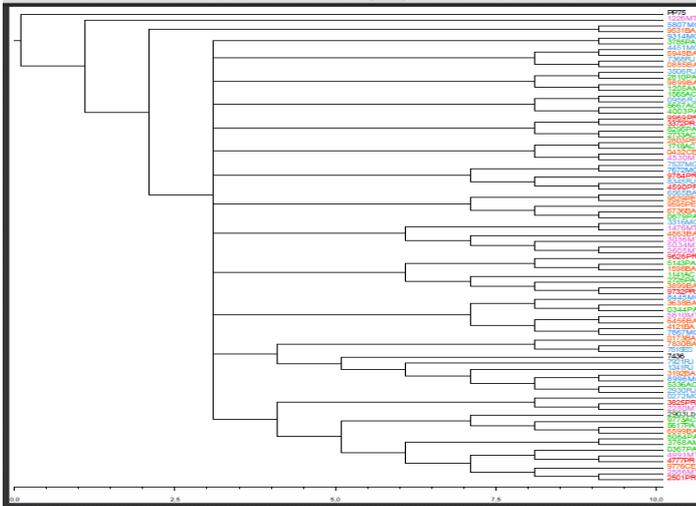
## Resultados



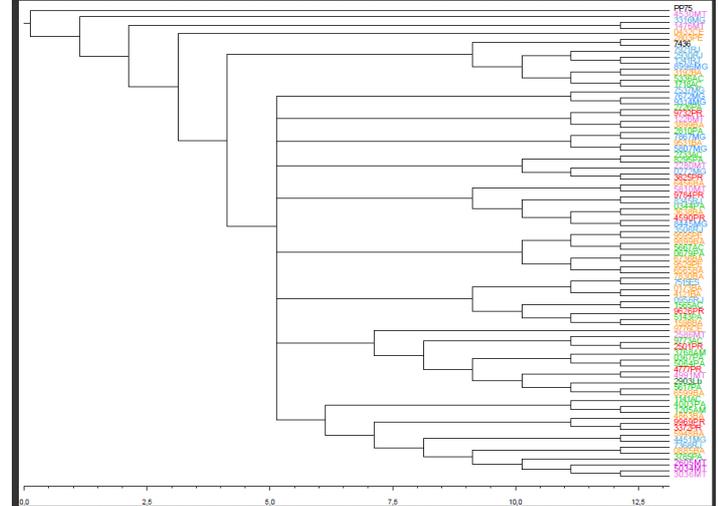
**Figura 26:** Dendrograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador K7, agrupamento das cores representa os Biomas



**Figura 27:** Dendrograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador K7, o agrupamento das cores representa os Biomas



**Figura 28:** Dendrograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa MIX, pela técnica de SSR com o iniciador K7, o agrupamento das cores representa as regiões



**Figura 29:** Dendrograma gerado pelo método de Parcimônia pelo programa Dollop, pela técnica de SSR com o iniciador K7, o agrupamento das cores representa as regiões

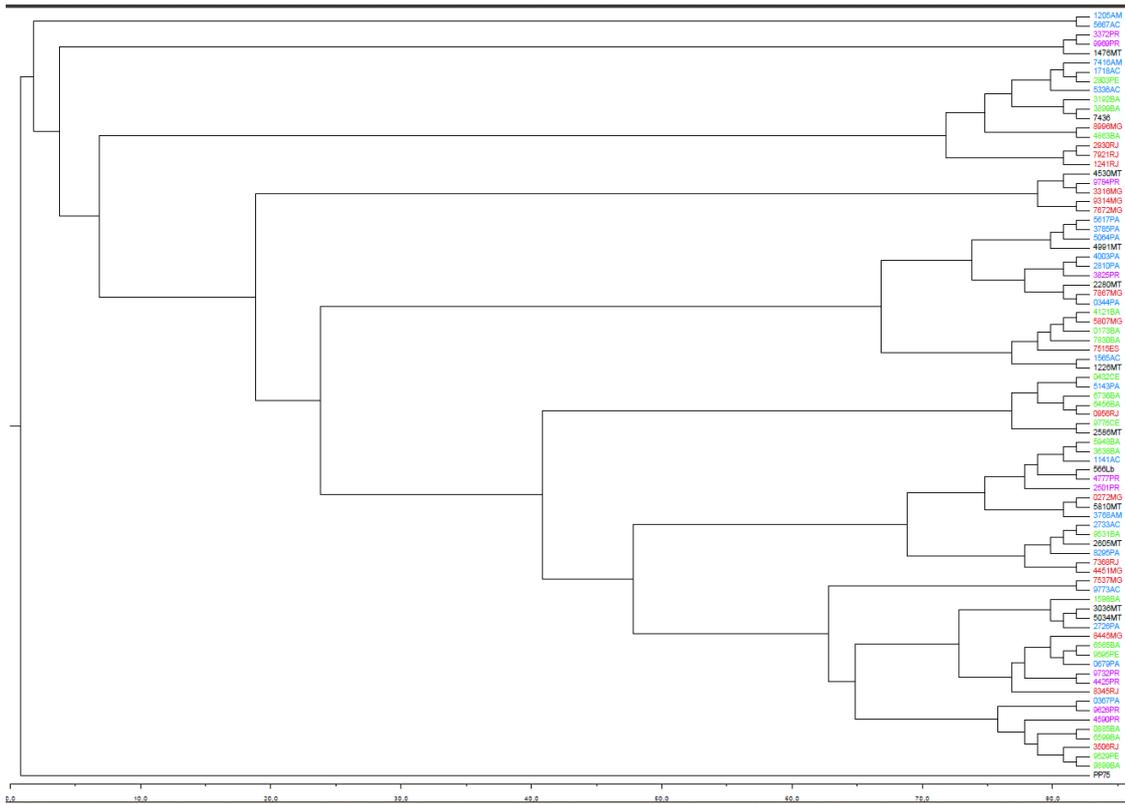


Figura 30: Árvore consenso gerada pelo programa Dollop com dados concatenados.

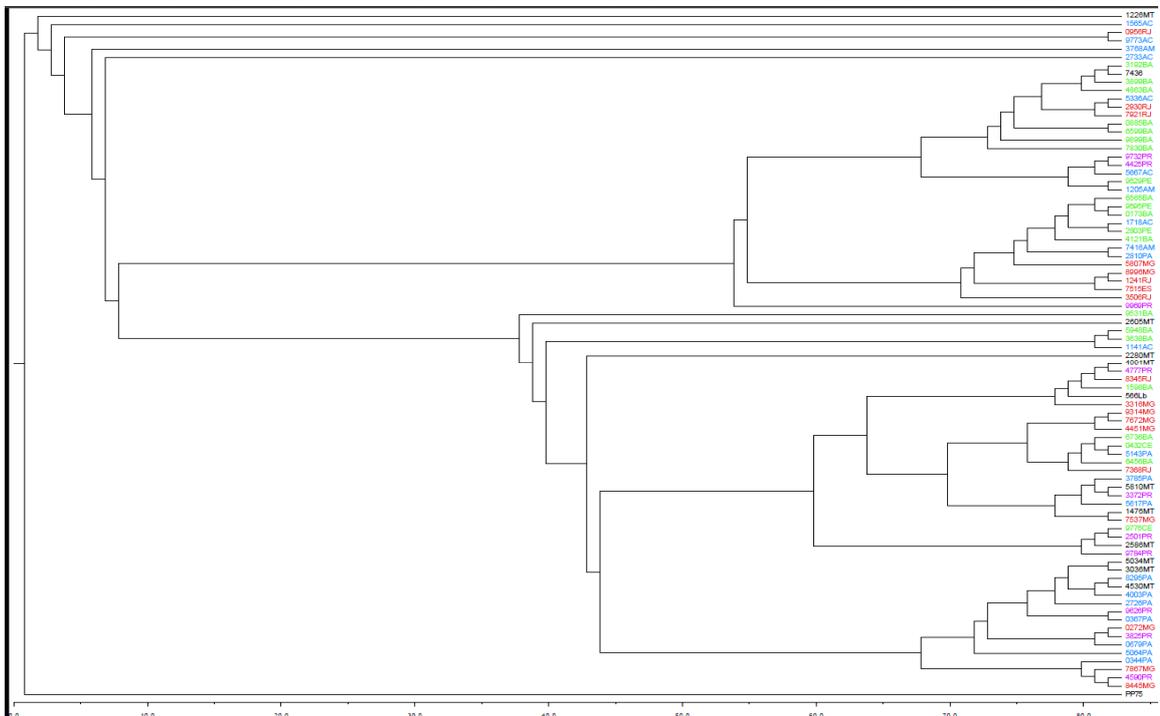


Figura 31: Árvore consenso gerada pelo programa Mix com dados concatenados.

## **5.4 PCR-RFLP**

### **5.4.1 Amplificação da região ITS-1 de rDNA**

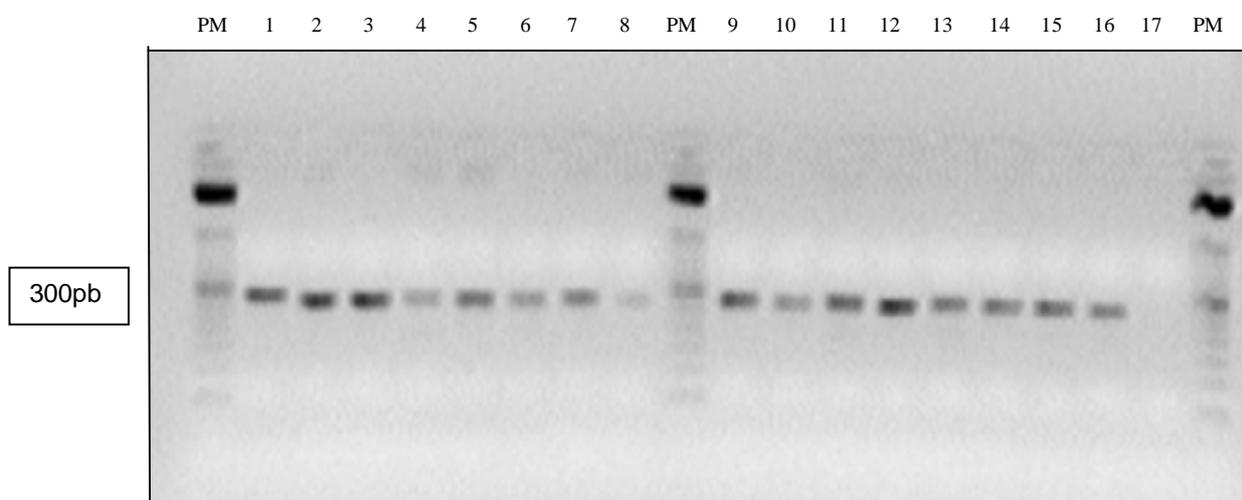
A amplificação da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal (ITS-1-rDNA) gerou fragmentos de aproximadamente 300 pares de bases para todas as amostras utilizadas (figura 32).

#### **5.4.1.1 Produção de perfis de restrição (RFLPs) da região ITS-1 rDNA**

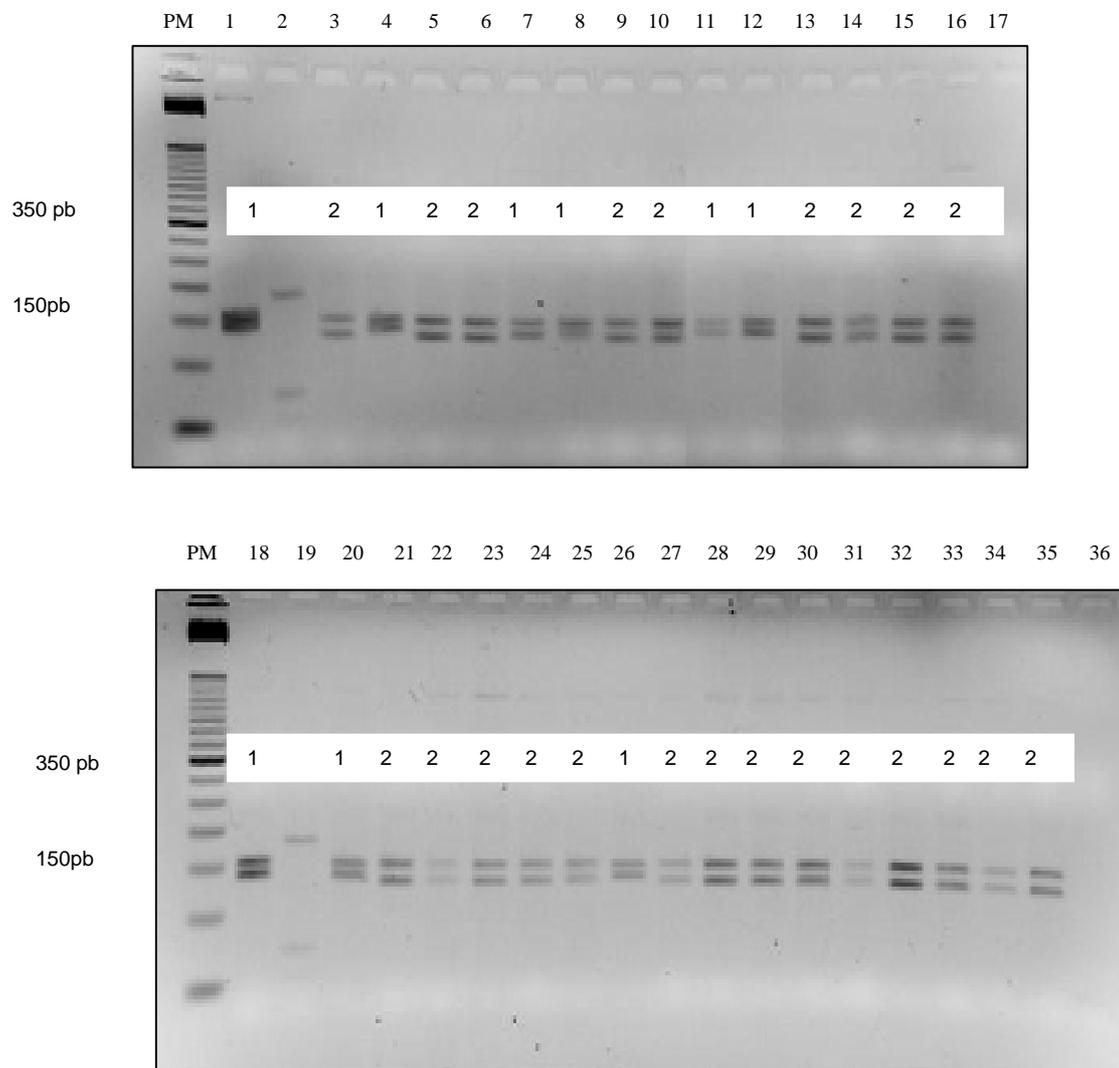
Os fragmentos amplificados por PCR da região espaçadora transcrita interna 1 (ITS1) de 79 amostras foram cortadas com a enzima de restrição HAEIII (não amplificando somente a amostra 0173BA) e 76 amostras foram cortadas com a enzima BstUI (não amplificando as amostras 0173BA, 4777PR, 5617PA, 4451MG) gerando perfis de RFLP.

A figura 33 mostra o perfil das bandas dos produtos do ITS1-HAEIII de algumas amostras estudadas, aplicados em gel de agarose a 2% e corado por brometo de etídeo. Foram encontrados dois perfis para ITS1- HAEIII, estes perfis estão mostrados na figura 33 com os números 1 e 2. Na figura 34 as amostras estão agrupadas por biomas, sendo que 64% das amostras apresentou o perfil 2. A maioria das amostras da região Norte (76%), que pertencem ao mesmo bioma (Amazônia), juntamente com as amostras do bioma Caatinga (100%) apresentaram o perfil 1. As amostras do Cerrado (100%), que incluem as amostras da região Centro-Oeste e algumas amostras da região Sudeste, além da maioria das amostras provenientes da Mata Atlântica (72%), que englobam amostras da região Sudeste(75%) e região Sul (100%) apresentaram o perfil 2.

A figura 35 mostra o perfil das bandas dos produtos do ITS1- BstUI de algumas amostras estudadas, aplicados em gel de agarose a 2% e corado por brometo de etídeo. Para ITS1-BstUI foi observado somente um perfil, igual para todas as amostras estudadas.



**Figura 32:** Gel de agarose mostrando a amplificação da região ITS-1 rDNA  
Canaletas de 2 a 16: amostras de *L.braziliensis*, 1 : referência de *L.braziliensis*(M2903), 17: controle negativo da reação



**Figura 33:** Perfil de ITS1 - HAEIII, Canaletas de 3 a 16 e 20 a 35: amostras de *L.braziliensis*, 1 e 18: referência de *L.braziliensis*(M2903), 2 e 19: referência de *L.chagasi*(PP75), 17 e 36: controle negativo da reação

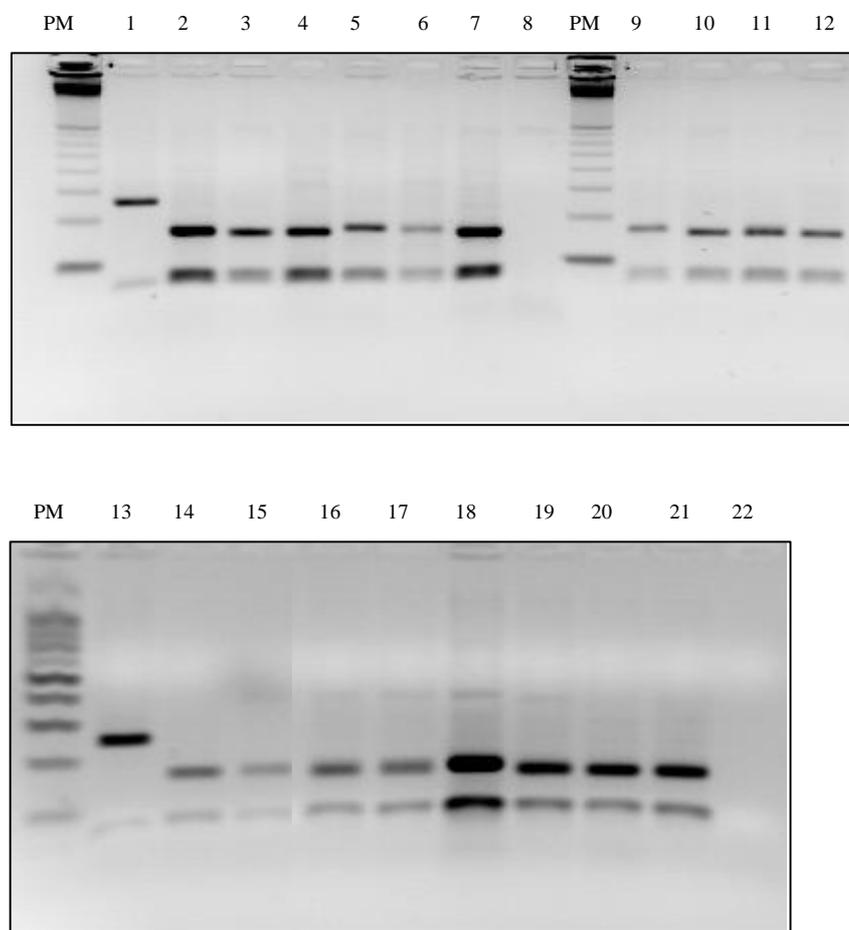
Perfil 1 (2903)		Perfil 2	
2733AC	6456BA	1565AC	5948BA
1718AC	2803PE	1141AC	1598BA
5336AC	0885BA	0367PA	6599BA
9773AC	4121BA	3785PA	9899BA
5667AC	6736BA	8295PA	6565BA
1205AM	7921RJ	3899BA	9595PE
7416AM	3316MG	7830BA	9529PE
3768AM	0272MG	3192BA	3372PR
0344PA	3638BA	7867MG	4425PR
4003PA	9531BA	9314MG	9626PR
0679PA	4863BA	5807MG	9969PR
5064PA	0432CE	8445MG	4590PR
5617PA	9776CE	8996MG	9732PR
2726PA		5810MT	3825PR
5143PA		1476MT	4777PR
2810PA		2280MT	2501PR
		3036MT	9784PR
		5034MT	7515ES
		2605MT	0956RJ
		4991MT	8345RJ
		2586MT	1241RJ
		4530MT	2930RJ
		1226MT	3506RJ
		7672MG	7368RJ
			4451MG
			7537MG

**Figura 34:** Perfil 1 e 2 das amostras para ITS1-HAEIII em relação ao bioma e região geográfica.



BIOMAS (cor do fundo)

REGIÕES (cor das letras)



**Figura 35:** ITS1 - BstUI, Canaletas de 3 a 7, 9 a 12 e 15 a 21: amostras de *L.braziliensis*, 2 e 14: referência de *L.braziliensis*(M2903), 1 e 13: referência de *L.chagasi*(PP75), 8 e 22: controle negativo da reação

#### 5.4.2 Amplificação de *hsp70*

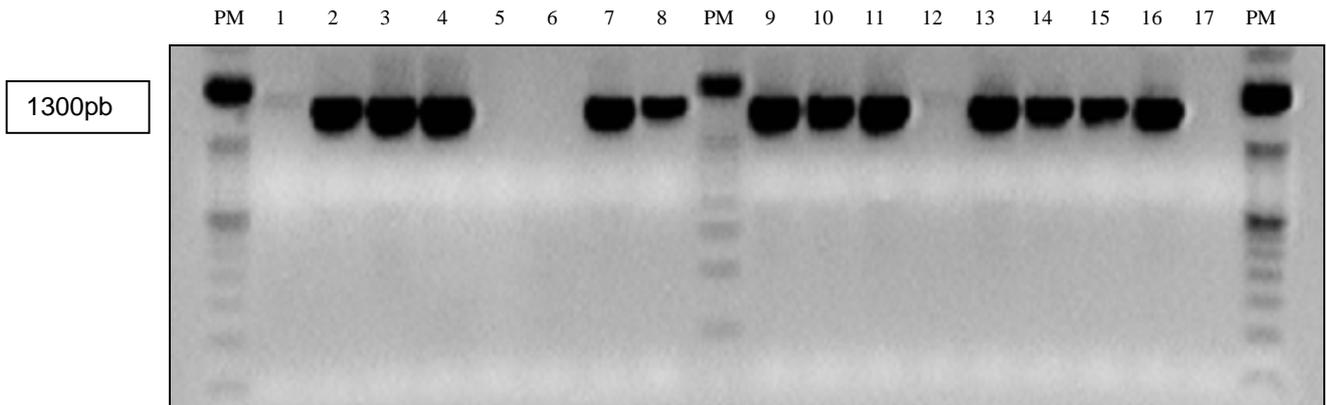
A amplificação da região *hsp70* gerou fragmentos de aproximadamente 1300 pares de bases para todas as amostras utilizadas (figura 36).

##### 5.4.2.1 Produção de perfis de restrição (RFLPs) da região *hsp70*

Os fragmentos provenientes de 62 amostras gerados pela amplificação da região do gene *hsp70*, foram cortados pela enzima de restrição HAEIII (não cortando as amostras 5810MT, 2280MT, 4451MG, 7537MG, 9531BA, 3638BA, 1598BA, 8345RJ, 5143PA, 0173BA, 7921RJ, 7830BA, 6456BA, 7515ES, 9969PR, 2930RJ, 5336AC, 5807MG) e de 70 amostras os amplicons foram cortados com a enzima BstUI (não amplificando as amostras, 3638BA, 9969PR, 2930RJ, 5336AC, 9529PE, 9595PE, 7537MG, 8996MG, 5807MG e 7368RJ).

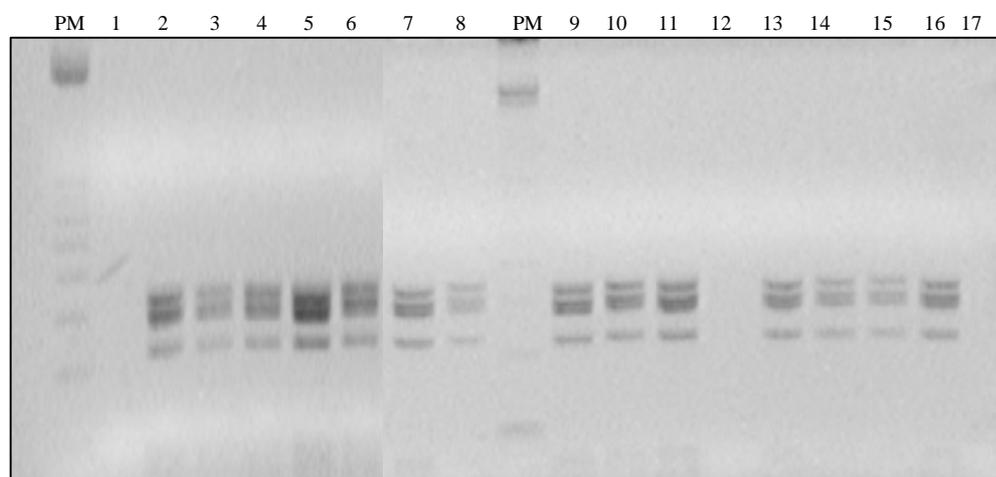
A figura 37 mostra o perfil das bandas dos produtos do *hsp70* - HAEIII de algumas amostras estudadas, aplicados em gel de agarose a 2% e corado por brometo de etídeo. O perfil observado foi o mesmo para todas as amostras.

A figura 38 mostra os perfís das bandas dos produtos do *hsp70* - BstUI de algumas amostras estudadas, aplicados em gel de agarose a 2% e corado por brometo de etídeo. Após a análise dos géis foram identificados três perfis (numerados 1,2 e 3 na figura 38) para *hsp70*-BstUI. A maioria das amostras (49%) apresentou o perfil 1, 35% o perfil 2 e 16% o perfil 3. Agrupando-se as amostras por bioma (figura 39), a maioria das amostras provenientes do bioma Amazônia (65%), que corresponde a região Norte, apresentou o perfil 1. 48,5% das amostras originárias do bioma Mata Atlântica (a maioria correspondendo a região Nordeste) e 100% do bioma Caatinga também apresentou o perfil 1. Mais da metade (73%) das amostras autóctones do Cerrado (região Centro-Oeste) apresentaram o perfil 2.

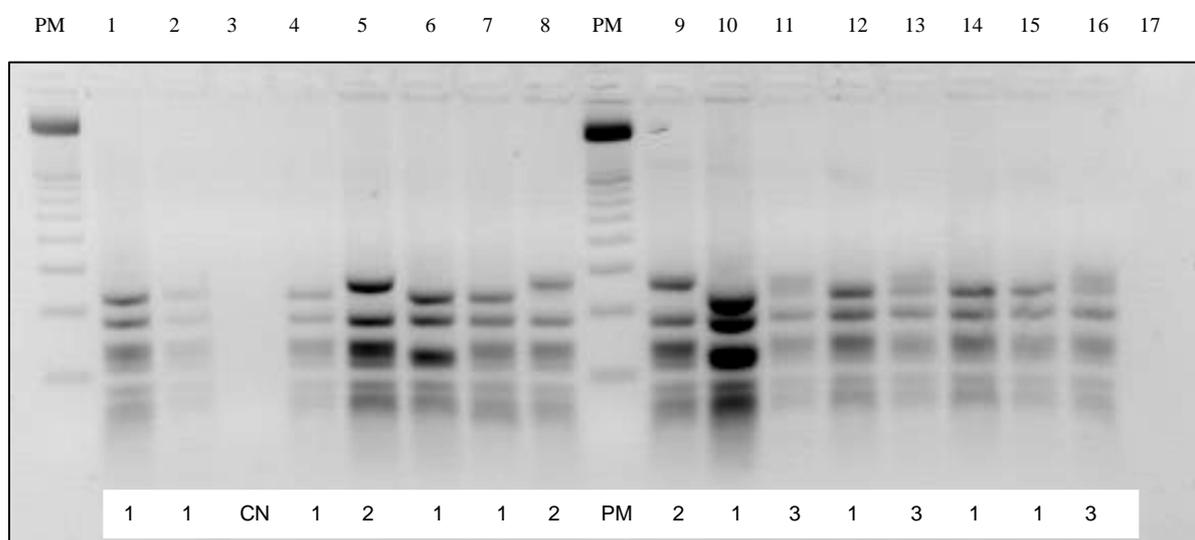


**Figura 36:** Gel de agarose mostrando a amplificação da região *hsp70*

Canaletas de 2 a 16: amostras de *L.braziliensis*, 1: referência de *L.braziliensis*(M2903), 17: controle negativo da reação



**Figura 37:** Gel de agarose de *hsp70* - HAEIII, Canaletas de 3 a 16: amostras de *L. braziliensis*, 2: referência de *L. braziliensis*(M2903), 17: controle negativo da reação



**Figura 38:** Gel de agarose de *hsp70* - BstUI, Canaletas de 2, 4 a 16: amostras de *L.braziliensis*, 1: referência de *L.braziliensis*(M2903), 3 e 17: controle negativo da reação

Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3
2733AC	1718AC	0344PA
1565AC	1141AC	2726PA
9773AC	3768AM	5948BA
5667AC	5064PA	4590PR
1205AM	8295PA	3835PR
7416AM	1598BA	3372PR
0679PA	6456BA	9732PR
3785PA	6736BA	0956RJ
5617PA	4863BA	9314MG
2810PA	0173BA	8445MG
5143PA	4451MG	7867MG
0367PA	3506RJ	
4003PA	8345RJ	
6599BA	1241RJ	
9899BA	9626PR	
0885BA	2501PR	
4121BA	7672MG	
6565BA	4991MT	
2803PE	3036MT	
3899BA	1476MT	
3192BA	5034MT	
9531BA	1226MT	
7830BA	2280MT	
9776CE	5810MT	
0432CE		
7921RJ		
0272MG		
3316MG		
7515ES		
4425PR		
4777PR		
9784PR		
2586MT		
4530MT		
2605MT		

**BIOMAS/Cor de Fundo**

- Amazônia
- Mata Atlântica
- Caatinga
- Cerrado
- Cerrado e Mata Atlântica

**REGIÃO/Cor das letras**

- Norte
- Nordeste
- Centro Oeste
- Sudeste
- Sul

**Figura 39:** Perfis 1, 2 e 3 das amostras para *hsp70*-BstUI.

Agrupamento relativo ao bioma de cada localidade (cor do fundo) e por região geográfica (cor das letras).

Como resumo dos resultados, podemos observar que índice de similaridade entre as amostras encontrados para os testes de isoenzimas (média = 78%), RAPD-PCR com o iniciador M1340 (70%), SSR-PCR com o iniciador CARY(74%) e K7(70%) foi de 70% ou mais. Isto demonstra a existência de variabilidade de *L. braziliensis* confirmada através das diferentes técnicas utilizadas. Além disto, a maioria das amostras do bioma Amazonas, região Norte e bioma Caatinga estão sempre juntos num mesmo perfil e o bioma Cerrado em outro perfil, nas diferentes técnicas utilizadas (Quadro 6).

**Quadro 6.** Resumo da distribuição das amostras por biomas e regiões com diferentes marcadores moleculares

RAPD (iniciador M1340F)		SSS-PCR (iniciador k7)		PCR-RFLP de ITS-1		PCR-RFLP de <i>hsp70</i>	
Bioma	Região	Bioma	Região	Bioma	Região	Bioma	Região
Amazônia (67%) Caatinga (100%) Mata Atlântica (62%)	Norte (67%) Nordeste (90%) Sudeste (50%)	Amazônia (67%) Caatinga (100%) Mata Atlântica (88%)	Norte (67%) Nordeste (87%) Sudeste (94%)	Amazônia (67%) Caatinga (100%)	Norte (67%) Nordeste (50%)	Amazônia (65%) Caatinga (100%) Mata Atlântica (50%)	Norte (65%) Nordeste (67%) Sudeste (33%)
Cerrado (80%) Cerrado e Mata Atlântica (67%)	Centro-Oeste (78%) Sudeste (50%) Sul (90%)	Cerrado (80%)	Centro-Oeste (80%)	Cerrado (100%) Mata Atlântica (72%)	Centro-Oeste (100%) Sudeste (75%) Sul (100%)	Cerrado (73%) Mata Atlântica (32%)	Centro-Oeste (73%) Nordeste (28%) Sudeste (33%)
-	-	-	-	-	-	Cerrado e Mata Atlântica (100%) Mata Atlântica (18%)	Nordeste (5%) Sudeste (33%)

## *6. Discussão*

## **6. Discussão**

A LTA no Brasil tem expandido seus ecótopos naturais devido às ações deletérias do homem no meio ambiente o que amplia sua exposição aos vetores. É uma doença que se encontra em intenso processo de expansão e urbanização o que tem dificultado o seu controle. No início da década de 80, casos de LTA eram registrados em 20 unidades federativas. Atualmente, encontra-se distribuída em todos os estados brasileiros. Uma média anual de cerca 26.000 casos novos de LTA tem sido registrados nos últimos anos (SINAN/SVS/MS, abril, 2010), sendo que em 2009 foram registrados 21.824 novos casos no Brasil (SINAN/SVS/MS, outubro, 2010).

A região Norte apresenta a maioria dos casos de LT do país (40%) seguida da região Nordeste com 32% dos casos. A região Centro-Oeste tem contribuído com 15% dos casos, o Sudeste com 10% e a região Sul com apenas 3% (SVS/MS, 2010).

A LTA constitui um grave problema de saúde pública, causando impacto social e econômico nas populações acometidas. Apresenta altas taxas de morbidade sendo uma doença que causa prejuízos físicos e psicológicos para o portador e interfere na economia das comunidades. A falta do tratamento adequado pode levar ao aparecimento da forma mucocutânea desfigurante.

As leishmanioses tegumentares apresentam uma grande variedade de agentes etiológicos relacionados a diversas espécies vetoras e reservatórios encontrados nas diferentes regiões. Estas regiões apresentam características ambientais, de flora e de fauna diversificadas (vetores e reservatórios) e estão inseridas em biomas característicos. As modificações nos ecótopos naturais induzem alterações na ecoepidemiologia da LTA com o surgimento de novas situações epidemiológicas.

Diferentes mecanismos evolucionários como, migração, seleção e deriva genética tem importante papel na distribuição genética em populações naturais, mas a reprodução é o processo biológico fundamental que influencia a estrutura genética das populações. A identificação do sistema reprodutivo é essencial nas populações naturais, pois ele governa as condições de estabilidade dos genótipos no tempo e no espaço. Tibayrenc et al. (1990) propuseram o modelo clonal de reprodução para *Leishmania* e esta questão tem sido objeto de debate desde então. Atualmente, a hipótese mais aceita é que *Leishmania* tem estrutura populacional clonal com a ocorrência de troca genética que não é suficientemente freqüente para alterar a propagação de clones estáveis no tempo e no espaço. Esta evolução clonal confere ao parasito a capacidade de se difundir através dos hospedeiros/reservatórios e vetores, interagindo com as situações presentes nas diferentes regiões e biomas. A expansão clonal de determinada população de *Leishmania* e seu estabelecimento em uma área estaria então promovendo a diversidade destes parasitos. Entretanto, o que é importante ressaltar é a grande plasticidade observada nestes parasitos, bem como sua habilidade em se adaptar a alterações nas condições ecológicas e a possível relação evolucionária entre estes organismos e seus vetores como já observado no Velho Mundo (Ready, 2000).

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

No Brasil sete espécies de *Leishmania* são agentes etiológicos de LT e diferentes manifestações clínicas podem ser encontradas como úlceras cutâneas e mucosas, forma disseminada e difusa da doença, dependendo da espécie envolvida. A maioria destas espécies são pertencentes ao subgênero *Viannia* que representa um grupo diverso de microorganismos mostrando considerável

variabilidade intraespecífica o que dificulta a classificação taxonômica e consequentemente as inferências epidemiológicas a cerca destes parasitos.

A grande diversidade de espécies neotropicais que compõem o gênero *Leishmania* tem sugerido que estes parasitos se originaram nas Américas e que a dispersão do gênero *Leishmania* para o Velho Mundo se deu pelo Estreito de Bering (Noyes et al. 1997). Lukes et al. (2007) concordam com esta hipótese e postulam a introdução de um parasito ancestral de *Leishmania* na Ásia e a dispersão de linhagens para as regiões central e sudeste do continente onde uma grande diversificação tomou lugar com o surgimento de várias espécies como a *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. turanica* e as espécies do complexo *L. donovani*. A *L. infantum* provavelmente se separou mais cedo do complexo *L. donovani* que invadiu a Índia e África. Fechando o ciclo a aproximadamente 500 anos atrás cepas de *L. infantum* pertencentes ao zimodema MON-1, oriundas da região do Mediterrâneo, se transferiram para a América do Sul. O parasito teria entrado no Novo Mundo através dos colonizadores europeus.

Para Lainson (2010) não só a evolução de *L. donovani* e *L. infantum* se deu no Velho Mundo como também a evolução de membros do complexo *L.(L.) tropica*. Entretanto, ele destaca que outro processo evolucionário poderia ter acontecido no Novo Mundo. A partir de um parasito ancestral comum ocorreu a diferenciação de uma linhagem viscerotrópica, dando origem a *L. chagasi* e as espécies dermatotrópicas do subgênero *Leishmania*. Ao mesmo tempo outra linhagem ancestral divergiu para formar o subgênero *Viannia*, só presente no Novo Mundo, onde seus membros retêm a característica primitiva de desenvolvimento no intestino posterior do flebotomíneo.

A diversidade genética no subgênero *L. (Viannia)* já foi apontada por vários autores (Cupollilo et al., 1997, 2003) e pode estar relacionada com a antiguidade destes parasitos nas Américas. A *L. braziliensis* é a representante deste

subgênero mais prevalente nas infecções humanas sendo o conhecimento de sua biologia e a caracterização genética importantes para a compreensão da interação parasito/hospedeiro.

A infecção pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* pode levar ao aparecimento de diferentes formas clínicas como a leishmaniose cutânea (podendo ocorrer cura espontânea), leishmaniose mucosa (com úlcera invasiva nas mucosas oral e nasal) e leishmaniose cutânea disseminada. Estas diferentes manifestações podem estar relacionadas a características do parasito, a imunidade do hospedeiro como também as diferentes condições encontradas em cada foco de transmissão do parasito.

A *Leishmania braziliensis* tem sido associada a uma variedade de espécies de flebotomíneos adaptadas ao peridomicílio, a animais domésticos e a vários reservatórios presentes nos diferentes ambientes de transmissão. Estes reservatórios não estão ainda bem identificados, alguns roedores como *Necromys lasiurus* (Brandão-Filho et al., 2003), *Cerradomys subflavus* (Oliveira et al., 2005), *Rattus rattus* (Alencar et al., 1960; Brandão-Filho et al., 2003; Oliveira et al., 2005) e alguns animais domésticos já foram encontrados naturalmente infectados por *L. braziliensis* (Brazil et al., 1987; Passos et al., 1996).

Devido a sua importância epidemiológica e em saúde pública esta espécie foi o alvo deste estudo.

Apesar desta importância no cenário da saúde pública no Brasil, poucos estudos relacionados a variabilidade e características dos parasitos em relação aos diferentes focos foram realizados. A caracterização genética dos parasitos permite, numa abordagem epidemiológica, a identificação das cepas circulantes em determinada região, permite ainda uma abordagem taxonômica com a caracterização de espécies e subespécies e uma abordagem filogenética através da correlação genética entre as espécies e os grupos.

A única maneira de se detectar a verdadeira diversidade genética de um organismo é através do seqüenciamento completo do genoma de diferentes isolados de populações naturais. Como o seqüenciamento de todo o genoma de populações de *Leishmania* ainda não é possível, nas últimas décadas vários métodos moleculares tem sido desenvolvidos e utilizados para se explorar a diversidade genética nestas populações.

Assim, nosso estudo utilizou um número representativo de amostras de *L. braziliensis* provenientes de diferentes focos de todas as regiões e biomas do Brasil, que foram avaliadas com a utilização de diferentes métodos. Todas as 80 amostras utilizadas foram isoladas de lesões de pacientes com a forma cutânea da doença e os métodos empregados foram: eletroforese de isoenzimas (MLEE), RAPD-PCR, SSR-PCR e PCR - RFLP para os alvos de ITS1 e *hsp70*.

A escolha destas técnicas se baseou em dados da literatura que mostraram aplicabilidade das mesmas aos nossos objetivos. A diversidade genotípica de várias espécies de tripanosomátideos tem sido muito estudada através das técnicas de RAPD (Zemanová et al., 2004; Schriefer et al., 2004) e SSR (Gontijo, 2000; ). A técnica de PCR-RFLP direcionada para a região do ITS-1rDNA também tem sido utilizada para estudos da variabilidade em *Leishmania* (Falqueto et al., 2003; Cupolillo et al., 2003; Brito et al., 2009).

As diferentes espécies de *Leishmania* são indistinguíveis morfologicamente, mas tem sido identificadas por diferentes métodos moleculares e bioquímicos, predominantemente por eletroforese de isoenzimas. A eletroforese de isoenzimas ainda hoje, é considerada o padrão ouro na identificação das espécies de *Leishmania*. Informações taxonômicas importantes podem ser obtidas pela análise numérica das bandas eletroforéticas. A difusão do uso de isoenzimas ocorreu através do desenvolvimento de métodos eficientes para a visualização do produto enzimático e da aplicabilidade imediata encontrada em várias áreas da biologia. Estudos clássicos de genética de populações tiveram um efeito significativo na

disseminação da técnica de análise isoenzimática, a qual tem sido aplicada em um grande número de organismos com o objetivo de responder às mais diversas questões genéticas.

Cupolillo (1994) utilizando um painel de isoenzimas para várias amostras de *Leishmania* observou a separação das espécies do subgênero *Viannia* das espécies do subgênero *Leishmania*. Posteriormente, alguns trabalhos demonstraram polimorfismos genéticos de *L. braziliensis* originárias de diferentes hospedeiros e regiões geográficas do Novo Mundo utilizando a técnica de isoenzimas (Cupolillo et al., 2003; Castro et al., 2005; Tsukayama, et al., 2009; Brito et al., 2009).

No presente trabalho, as amostras foram analisadas por eletroforese de enzimas utilizando-se seis locos enzimáticos. As amostras já haviam sido identificadas como *L. braziliensis* por diferentes técnicas, entretanto, a análise por isoenzimas foi utilizada para a confirmação desta identificação como também para o estudo de variabilidade genética.

A análise dos dados de isoenzimas das cepas de *L. braziliensis* de diferentes regiões ecológicas do Brasil indicou uma estrutura de população clonal, com alguns zimodemas amplamente distribuídos, como IOC/Z27 (que corresponde a cepa de referência M2903) e outros relacionados a focos específicos com características particulares (Cupolillo et al., 2003).

Em nosso estudo, a maioria (87,3%) das amostras apresentou o perfil de migração idêntico ao da cepa padrão de *L. braziliensis* (M2903), confirmando observações feitas anteriormente que reforçam a teoria do modelo clonal em *Leishmania*.

As dez amostras que apresentaram variabilidade na análise enzimática são provenientes de diferentes regiões e biomas. Entre elas, quatro são da região amazônica, onde já foi observado um alto nível de polimorfismo intraespecífico em estudo realizado por Cupolillo et al. (1998). A diversidade molecular de *L. braziliensis* na Amazônia está aparentemente relacionada ao grande número de

espécies de flebotomíneos vetores e de reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão (Grimadi et al., 1991). Cinco amostras provenientes do bioma Mata Atlântica apresentaram variações em algumas das isoenzimas utilizadas, o que não foi visto para as amostras da Costa Atlântica no trabalho citado acima, porém a diversidade clonal para esta região tem sido reportada em estudos mais recentes (Brandão-Filho et al., 2003; Cupolillo et al., 2003; Brito et al., 2009).

A utilização da eletroforese de enzimas permite determinar as similaridades e diferenças entre os organismos possibilitando o conhecimento das relações genéticas empregadas na identificação e classificação taxonômica de diversos parasitos, porém esta técnica apresenta as desvantagens de ser extremamente laboriosa e da necessidade do isolamento e o crescimento dos parasitos em meio de cultura. Sendo assim outras metodologias tem sido empregadas no estudo da diversidade genética em *Leishmania*.

A técnica de amplificação aleatória de DNAs polimórficos (RAPD) foi utilizada para análise e comparação de polimorfismos de DNA de várias espécies de *Leishmania* (Bañuls et al., 2002; Martinez et al., 2003) incluindo a *L. braziliensis* de diferentes regiões geográficas (Ishikawa et al., 2002; Castro et al., 2005, 2007; Carvalho et al., 2006; Baptista et al., 2009).

Vários iniciadores de RAPD já foram utilizados em estudos com amostras de *L. braziliensis*. A partir de uma análise criteriosa escolhemos o iniciador M1340F por ser o que tem mostrado melhores resultados (Gomes et al., 1995; Ishikawa et al., 2002; Carvalho et al., 2006). Nestes estudos as cepas de mesma origem geográfica foram agrupadas, como por exemplo, no estudo de Ishikawa et al (2002) onde os isolados do Paraná formaram um agrupamento distinto dos isolados do Pará e se mostraram mais homogêneos. Os mesmos resultados foram obtidos quando foram comparados isolados do Pará com amostras de Minas Gerais (Gomes et al., 1995).

Na análise dos perfis gerados por RAPD-PCR com o iniciador M1340F observamos a formação de dois *clusters* com cerca de 70% de similaridade entre os isolados. Com esta técnica foi evidenciada a variabilidade genética intraespecífica nas cepas de *L. braziliensis*. Pudemos notar que a maioria das amostras do Cerrado e da região Centro Oeste e a maioria da região Sul, se agrupou no *cluster* A (M2903) englobando um total de 42% das amostras. A maioria das amostras da região Norte, bioma Amazônia e a região Nordeste incluindo a Caatinga ficaram no *cluster* B. O agrupamento de amostras de *Leishmania braziliensis* por região geográfica utilizando-se a técnica de RAPD vem sendo demonstrado em estudos realizados com isolados originários de diferentes focos de LTA no Brasil (Ishikawa et al., 2002; Carvalho et al., 2006).

A análise de dados gerados pela PCR utilizando-se como iniciadores repetições de seqüência simples (SSR) já foi utilizada em estudos com

*L. braziliensis* (Gontijo, 2000) e foi também empregada em nosso estudo. A análise dos perfis gerados evidenciou que os iniciadores Cary e K7 foram capazes de indicar a ocorrência de diversidade genética nas amostras estudadas.

A maioria das amostras apresentou mais de 90% de similaridade com a cepa padrão (M2903) e cerca de 74% e 70% de similaridade entre elas, quando empregados os iniciadores CARY e K7, respectivamente. Para o iniciador k7 observou-se a formação de dois grupos, o grupo A que incluiu a maioria das amostras do bioma Cerrado (67%) e o grupo B com a maioria das amostras do bioma Amazonas (69%), Caatinga (50%) e Mata Atlântica (88,5%). Somente 15 amostras não puderam ser incluídas em nenhum destes dois grupos.

A técnica de PCR-RFLP direcionada para a região ITS-1 rDNA também foi utilizada em nosso estudo pois em trabalhos recentes ela tem se mostrado útil tanto na identificação de espécies de *Leishmania* quanto em estudos de polimorfismos (El Tai et al., 2001; Berzunza-Cruz et al., 2002; Cupolillo et al., 2003; Falqueto et al., 2003; Garcia et al., 2005).

Alterações nas sequências nucleotídicas do *locus* de ITSrDNA, que é uma região não codificante, não irão refletir na habilidade do organismo em se adaptar a mudanças ecológicas. Entretanto, por causa do alto nível de polimorfismo na composição deste *locus* vários estudos epidemiológicos e moleculares vem sendo realizados empregando esta metodologia (Cupolillo et al., 2003). As análises das regiões ITS para diferentes parasitos tem demonstrado a utilidade deste marcador na detecção de diversidade genética e a associação desta com vários aspectos epidemiológicos (Ninri et al., 2002).

No trabalho de Cupolillo et al (2003) a maioria dos genótipos encontrados eram específicos para algumas áreas geográficas. No presente estudo, foram encontrados dois perfis para as amostras quando utilizamos a PCR/RFLP (ITS1 com HAEIII). A maioria das amostras da região Norte pertencentes ao bioma Amazônia, juntamente com as amostras do bioma Caatinga apresentaram o mesmo perfil. As amostras do Cerrado (que incluem as amostras da região Centro-Oeste e algumas amostras da região Sudeste), além da maioria das amostras provenientes da Mata Atlântica (que englobam amostras da região Sudeste e região Sul) apresentaram o outro perfil. Dois grupos de genótipos de *L. braziliensis* também foram observados por Falqueto et al (2003) estudando amostras de diferentes regiões endêmicas do Espírito Santo. No estudo de Cupolillo et al (2003) isolados da região amazônica, Rio de Janeiro e Pernambuco também ficaram separados em diferentes grupos utilizando-se a PCR-RFPL direcionada a região de ITS1. ().

Durante o processo de transmissão de *Leishmania* do hospedeiro invertebrado para o vertebrado, ocorre o aumento de temperatura e diminuição do pH, o que desencadeia a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, sendo que os parasitos apresentam mecanismos de tolerância (Folgueira et al., 2006). As proteínas HSP70 (proteína contra o choque térmico) protegem as células dos efeitos do calor e outras formas de stress. Como observado em nosso

estudo Silva et al (2010) mostraram a ocorrência de polimorfismos em *L. braziliensis* utilizando a PCR-RFLP, direcionada ao gene *hsp70* empregando a endonuclease de restrição BstUI.

Na análise dos perfis de PCR-RFLP para o gene *hsp70* utilizando a enzima de restrição BstUI foram identificados três perfis que parecem estar relacionados as diferentes regiões geográficas. Cerca de 50% das amostras apresentou o perfil 1 (igual da cepa de referência M2903). Neste perfil está incluída a maioria das amostras proveniente do bioma Amazônia, região Norte, metade das amostras originárias do bioma Mata Atlântica (a maioria correspondendo a região Nordeste) e as duas amostras do bioma Caatinga. Os outros isolados foram distribuídos nos perfis 2 (34%) e 3 (16%), que foi o menos freqüente. Mais da metade das amostras autóctones do Cerrado (região Centro-Oeste) apresentaram o perfil 2 e 100% das amostras do bioma de transição Cerrado/Mata Atlântica foram incluídas no perfil 3.

Para os diferentes testes empregados em nosso estudo observamos que cerca de 40% das amostras apresentou um perfil igual ao da cepa M2903 (originária da região Amazônica), exceto para a análise de isoenzimas com cerca de 87%.

Comparando as amostras com perfil igual a M2930 nas técnicas de PCR-RFLP/ITS1 e PCR-RFLP/*hsp70*, 42% delas eram comuns para os dois testes. Das dez amostras variantes para isoenzimas em relação a cepa M2903, duas também eram variantes para RAPD, PCR-RFLP para ITS1 e *hsp70*. Outras quatro amostras variaram para mais dois testes além da eletroforese de isoenzimas.

Evidências de análises genéticas indicam uma estruturação geográfica para alguns genótipos de *L. braziliensis* (Gomes et al., 1995; Ishikawa et al., 2002;) como demonstrado em nosso trabalho. Entretanto, a correlação entre a posição geográfica e a diversidade genética entre as amostras ou populações de uma mesma espécie tem sido discutida; isto quer dizer que populações mais próximas

geograficamente necessariamente não apresentam uma maior similaridade. Vários fatores podem afetar as características e a distribuição dos genótipos das leishmanias nos diferentes focos, tais como fatores intrínsecos ao genoma do parasito como aqueles relacionados ao meio ambiente (Tibayrenc e Ayala, 1991).

Para se ter uma idéia da consistência da topologia das árvores geradas a partir de dados obtidos com diferentes técnicas é importante, dentre outros aspectos, aplicar mais de um método de análise. Os métodos fenéticos utilizam medidas de distância que consolidam estatisticamente as diferenças entre os caracteres em um número. Uma matriz de distância entre todos os possíveis pares do grupo de estudo é criada e são desenvolvidos fenogramas agrupando aqueles com menor diferença. Já os métodos cladísticos calculam árvores para cada caráter e indicam como a melhor aquela que requer menor número de mudanças (parcimônia) ou aquela mais provável estatisticamente (máxima verossimilhança).

Escolhemos os métodos de distância genética – UPGMA (fenético) e parcimônia (cladístico) para serem aplicados aos nossos dados.

UPGMA é o método mais simples e mais utilizado na construção de árvores filogenéticas a partir de dados de distância genética. Ele emprega um algoritmo seqüencial no qual as relações são identificadas em relação a similaridade. Entre todas as unidades estudadas aquelas duas mais similares são identificadas e passam a ser analisadas como uma unidade em relação as outras. Subsequentemente, do resto do grupo identifica-se outra unidade com maior similaridade, e assim por diante. É construída uma matriz de distância e a partir dela é gerada a árvore fenética.

O método de parcimônia é baseado no estado de caráter que infere a árvore filogenética minimizando o número total de passos para explicar um conjunto de dados. Os passos podem constituir na substituição de base do DNA numa seqüência ou perda de um sítio de restrição.

Os dois métodos apresentam limitações sendo a principal em relação aos métodos baseados em distância que não usam os dados originais e sim aqueles derivados das matrizes de distância. Apesar do método de parcimônia usar os dados originais geralmente é utilizada apenas uma fração deles (os sítios informativos).

Somente quando métodos bem diferentes (fenético e cladístico, por exemplo) produzem árvores com topologias similares é que os resultados podem ser considerados confiáveis.

A melhor análise dos dados gerados pelas técnicas de RAPD-PCR e SSR-PCR foi a baseada na distância genética utilizando o método UPGMA (coeficiente de DICE) realizada com o pacote de programas NTSYS. Nesta análise foi possível a separação das amostras em grupos representativos que apresentaram relação com a origem geográfica. Quando utilizamos o método de parcimônia somente na análise da topologia do fenograma dos dados concatenados gerado pelo programa Mix é que observamos a formação de dois grupos onde a maioria das amostras do bioma Amazônia/região Norte (58%) e região Nordeste (62%) está agrupada em um *cluster* e o bioma Cerrado/região Centro-Oeste (100%), Cerrado e Mata Atlântica (67%) e a região Sul (80%) estão em outro *cluster*. Estas observações estão de acordo com a análise realizada com o método de distância genética utilizando o programa NTSYS para os testes de RAPD-PCR e SSR-PCR com o iniciador k7, onde observou-se uma tendência para a formação de agrupamentos geográficos: *i*) amostras da região Norte (bioma Amazônia) e região Nordeste (bioma Caatinga), *ii*) amostras da região Centro-Oeste (bioma Cerrado) e *iii*) nas regiões que apresentam o bioma Mata Atlântica, os perfis das amostras encontram-se divididos seguindo o seguinte padrão: a maioria das amostras provenientes do Nordeste agrupam com o bioma Amazônia/região Norte e a maioria da região Sul/Sudeste agrupam ao bioma Cerrado/região Centro Oeste. Estes agrupamentos também foram observados para os testes de PCR-RFLP/ITS1 e PCR-RFLP/hsp70 (não analisados através destas árvores).

Os ciclos de transmissão das leishmanioses são específicos, variando conforme as interações com o ambiente, a presença de diferentes vetores, hospedeiros e reservatórios, e conseqüentemente com o bioma onde o ciclo se processa. São seis os biomas continentais do território brasileiro: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa, cada um com suas características próprias.

Existem algumas hipóteses para a origem e expansão da leishmanose tegumentar no Brasil (revisão, Vale e Furtado, 2005). Alguns relatos apontam a presença da doença há muitos anos no Brasil (Rabello, 1925). A obra literária *Pastoral Religioso-Político Geographico*, editada em 1827, descreve a viagem de um missionário pela região amazônica, que observara a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas a picadas de insetos, tendo como consequência lesões destrutivas de boca e nariz.

Com a descrição do 'botão da Bahia' e sua filiação ao 'botão do Oriente', surgia a primeira teoria da origem '**mediterrânea**' da LTA, que aponta que a doença teria sido importada durante as viagens de fenícios ou sírios ao Nordeste brasileiro ainda na antiguidade (Moreira, 1906), embora essas viagens nunca tenham sido comprovadas.

A segunda teoria seria a '**andina**', formulada por Rabello em 1925, a partir dos descobrimentos dos *huacos* peruanos. Embora não aceita por todos os estudiosos do assunto a proposta de Rabello sobre a origem da LTA em territórios frios, nas regiões da Bolívia e do Peru, é a que predomina na literatura biomédica (Altamirano-Enciso et al., 2003). Para Rabello a LTA era endêmica na região amazônica já no início do século XIX, de onde se difundiu para o resto das regiões Norte e Nordeste do país, por meio de migrações humanas iniciadas com o ciclo da borracha. Essa migração deu-se por volta de 1930, quando se iniciou a grande epidemia da LTA (Pessoa, 1948). Outros ciclos posteriores, que também

implicaram mobilidades sociais para o sul da Amazônia, como a construção de estradas (1960- 70), a mineração de ouro (1970-80) e a exploração de madeira (1980-90), teriam contribuído para a expansão da LTA, com reaparecimento em vários estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste, e recente o aparecimento no Sul, coincidindo com o retorno dos trabalhadores. Deve-se ainda destacar a urbanização da doença verificada nas regiões metropolitanas do Rio de Janeiro e Belo Horizonte. A terceira teoria, a '**amazônica**', foi proposta por Marzochi & Marzochi em 1994, com base em estudos epidemiológicos e de distribuição geográfica da *Leishmania (Viannia) braziliensis* em diferentes ecossistemas, envolvendo vetores e reservatórios diversos. Estes autores sugerem que a doença humana tenha surgido na região amazônica ocidental, principalmente ao sul do rio Marañon-Solimões-Amazonas, onde predomina a *L. (V.) braziliensis*.

A doença pode ter se expandido as demais regiões do país por meio de migrantes que, após o declínio da extração do latex na Amazônia, retornaram as suas origens na Região Nordeste ou se dirigiram para a Região Sudeste, principalmente Minas Gerais e São Paulo, atraídos pelo desenvolvimento gerado pelo cultivo do café.

Este último modelo é reforçado pela constatação da heterogeneidade genética de *Leishmania braziliensis* observada na região amazônica e a homogeneidade encontrada fora dessa região, da formação de agrupamentos dos isolados por região (Gomes et al., 1995; Ishikawa et al., 2002 ), sugerindo sua introdução tardia como também pelo grande número de casos na região Norte e Nordeste (cerca de 70% dos casos no Brasil, SNV/MS., 2010) em comparação as outras regiões. Estes estudos suportam uma estrutura de população clonal dos isolados de *Leishmania* e sugerem que sua distribuição é relacionada a origem do pool de gene, aos vetores presentes e aos diferentes reservatórios.

Portanto, nossos resultados analisados de uma forma integrada demonstram que existem populações de *L. braziliensis* geneticamente mais diversificadas na região amazônica e estas podem ter sido disseminadas para outras regiões e biomas, passando pelos biomas da região nordeste e se expandindo para as regiões sudeste, centro-oeste e sul. O genótipo observado na cepa M2903 – o mais freqüente em vários focos – provavelmente é o que melhor se adaptou as condições ambientais diferenciadas.

Nossos resultados indicam a ocorrência de variabilidade genética entre as amostras de *Leishmania braziliensis* provenientes de focos de diferentes regiões e biomas brasileiros e sugerem que possa existir uma relação entre origem geográfica e diversidade.

## *7. Conclusões*

- ✓ Nosso estudo confirma a presença de variabilidade genética em *L. braziliensis* pelos diferentes métodos utilizados.
  
- ✓ As análises pelos métodos de distância genética e parcimônia indicam uma possível relação entre origem geográfica e diversidade genética em *L. braziliensis*.
  
- ✓ Dentre as técnicas utilizadas as que indicaram a formação de agrupamentos baseados em regiões geográficas e biomas foram: RAPD-PCR , PCR-RFLP/ITS1-HAEIII e PCR-RFLP/ *hsp70*-BstUI.
  
- ✓ O genótipo da cepa de referência M2903 é o mais freqüente e amplamente distribuído no Brasil.

## *8. Referências bibliográficas*

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ALENCAR, JE; PESSOA EP& FONTENELE ZF. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado do Ceará, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* , 2 (6): 347-348, 1960.

ALTAMIRANO-ENCISO AJ, MARZOCHI MCA, MOREIRA JS, SCHUBACH AO, MARZOCHI KBF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist Cienc Saude-Manguinhos*. 10:853-82, 2003.

AVILA-PIRES FD. Ecologia das Zoonoses. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. *Guanabara Koogan*; Vol. 1. Cap 5. P. 53-63, 2005.

AVISE JC. Systematic value of eletrophoretic data. *Syst. Zool.*, 23:465-481, 1975.

AZEVEDO, A.C.R. & RANGEL, E.F. A study of sand fly species (Diptera: *Psychodidae: Phlebotominae*) in focus of cutaneous *leishmaniasis* in the municipality of Baturité, Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 86: 405-410, 1991.

BAÑULS AL, BRISSE S, SIDIBÉ I, NOËL S & TIBAYRENCENC MA. Pylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA ingprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitology (Praha)* 46, 10–14, 1999.

BAÑULS AL, DUJARDIN JC, GUERRINI F, De DONCKER S, JACQUET D, AREVALO J, NOEL S, LE RAY D, TIBAYRENC M. Is *Leishmania (Viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. *J Eukaryot Microbiol*. May-Jun;47(3):197-207, 2000.

## ***Referências Bibliográficas***

---

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.& TIBAYRENC, M. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *leishmania* species. *Trans of the Royal Soc of trop Med and Hyg*, 96, 9-13, 2002 .

BAPTISTA C., SCHUBACH A.O., MADEIRA M.F., LEAL C.A, PIRES M.Q., OLIVEIRA F.S., CONCEIÇÃO-SILVA F., ROSALINO C.M., SALGUEIRO M.M., PACHECO R.S. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers, *Exp. Parasitol.* 121: 317-322, 2009.

BATES, PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* Aug;37(10):1097-106. Epub Apr 18. Review, 2007.

BERZUNZA-CRUZ M, CABRERA N, CRIPPA-ROSSI M, SOSA CABRERA T, PÉREZ-MONTFORT R, BECKER I. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res.* Oct;88(10):918-25. 2002.

BRANDÃO-FILHO SP, CAMPBELL-LENDRUM DH, BRITO MEF, SHAW JJ & DAVIES CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93, 488–494, 1999.

BRANDÃO-FILHO SP. Eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis* na Zona da Mata Atlântica do Estado de Pernambuco, Brasil. PhD. Thesis. *Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo*, 2001.

BRANDÃO-FILHO SP, BRITO CARVALHO, ISHIKAWA EA, CUPOLILLO E, FLOETER-WINTER L, SHAW JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in

## ***Referências Bibliográficas***

---

the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97, 291-296, 2003.

BRANDÃO-FILHO SP, SHAW JJ. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. *Trends Parasitol*. Nov;22(11):500-1; author reply 501-2, 2006.

BRAZIL, R.P.; NASCIMENTO, M.D.S.B & MACAU, R.P. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82: 145, 1987.

BREWSTER, S., ASLETT M.; BARKER, D.C. Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitol Today*, Nov; 14(11):437-438, 1998.

BRITO MEF, ANDRADE MS, MENDONÇA MG, SILVAilva CJ, ALMEIDA EL, LIMA BS, FÉLIX, SM, ABATH FGC, DA GRAÇA GC, PORROZZI R, ISHIKAWA EA, SHAW JJ, CUPOLILLO E, BRANDÃO-FILHO SP. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Tropical Medicine & International Health*; 14: 1278–1286, 2009.

BRUIJN de M H L, BARKER DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*. Sep;52(1):45-58, 1992.

BRUMPT E, PEDROSO AM. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no estado de São Paulo (Brasil). *An paul med cir*, 1: 97-136, 1913.

BUTCHER, B.A., TURCO S.J., HILTY, B.A., PIMENTA, P.F., PANUNZIO, M., SACKS, D.L. Deficiency in b1,3-Galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. *Journal of Biological Chemistry* 271, 20572, 1996.

## ***Referências Bibliográficas***

---

CAMARGO EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I- Origem of metacicle trypanosomes in liquid medium. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 6: 43-100,1964.

CARVALHO MLR, de ANDRADE ASR, FONTES CJF, HUEB M, SILVA SO, MELO MN, *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Tropica* 98 277-285, 2006.

CASTRO EA, LUZ E, TELLES FQ, PANDEY A, BISETO A, DINAISKI M, SBALQUEIRO I, THOMAZ SOCCOL V. Eco-epidemiological survey os *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica* 93 141-149, 2005.

CASTRO EA, THOMAZ SOCCOL V, AUGUR C, LUZ E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Parana´ (Brazil). *Experimental Parasitology*, (117) 13–21, 2007.

CUERVO P, CUPOLILLO E, NEHME N, HERNANDEZ V, SARAIVA N & FERNANDES O *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology* 108, 59-66, 2007.

CUPOLILLO E. Perfil enzimático e análise numérica de variantes do gênero *Leishmania* encontradas no Novo Mundo. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 1992 Tese Mestrado.

CUPOLILLO E, MOMEM H, GRIMALDI Jr G. Genetic Diversity in Natural Populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(5): 663-668, 1998.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L.R.; TOALDO, C.B.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; BRITO, M.E.F.; FALQUETO, A., NAIFF, M.F. & GRIMALDI JR.,G. Genetic Polymorphism and molecular

## ***Referências Bibliográficas***

---

epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Jour. Clin. Microbiol.*, 41(7): 3126-3132, 2003.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI Jr., G. & MOMEN, H. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. *Ann. Trop. Med. Med. Parasitol.*, 91 (6): 617-626, 1997.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI Jr. G. & MOMEN, H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 89: 17-23, 1995.

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

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

D'AVILA DA, GONTIJO ED, LAGES-SILVA E, MEIRA WS, CHIARI E, GALVÃO LM. *Parasitol Res.* Apr;98(5):455-61. Epub 2006 Apr;98(5):455-61. 2006.

DE BRUIJIN MHL, BARKER DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 52: 45-58, 1992.

DUJARDIN JC, BAÑULS AL, LIANOS-CUENTAS A, ALVAREZ E, DeDONCKER S, JACQUET D, LE RAY D, ARÉVALO J, TIBAYRENC M. Putative *Leishmania* hybrids in the Earsten Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop* 59, 293-307, 1995.

ERESH S, McCALLUM M, BARKER DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* 109: 423-433, 1994.

## ***Referências Bibliográficas***

---

FALQUETO A, SESSA PA, VAREJÃO JBM, BARROS GC, MOMEM H, GRIMALD Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo state, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86(4): 499-500, 1991.

FALQUETO, A. Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar no estado do Espírito Santo. *Tese de doutorado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 84p. , 1995.*

FALQUETO A., SESSA P.A., FERREIRA A.L., VIEIRA V.P., SANTOS C.B., VAREJÃO J.B.M., CUPOLILLO E., PORROZZI R., CARVALHO-PAES L.E., GRIMALDI JR. G. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(8):1003-1010, 2003.

FARRIS, J.S. Phylogenetic Analysis Under Dollo's Law. *Systematic Zoology*, 26:77-88,1977.

FERNANDES O, MURTHY VK, KURATH U, DEGRAVE W, CAMPBELL DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol* 66 : 261-277, 1994.

FERREIRA, A.de M.; VITOR, R.W.; CARNEIRO, A.C.; BRANDÃO, G.P.; MELO, M.N. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infect Genet Evol.*, Jun; 4(2): 131-142, 2004.

FILHO, H.; GARCIA-ZAPATA, M.T. Correlação das leishmanioses humanas com o bioma cerrado no Estado de Goiás. *Univ.Ci.Saúde, Brasília*, 2: 111-116, 2004.

## ***Referências Bibliográficas***

---

FOLGUEIRA , C.; CAÑAVATE, C.; CHICHARRO, C. & REQUENA, J. M. Genomic Organization and expression of the *HSP70* locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology*,1-9, 2006.

FORATTINI, O. P. *Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose.* S.P.: Edgard Blucher, 658p. v.4, 1973.

FORATTINI, O. P. et. Al. Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 10: 31-43, 1976.

FRAGA J, MONTALVO AM, DE DONCKER S, DUJARDIN JC, AUWERA GV. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect. Genet. Evol* 10, 238-245, 2010.

GARCIA L, KINDT A, BERMUDEZ H, LIANOS-CUENTAS A, DE DONCKER S, AREVALO J, TTAYA KWQ, DUJARDIN JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 42: 2294-2297, 2004.

GARCIA AL, KINDT A, QUISPE-TINTAYA KW, BERMUDEZ H, LIANOS A, ARÉVALO J, BAÑULS AL, DE DONCKER S, LE RAY D, DUJARDIN JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect. Genet. Evol* 5, 109-116, 2005.

GARCIA AL, PARRADO R, DE DONCKER S, BERMUDEZ H, DUJARDIN JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 2007; 101, 368–371. Gontijo B, de Carvalho ML. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36, 71-80, 2003.

GOMES RF, MACEDO MR, PENA SDJ, MELO MN. *Leishmana (Viannia) braziliensis*. Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp. Parasitol* 80, 681-687, 1995.

## ***Referências Bibliográficas***

---

GOMES , A.C. et al. Aspectos ecológicos da Leishmaniose tegumentar americana. 3. Observações naturais sobre o ritmo diário da atividade de *Psychodopygus intermedius* em ambiente florestal e extraflorestal. *Revista de saúde pública*, 1983, 17: 23-30, 1983.

GOMES , A.C.; SANTOS, J. L. F. & GALATI, E. A. B. Ecological aspects of american cutaneous leishmaniasis 4. Observations on the endophilic behaviour of the sand fly and the vectorial role of *Psychodopygus intermedius* in the Ribeira Valley region of S. Paulo State, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 20: 280-287, 1986.

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

GONTIJO, C.M.F.; da SILVA, E.S.; de FUCCIO, M.B.; de SOUSA, M.C.A.; PACHECO, R.S.; DIAS, E.S.; ANDRADE FILHO, J.D.; BRAZIL, R.P. & MELO, M.N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop*, 81: 143-150, 2002.

GONTIJO B, de CARVALHO ML. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc BrasMed Trop*.36, 71-80, 2003.

GRAMICIA, M. & GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control (Invited review). *Int J Parasitol* , 35:1169-1180, 2005.

GREVELINK SA, LERNER EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* v. 34, p. 257-272, 1996.

GRIMALDI G Jr & McMAHON-PRATT D Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. *In: Progress in Clinical Parasitology (ed. TSun) Field & Wood Medical Public Inc., Philadelphia pp. 73-118, 1991.*

## ***Referências Bibliográficas***

---

GRIMALDI Jr G, MOMEM H, SOARES MJ, Moriearty PL. Enzyme variation and difference in infectivity within a single strain of *Leishmania mexicana mexicana*. *Intern. J. Parasit.* 12 : 185-189, 1982.

GRIMALDI , G. JR. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6 : 230-250, 1993.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 382: 571-579.

HOCH A, RYAN L, VEXENAT JA, ROSA AC, BARRETO AC. Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from Phlebotomine in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area, Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81 Suppl. I:S62, 1986.

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

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011). Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169&id_pagina=1)>. Acesso em 16/02/2011.

ISHIKAWA, E. A. Y.; SILVEIRA, F. T.; MAGALHÃES, A. L. P.; GUERRA JR, R. B.; MELO, M. N.; GOMES, R.; SILVEIRA, T. G. V. & SHAW, J.J. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans. of the Soc. Of Trop. Med. And Hyg.*, 96: Suppl. 1S1/111-S1/121, 2002.

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. 395-0, 1979.

LAINSON, R. et, al. Leishmaniasis in Brazil, IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex: importance of sandflies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira)

in the transmission of *Leishmania braziliensis* in north Brazil. *Trans. Of the Soc. Of Trop. Med. And Hyg*, 67: 184-196, 1973.

LAINSON R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;77(5):569-96. Review, 1983.

LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) The leishmaniasis in biology and medicine, *Academic Press*, London Vol.1, p.1-120, 1987.

LAINSON R, SHAW JJ. New World Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed., Vol. 5 *Parasitology*, Arnold, London, p. 242-266, 1998.

LAINSON R. Ecological interaction in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 321: 389-404, 1988.

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. The neotropical leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 1, 13-32, 2010.

LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; MAAZOUN, R.; PASTEUR, N.; PRATLONG, F, LEPART, J. The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903. The recognition of 146 original lines in the old world. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance. *Ann Parasitol Hum Comp.*, 56 (6): 575-591, 1981.

## ***Referências Bibliográficas***

---

LUKES J, MAURÍCIO IL, SCHÖNIAN G, DUJARDIN JC, SOTERIADOU K, DEDET JP, KUHL S, TINTAYA KWQ, JIRKU M, CHOCHOLOVÁ E, HARALEMBOUS C, PRATLONG F, OBORNÍK M, HORÁK A, AYALA FJ, MILES MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22):9375-9380, 2007.

MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; SERRA, C.M.B.; PEREIRA, A.S.; FIGUEIREDO, F.B.; CONFORT, E.M.; QUINTELL, L.P. & MARZOCHI, M.C.A. Is

*Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res*, 97: 73-76, 2005.

MARKET, C.L. and MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic, and species specific patterns. *Biochem*. 45:753-763, 1959.

MARTINEZ, E.; ALONSO, V.; QUISPE, A.; THOMAS, M. C.; ALONSO, R.; PIÑERO, J. E.; GONZÁLEZ, A.C.; ORTEGA, A. & VALLADARES, B. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitology*, 127: 513-517, 2003.

MARZOCHI, M.C.A. & MARZOCHI, K.B.F. Leishmanioses em áreas urbanas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1997.

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

MARZOCHI MCA. A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: Grandes Endemias Brasileiras. Brasília, Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 1989.

MAURÍCIO, IL, STOTHARD JR, MILES MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. May;16(5):188-9, 2000.

## ***Referências Bibliográficas***

---

MAYRINK, W. et. Al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brasil. *Annals of tropical Med. And parasitology*, 73: 123-137, 1979.

MELO, LUTIANA AMARAL de. (2008). Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG. Belo Horizonte: s.n., 90 p. Capa dura, 29 cm., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde na área de concentração: Biologia Celular e Molecular)-Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo. Disponível em: [http://netra.cpqrr.fiocruz.br/download/Dissertacao\\_Lutiana\\_Amaral\\_de\\_Melo.pdf](http://netra.cpqrr.fiocruz.br/download/Dissertacao_Lutiana_Amaral_de_Melo.pdf) . Acesso: 10 maio 2010. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html> .

MEMBRIVE, N. et. al. *Lutzomyia whitmani* true vector of *Leishmania braziliensis* in the north of Paraná state, Brazil. *3rd International Symposium on Phlebotomine Sand Flies*, p.33, 1999.

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

MOMEN, H. Parasite characterization by zimodeme analysis. In: Morel, C.M. (ed.) *Genes and Antigens of Parasites: A laboratory manual*. Rio de Janeiro, UNDP/ WHO-FINEP-CNPq-FIOCRUZ, p. 111-120, 1984.

MOMEM, H., G. GRIMALDI, Jr., and L. M. DEANE. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:447-448, 1987.

## ***Referências Bibliográficas***

---

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.; GRIMALDI Jr., G.; PACHECO,R.S.; JAFFE,C.L.; McMAHON PRATT,D. & MARZOCHI,M.C.A. Brazilian Leishmania stocks phenotypically similar to Leishmania major. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 1076-1084, 1985.

MOREIRA J. Botão endêmico dos países quentes. *Brasil Med*; 1:100-1, 1906.

NEVES, D.P. Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo in *Parasitologia Humana*. 11ª edição. Cap.8.pág. 47, 2005.

NEVES D.P. Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo in *Parasitologia Humana*. 11ª edição. Cap.9.pág. 65, 2005.

NIMRI, L.; SOUBANI, R. & GRAMICCIA, M. Leishmania species and zymodemes isolated from endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Jordan. *Kinetoplastid Biology and Disease* 1:7, 2002.

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 HA, ARANA BA, CHANCE ML, MAINGON R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypano-somatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a Neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *Euk Microbiol*; 44: 511-517, 1997.

OLIVEIRA, R.P.; MACEDO,A.M.; CHIARI,E. & PENA,S.D. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol. Today*, 13 (5): 196-200, 1997.

## ***Referências Bibliográficas***

---

OLIVEIRA, F. S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M. Q.; BRAZIL, R. P. & PACHECO R. S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*, 129-227, 2005.

OLIVEIRA, J.P. de; FERNANDES, F.; CRUZ, A. K.; TROMBELA, V.; MONTEIRO, E., CAMARGO, A.A.; BARRAL, A. de OLIVEIRA, C.I. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis*, Jun. 21(6): 5, 2007.

ORLANDI, P.A., TURCO, S.J. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 262, 10384-10391, 1987.

PADILLA, A.M.; MARCO, J.D.; DIOSQUE, P.; SEGURA, M.A.; MORA, M.C.; FERNÁNDEZ, M.M.; MALCHIODI, E.L. & BASOMBRÍO, M.A. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 110: 1-10, 2002.

PASSOS, V.M.A.; LASMAR, E.B.; GONTIJO, C.M.F.; FERNANDES, O. & DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Osw Cruz* 91(1): 19-20, 1996.

PASSOS, V.M.A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P.A.F.; VOLPINI, A.C.; GONTIJO, C.M.F.; DEGRAVE, W. & ROMANHA, A. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American Cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop.*, 72: 251-258, 1999.

PENNISI, M.G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F. & GIUDICE S. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun*, Suppl.1:363-366, 2004.

PESSOA SB, BARRETO MP. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro: Ministério da Educação e Cultura; Serviço de Documentação. 527 p. 1948.

## ***Referências Bibliográficas***

---

PIMENTA, P.F.P., SARAIVA, E.M., ROWTON, E., MODI, G.B., GARRAWAY, L.A., BEVERLEY, S.M., TURCO, S.J., SACKS, D.L. Evidence that vectorial competence of phlebotomine sandflies for different species is controlled by structural polymorphisms in the surface of lipophosphoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9155-9159, 1994.

PIMENTA, P.F.P., TURCO, S.J., McCONVILLE, M.J., LAWYER, P.G., PERKINS, P., SACKS, D.L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 234, 212-214, 1992.

QUEIROZ, R.G. et.al. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in Northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: *Psychodidae*) as a vector of *leishmania braziliensis* in Baturité municipality. *American Journal of Trop Med and Hyg*, 50:693-698, 1994.

RABELLO E. Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil. I. Histórico e sinonímia. *Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia*. 1(1):3-31, 1925.

RANGEL, E.F. et. al. Infecção natural de *Lutzomyia intermédia* (Lutz & Neiva, 1912) em área endêmica de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79: 395-396, 1984.

RANGEL, E. F. et. al. Flebótomos de Vargem Grande, foco de Leishmaniose tegumentar no estado do rio de janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81: 347-349, 1986.

READY, P. Sand fly evolution and its relationship to *leishmania* transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4): 589-590, 2000.

REITHINGER, R. & DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *The Am Soc of Trop Med and Hyg*, 61(4): 530-541, 1999.

## ***Referências Bibliográficas***

---

RODGERS MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71: 267-275, 1990.

ROLÃO, N.; MARTINS M.J.; JOÃO, A. & CAMPINO, L. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12: 183-186, 2005.

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

ROSSI, V.; WINCKER, P.; RAVEL, C.; BLAINEAU, C.; PAGÉS, M. & BASTIEN, P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)<sub>n</sub> loci. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 65: 271-282, 1994.

ROSS, R. further notes on *Leishmanias* bodies. *Br. Med. J.*, 11: p. 1401, 1903.

ROTUREAU B, RAVEL CL, COUPPIÉ P, PRATLONG F, NACHER M, DEDET J P, CARME B. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 44: 459-467, 2006.

ROUGERON V, WALECKX E, HIDE M, MEEÛS DE T, AREVALO J, LLANOS-CUENTAS, BAÑULS A L. A set of 12 microsatellite loci for genetic studies of *Leishmania braziliensis*. *Molecular Ecology Resources* 8, 351-353, 2008.

RYAN L, LAINSON R, SHAW JJ. Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera Psychodidae) in Pará State with particular reference to the role of *Psychodopygos wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis braziliensis* in the Serra of Carajás. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 353-359, 1987.

## ***Referências Bibliográficas***

---

RYAN L, VEXANAT A, MARSDEN PD, LAINSON R, SHAW JJ. The importance of rapid diagnosis of new cases of cutaneous leishmaniasis in pin-pointing the sandfly vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 786, 1990.

SACKS, D.L., PIMENTA, P.F.P., McCONVILLE, M.J., SCHNEIDER, P., TURCO, S.JC. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine* 181, 685-697, 1995.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 221p., 1998.

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

SCHALLIG, H.D.F.H.; SILVA, E.S.; VAN DER MEIDE, W.F. & GONTIJO, C.M.F. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potencial reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(3): 387-393, 2007.

SCHOONIAN G, NASEREDDIN A, DINSE N, SCHWEYNOCH C, SCHALLIG HDFH, PRESBER W, JAFFE C. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 47: 349-358, 2003.

SCHRIEFER A, SCHRIEFER AL, GOES-NETO A, GUIMARAES LH, CARVALHO LP, ALMEIDA RP, MACHADO PR, LESSA HA, DE JESUS AR, RILEY LW, CARVALHO EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a

## ***Referências Bibliográficas***

---

region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun* 72: 508-514, 2004.

SCHULZ A, MELLENTHIN K, SCHNIAN G, FLEISCHER B, DROSTEN C. Detection, Differentiation and Quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence Resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*; 41: 1529-1535, 2003.

SHAW JJ. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrell, J. (Ed.), World Class Parasites: Leishmania. *Kluwer Academic Publishers*, Boston; pp. 11-31, 2003.

SHAW, J.J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83: 486-490, 1988.

SILVA ES, GONTIJO CMF, MELO MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends in Parasitol*; 21(12), 550-552, 2005.

SILVA, L.A.; SOUSA, C. S.; GRAÇA, G.C.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E. Sequence analysis and pCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Inf.Genetics and evolution*, 10 77-83, 2010.

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

## ***Referências Bibliográficas***

---

SILVEIRA FT, LAINSON R & CORBETT CE Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 99, 239–251, 2004.

SINAN/SVS/MS. *Boletim eletrônico epidemiológico*, abril, 2010.

SINAN/SVSMS (2010). Disponível em:

< [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1\\_Ita\\_casos\\_27\\_10\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1_Ita_casos_27_10_2010.pdf)>. Acesso em 16/02/2011.

SOUZA, A.I. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol*, 128(1-2): 41-5, 2005.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C.L.P.; ROMANHA, A. & SIMPSON, A.J.G.,. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular and Biochemical Parasitology* , 60 : 71-80, 1993.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17(16): 6463-6471, 1989.

THOMAZ-SOCCOL V, LANNOTTE G, RIOUX JA, *Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E.* *Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania.* *Ann Parasitol Hum Comp*; 127(4):421-4, 1993.

TIBAYRENC M, AYALA FJ. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today.* Sep;7(9):228-32, 1991.

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., USA*, 87: 2414-2418, 1990 .

TSUKAYAMA P., LUCAS C., BACON D. J. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of new world *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*. 39: 355-362, ., 2009.

TURCO, S.J. & SACKS, D.L. Control of *Leishmania*-sand fly interactions by polymorphisms in lipophosphoglycan structure. *Methods Enzymol.*;363:377-81, 2003.

TURCO, S.J. & DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual Review Microbiology* 46, 65-94, 1992.

TURCO, S.J. The leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule. *Exp Parasitol*. Feb;70(2):241-5. Review, 1990.

VALE, E.C.S. & FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisai histórica da origem, expansão e etiologia. *Na Brás Dermatol*. 80(4):421-8, 2005.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA G.C & ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 90: 31-37, 2004.

VOLPINI, A.C.; AZEREDO PASSOS, V.M.; ROMANHA, A.J. Attempt to differentiate *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. *Parasitol Res*, v. 87(12), p. 1056-1059, 2001.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18:7213-7218, 1990.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly epidemiological record*. 44(77): 365-372, 2002.

## ***Referências Bibliográficas***

---

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

YANG S, ROTHMAN R. PCR-based diagnostics for infections diseases: uses,limitations and future applications in acute-care settings. *The Lancet London*, 4: 337-348, 2004.

ZEMANOVÁ, E.; JIRKU, M.; MAURÍCIO, I.L.; MILES, M.A.; LUKES, J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geografic origin. *The Am. Soc. of trop. Med. and Hyg*, 70(6), pp.613-617, 2004.

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

ZURITA AL, RODRÍGUEZ J,PINERO JE, PACHECO R, CARMELO E, del CASTILLO A, VALLADARES B. Cloning and characterization of the Leishmania (Viannia) braziliensis Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *J Parasitol.* Apr;89(2):372-8, 2003.