



Universidade Estadual Paulista
Campus de Botucatu
Instituto de Biociências

Utilização de Marcadores Moleculares no Estudo Populacional de
Leishmania infantum chagasi no Brasil.

DIEGO PERES ALONSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) – Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu/SP
2011

DIEGO PERES ALONSO

Utilização de Marcadores Moleculares no Estudo Populacional de
Leishmania infantum chagasi no Brasil.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) – Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu/SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Alonso, Diego Peres.

Utilização de Marcadores Moleculares no Estudo Populacional de
Leishmania infantum chagasi no Brasil / Diego Peres Alonso. - Botucatu,
2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Capes: 20202008

1. Genética molecular. 2. Leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Genética Populacional; Marcadores
Moleculares.

Dedico este Trabalho à minha Esposa Leticia,

Companheirismo, Carinho e Amor são sentimentos, que precisam ser vividos dia a dia, e você, além de enfrentar todos os desafios cotidianos da vida, é fonte inesgotável desses sentimentos, e de muitos outros, que tornam a minha vida muito mais doce.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a minha família!...Meus avós, meus tios e primos... Nos últimos anos a distância foi grande, mas não maior do que a saudade que eu tenho de vocês todos os dias... Sem esquecer também da minha nova família “Capivariana” Zezinho, Dú e Juarez Obrigado pela acolhida e momentos de descontração...

Aos meus Pais, por me darem a vida, e por todo apoio e suporte nesses 11 anos longe de vocês... Minha irmã Julia por ter me ensinado muito nos últimos meses, foram tempos atribulados, mas fico feliz agora que você conseguiu encontrar o caminho certo.

Aos amigos de Botucatu!!... Smurf e Amanda pelo companheirismo para todas as horas... Teresa e Arthur pelos ensinamentos, conselhos e apoio.

Ao meu orientador Paulo por acreditar na minha capacidade, pelos inestimáveis ensinamentos e principalmente por ser um exemplo de orientador e pesquisador para mim.

Aos colegas do laboratório Pangene, pela ótima convivência:

Karina, Carine, Leticinha, Mel, Letícia III. Em especial, a Giovana, porque através da sua “inquietação científica” sempre me lembra que a chama da curiosidade pela ciência deve ser constantemente alimentada... a Aline pelos momentos de descontração, por estar sempre pronta para ouvir e ajudar... e a Teresa por ser a “mãezona” do laboratório, por ser sempre a que melhor recebe um estudante de fora e a que faz o possível para que ele se sinta em casa, por estar sempre preocupada em ajudar ou outros, e pelo exemplo de vida e não achar, mas ter a certeza, de que nunca é tarde para aprender e principalmente ensinar...

Aos Professores e funcionários do Departamento de Parasitologia pela acolhida e momentos de descontração!

E finalmente, agradeço a Deus e a vida, pela a oportunidade de ter iniciado a minha família ao lado de minha esposa Letícia, e de meus dois “filhos” de quatro patas. Agradeço a você,

Letícia por todo amor, dedicação e companhia... Seu apoio e otimismo me fazem sempre enxergar o melhor lado das coisas... Aos meus cachorros dedico:

“Eu me dei conta de que cada vez que um de meus cachorros parte, ele leva um pedaço de meu coração com ele. Cada vez que um novo cachorro entra na minha vida, ele me abençoa com um pedaço do coração dele. Se eu viver uma vida bem longa, com sorte, todas as partes do meu coração serão de cachorro, então eu me tornarei tão generoso e cheio de amor como eles”

(Autor Desconhecido)

Agradeço ao Dr. Carlos Henrique Nery Costa da UFPI, Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza da UNESP, Dra. Maria do Socorro Cruz da UFPI, Dra Ivete Lopes de Mendonça da UFPI e Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior da UFMS, pela colaboração científica e fornecimento das amostras analisadas.

Agradeço a Fapesp pela bolsa de Doutorado (Processo: 2006/61151-2)

Resumo

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitida através da picada de fêmeas de mosquitos da família *Plebotomidae*. As formas clínicas da leishmaniose são particularmente variadas tendo como forma mais grave a leishmaniose visceral (LV) ou calazar. No Brasil a LV é causada pelo protozoário *L.infantum chagasi* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, os principais reservatórios que participam do ciclo zoonótico são canídeos selvagens e cães domésticos. O fato de as leishmanioses, de uma maneira geral, apresentarem um amplo espectro no que diz respeito à sintomatologia da doença, aliado a grande diversidade das espécies de hospedeiros infectados, sugere a presença de variantes genéticas do parasita. No caso da leishmaniose visceral, por exemplo, variantes genotípicas de *L.infantum chagasi* interagindo com diferentes espécies de hospedeiros podem ter papel fundamental na dinâmica de transmissão e virulência de possíveis epidemias. O presente estudo teve como meta identificar possíveis variantes genotípicas de *L. infantum chagasi* presentes na área endêmica de Teresina no Estado do Piauí, e comparar com os genótipos encontrados em Campo Grande no Estado de Mato Grosso do Sul e Bauru no Estado de São Paulo, visto que a história natural da doença nessas regiões é muito mais recente do que no Estado do Piauí. O estudo utilizou marcadores microsatélites já descritos na literatura, seqüenciamento de regiões gênicas codificantes e não-codificantes e também a técnica de PCR-RFLP do DNA do cinetoplasto (kDNA) do parasita, para a obtenção de perfis genéticos que possibilitem relacionar as diferenças genotípicas com as diferentes origens geográficas dos parasitas isolados como um primeiro passo para a eleição e aplicação de um marcador molecular robusto para o estudo populacional de *L. infantum chagasi* no Brasil. Dentre as técnicas utilizadas, a que apresentou o maior poder discriminatório foi a técnica de PCR-RFLP do kDNA, que permitiu identificar uma clara separação dos isolados encontrados em Campo Grande e Bauru dos isolados presentes em Teresina.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, Genética Populacional, Marcadores Moleculares

Abstract

Leishmaniasis is a parasitary disease caused by *Leishmania* protozoans and transmitted by female Phlebotomidae sandflies. Clinical manifestations are particularly diverse, being visceral leishmaniasis (VL) the most severe form. In Brazil VL is caused by *Leishmania infantum chagasi* and transmitted by *Lutzomyia longipalpis* sandfly; the main zoonotic reservoirs are dogs and wild canids. Due to a broad range of disease manifestations and great variety of host species infected, *Leishmania* parasites are thought to possess great genotypic variability. This is of major significance in epidemiological features and in disease transmission. The aim of this study is to identify different genotypic strains of *L. infantum chagasi* in endemic areas of Teresina, Piauí State; Campo Grande, Mato Grosso do Sul State and Bauru, São Paulo State, and after that, select an appropriate molecular marker in order to study population genetics of *L. infantum chagasi* in Brazil. Microsatellites markers, sequencing of DNA coding and non-coding regions and PCR-RFLP of kinetoplast DNA (kDNA) were used in order to compare genetic profiles in parasites from different geographical origins. Among all this techniques, kDNA PCR-RFLP has shown greater performance, and was able to detect a clear distinction in Teresina isolates when compared to Campo Grande and Bauru isolates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas da <i>Leishmania infantum chagasi</i> . (A) forma flagelada promastigota. (B) forma aflagelada amastigota.....	20
Figura 2. Ciclo evolutivo de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	23
Figura 3. Gel dos produtos de PCR com oligo Li45-24.....	43
Figura 4. Gel dos produtos de PCR com oligo GACA1.....	44
Figura 5. Gel dos produtos de PCR com oligo GA3.....	44
Figura 6. Gel de agarose de alta resolução MetaPhor dos produtos amplificados pelo oligo Li23-41.....	45
Figura 7. Gel de agarose de alta resolução MetaPhor dos produtos amplificados pelo oligo Li45-24.....	46
Figura 8. Imagem do gel obtida da genotipagem por análise de fragmentos em seqüenciador automático com o oligo Li45-24.....	47
Figura 9. Alinhamento das sequencias de ITS-1 obtidas no estudo.....	48
Figura 10. Gel dos produtos de PCR com os primers MC1 e MC2.....	49
Figura 11. Gel dos produtos da reação de digestão com a enzima <i>RsaI</i> dos produtos de PCR amplificados com os primers MC1 e MC2.....	50
Figura 12. Gel dos produtos da reação de digestão com a enzima <i>HpaII</i> dos produtos de PCR amplificados com os primers MC1 e MC2.....	50
Figura 13. Gel dos Produtos de PCR com os oligos LINR4 e LIN19.....	51
Figura 14. Gel dos produtos da reação de digestão com a enzima <i>RsaI</i> e <i>HpaII</i> dos produtos de PCR amplificados com os primers LINR4 e LIN19.....	52
Figura 15. Padrões de RFLP representativos de cada localidade, com destaque para os dois padrões bem distintos encontrados nas amostras de Bauru.....	53
Figura 16. Arvore fenética (UPGMA) construída com os dados de RFLP do kDNA e mostrando a distribuição de 157 isolados de <i>Leishmania chagasi</i>	54
Figura 17. Sequencia do cromossomo 27 de <i>L. infantum</i>	57
Figura 18. Gel dos produtos da digestão da região ITS-1 de <i>Leishmania</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel de oligonucleotídeos usados na genotipagem dos microssatélites.....	35
Tabela 2. Sequencias dos clones analisados de <i>L. infantum chagasi</i>	48

ÍNDICE

Resumo	
<i>Abstract</i>	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
1. Introdução	
1.1. Leishmaniose Visceral.....	17
1.1.1 Características Epidemiológicas no Brasil.....	18
1.1.2 Agente Etiológico.....	19
1.1.3 Reservatórios.....	21
1.1.4 Vetores.....	21
1.2. Genotipagem de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	24
1.3. DNA do cinetoplasto.....	26
1.4. Sequenciamento do gene ortólogo ao fator de inibição de migração dos macrófagos (MIF) de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	28
1.5. Sequenciamento do fragmento de ITS-1 de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	29
2. Objetivos.....	31
3. Material e Métodos	
3.1. Amostras e extração de DNA.....	33
3.2. PCR para genotipagem.....	34
3.3. Genotipagem dos Fragmentos Amplificados.....	36
3.4. PCR-RFLP do DNA do Cinetoplasto (kDNA).....	36
3.5. Sequenciamento dos genes MIF de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	38
3.6. Sequenciamento do fragmento de ITS-1 de <i>Leishmania infantum chagasi</i> e diagnóstico específico por RFLP.....	39
3.7. Clonagem e sequenciamento de minicírculos do DNA de cinetoplasto <i>Leishmania infantum chagasi</i>	40
3.7.1 Ligação.....	40

3.7.2	Preparação de Células Competentes.....	40
3.7.3	Transformação.....	41
3.7.4	Sequenciamento dos clones.....	41
4.	Resultados	
4.1.	PCR para genotipagem.....	43
4.2.	Genotipagem dos Fragmentos Amplificados em Sequenciador automático.....	46
4.3.	Sequenciamento do gene ortólogo ao fator de inibição de migração dos macrófagos e da região de ITS-1 de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	48
4.4.	PCR-RFLP do DNA do Cinetoplasto (kDNA) com os primers MC1 e MC2.....	49
4.5.	PCR-RFLP do DNA do Cinetoplasto (kDNA) do minicírculo completo.....	51
4.6.	Sequenciamento dos clones dos minicírculos do DNA do cinetoplasto de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	55
4.7.	Confirmação da espécie de <i>Leishmania</i> pelo PCR-RFLP da região de ITS-1.....	58
5.	Discussão.....	60
6.	Referências Bibliográficas.....	68

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”

Fernando Pessoa

Introdução

1.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitida através da picada de fêmeas de mosquitos da família *Plebotomidae*. As formas clínicas da leishmaniose são particularmente variadas, com diferentes fenótipos associados: leishmaniose visceral (LV), que é geralmente letal quando não tratada; leishmaniose muco-cutânea (LMC), caracterizada como uma doença mutiladora; leishmaniose cutânea difusa (LCD), doença provocada por uma resposta imune celular deficiente; e leishmaniose cutânea (LC), que causa o aparecimento de inúmeras ulcerações na pele dos pacientes.

A epidemiologia é extremamente diversa: 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para o homem, e 30 espécies de flebotomíneos são vetoras. Existem duas classificações epidemiológicas para a doença: zoonose, que inclui animais hospedeiros como reservatórios no ciclo de transmissão, e antroponose, na qual o homem é a única fonte de infecção para o mosquito vetor. A doença se acha distribuída em um total de 88 países: 72 são países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos (Desjeux, 2004).

Dentre todas as formas clínicas a mais severa é a leishmaniose visceral, a doença, conhecida também como calazar ou febre dum-dum, é caracterizada por febre intermitente, hepatoesplenomegalia, anemia e debilidade progressiva, levando frequentemente a óbito. Duas espécies do complexo *donovani* transmitem a doença para o homem: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum/Leishmania chagasi*.

Existem dois tipos de LV, que se diferenciam nas características de transmissão: A LV zoonótica é transmitida do reservatório animal, principalmente o cão doméstico, para o inseto vetor e desse para o homem, e a LV antroponótica é transmitida do homem para o inseto vetor e desse novamente para o homem. A LV zoonótica ocorre onde há transmissão de *L. infantum/chagasi*; enquanto que a LV antroponótica é transmitida por *L. donovani*. A reação dérmica pós calazar (PKDL) é caracterizada freqüentemente por “rash” nodular e é considerada uma complicação que é freqüentemente observada após o tratamento da LV, principalmente no Sudão e de maneira mais rara na Índia, ela também pode ocorrer em

indivíduos imunosuprimidos parasitados por *L. infantum*. Casos de PKDL são altamente infecciosos pois as lesões nodulares contém um número muito alto de parasitas, esses casos também servem como reservatórios da LV antroponótica entre diferentes ciclos epidêmicos. (Chappuis et. al, 2007).

As co-infecções Leishmania-HIV são um outro aspecto epidemiológico da LV que têm se tornado um sério problema de saúde pública, especificamente na Europa e América do Sul, onde a ocorrência de transmissão do vírus HIV em áreas endêmicas para LV tem mudado as características epidemiológicas da LV. A presença do vírus HIV aumenta o risco de desenvolver LV fulminante entre 100 e 2320 vezes, e por sua vez a LV promove a progressão clínica do HIV e o desenvolvimento da AIDS. (Alvar et al., 2008).

Atualmente 90% dos casos de LV ocorrem em áreas rurais pobres e subúrbios de seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil, representando uma incidência anual de 500,000 casos com aproximadamente 59,000 mortes oficiais, esse número de mortes só é ultrapassado, entre as doenças parasitárias, pela Malária.

Como Índia, Nepal e Bangladesh são responsáveis por 67% dos casos anuais de LV no mundo, o governo dos três países tem um programa regional de eliminação de LV. Esse programa tem como meta a eliminação da LV como problema de saúde pública até 2015, com uma abordagem para diminuir a incidência anual para menos de 1 caso a cada 10.000 habitantes. (Chappuis et. al, 2007).

1.1.1 Características Epidemiológicas no Brasil

No Brasil a LV é causada pelo protozoário *L. infantum chagasi* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, os principais reservatórios que participam do ciclo zoonótico são canídeos selvagens e cães domésticos, a região nordeste é a mais afetada, com 50% dos 3 a 4 mil casos anuais do país. A doença, que era tipicamente rural, a partir de 1980 passou a ser responsável por epidemias urbanas, inicialmente em Teresina – PI e em São Luís – MA. Atualmente a LV se acha distribuída em vários estados, tais como: Mato grosso do Sul, Minas gerais e São Paulo, com epidemias que atingem cidades do porte de Campo Grande – MS, Belo Horizonte – MG, Araçatuba e Bauru – SP. (Ministério da Saúde, 2006).

O Panorama epidemiológico não deixa dúvida quanto a severidade da situação e da distribuição geográfica da LV. De 1980 até 2008, mais de 70.000 casos de LV foram reportados no Brasil, com 3.800 mortes. O número médio de casos por ano aumentou de 1.601 (1985-1989) para 3630 (2000-2004), mantendo a média desde então. Na década de 1990, apenas 10% dos casos ocorriam fora da região Nordeste, mas em 2007 a proporção alcançou 50% dos casos. De 2006 até 2008, a transmissão autóctone da LV foi reportada em mais de 1200 municípios em 21 estados da Federação. (Werneck, 2010).

Especificamente no estado de São Paulo vem se verificando um processo de expansão da doença, à medida que se constata a adaptação do vetor em zonas urbanas (Camargo-Neves & Gomes 2002). A doença em cães, desde o primeiro registro da sua ocorrência, já foi notificada em 45 municípios, ocorrendo em seis regiões administrativas: Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, Grande São Paulo e São João da Boa Vista. Em seres humanos, até junho de 2006, a doença já havia sido registrada em 34 municípios das regiões de Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente (Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, 2006). No município de Bauru por exemplo, desde 2003 (que foi o primeiro ano de aparecimento da doença) até setembro de 2006, já ocorreram 118 casos humanos notificados da doença com a confirmação de 11 óbitos (Centro de Vigilância epidemiológica SP, 2006).

1.1.2 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra sem flagelo aparente ou amastigota (Figura 1) nos tecidos dos vertebrados. Na LV, três espécies estão envolvidas com a infecção dependendo da região geográfica onde a doença ocorra: (i) *Leishmania (Leishmania) donovani* Laveran & Mensil, 1903 foi o parasito originalmente descrito, responsável pela forma visceral clássica (antropnose) e pela leishmaniose dérmica pós-calazar na Ásia; (ii) *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908

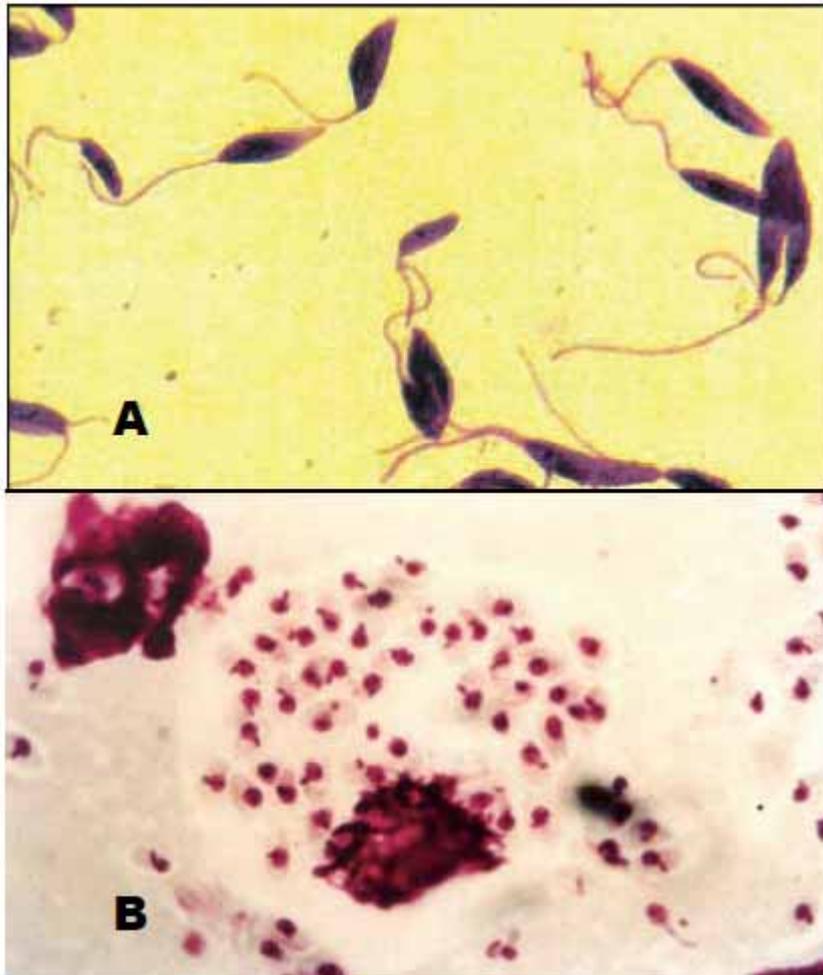


Figura 1. Formas da *Leishmania infantum chagasi*. (A) forma flagelada promastigota. (B) forma aflagelada amastigota. Fonte: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2006.

é uma espécie amplamente distribuída no Velho Mundo: Ásia, Europa e África; (iii), *Leishmania (Leishmania) chagasi* Cunha & Chagas, 1937 ocorre nas Américas, sendo responsável pela LVA em seres humanos e cães. (Ministério da Saúde, 2006).

1.1.3 Reservatórios

Os reservatórios do parasito são animais mamíferos, principalmente canídeos, sendo os mais importantes a raposa (no ciclo silvestre e rural) e o cão (no ciclo rural e, particularmente, nas áreas urbanas).

No Brasil, as primeiras evidências de transmissão da LVA canina foram em Abaeté (PA), como resultado dos trabalhos desenvolvidos por comissão instituída pelo Instituto Oswaldo Cruz para a avaliação dessa problemática. Porém, apenas em 1955, é que foi estabelecido por Deane & Deane (1955) o papel do cão como reservatório da LVA, quando constatada a transmissão em cães residentes em zona urbana do município de Sobral (CE), verificando-se freqüência muitas vezes intensa do parasitismo cutâneo.

Nos ambientes rural e urbano o cão doméstico – *Canis familiaris* vem sendo descrito como o principal reservatório da *L. infantum chagasi*, tanto no Brasil como nas Américas .

Entre os canídeos silvestres, reservatórios da *L. infantum chagasi*, destacam-se nos ciclos silvestre e rural, a raposa – *Dusicyon vetulus (=Lycalopex vetulus)*, no Nordeste do Brasil, em especial no estado do Ceará e a espécie *Cerdocyon thous*, na Amazônia brasileira, no estado do Pará (Ministério da Saúde, 2006).

1.1.4 Vetores

Os vetores da leishmaniose visceral são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. infantum chagasi* no Brasil e, recentemente, *L. cruzi* foi incriminada como vetora no Estado de Mato Grosso do Sul (Ministério da Saúde, 2006).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de

promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas (Figura 2). Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sangüíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Ministério da Saúde, 2006).

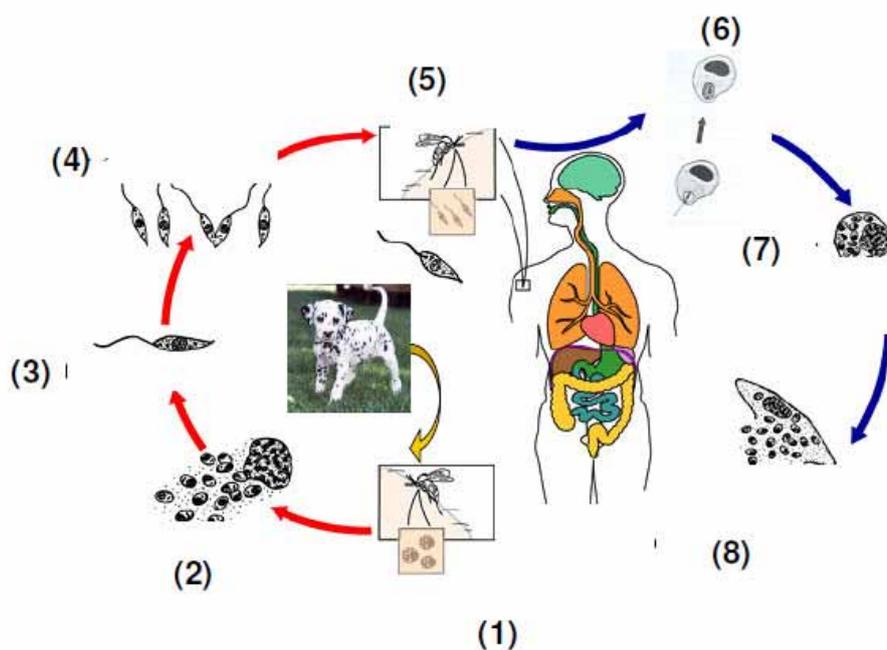


Figura 2. Ciclo evolutivo de *Leishmania infantum chagasi*. Adaptado de: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

- (1) Mosquito ingere sangue infectado do cão.
- (2) Ingestão de células parasitadas.
- (3) Amastigotas se transformam em promastigotas no estômago do mosquito.
- (4) Promastigotas se multiplicam no estômago do mosquito transmissor.
- (5) Mosquito retira sangue do hospedeiro e injeta promastigotas.
- (6) Promastigotas são fagocitados pelos macrófagos.
- (7) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos.
- (8) Amastigotas são liberados e infectam outras células.

1.2 Genotipagem de *Leishmania infantum chagasi*

O fato de as leishmanioses, de uma maneira geral, apresentarem um amplo espectro no que diz respeito à sintomatologia da doença, aliado a grande diversidade das espécies de hospedeiros infectados, sugere a presença de variantes genéticas do parasita (Woolhouse et al., 2001). Evidentemente, o “background” genético do hospedeiro também tem um papel importante no processo de infecção, desenvolvimento e diversidade de fenótipos clínicos da doença. Nesse contexto, alguns estudos vêm buscando regiões cromossômicas ou mutações em genes específicos que possam estar relacionadas com a infecção por *Leishmania infantum chagasi*. Em abordagens distintas, baseadas principalmente em grupos de famílias com casos de LV, o gene SLC11A1 na região cromossômica 2q35 (Bucheton et al., 2003; Mohamed et al., 2004), o gene da IL-4 e IL-9 (Mohamed et al., 2003), o gene do TNF (Karplus et al., 2002) e a região cromossômica 22q12 (Bucheton et al., 2007) foram relacionados a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. O gene *mbi2*, que codifica uma lectina sérica envolvida, de maneira geral, no reconhecimento de patógenos também tem um papel na susceptibilidade a LV. Mutações específicas na região promotora e no exon 1 deste gene estão relacionadas a baixos níveis séricos da proteína, o que pode ser um fenótipo favorável para indivíduos com infecções provocadas por patógenos extracelulares, como é o caso de *L. infantum chagasi*. Recentemente, em um estudo caso-controle realizado na população de Teresina - PI, indivíduos com genótipos relacionados a níveis séricos baixos da proteína se apresentaram com proporção significativamente menor de casos da doença, e com sintomas mais brandos em relação aos indivíduos com genótipos relacionados a níveis séricos altos dessa lectina (Alonso et al., 2007).

Além disso, a heterogeneidade genética e diversidade clonal, que podem levar a uma variabilidade na virulência do parasita, são comuns aos representantes do gênero *Leishmania* (Garin et al., 2001; Turco et al., 2001). Posto isso, no caso da leishmaniose visceral, por exemplo, variantes genotípicas de *L. infantum chagasi* interagindo com diferentes espécies de hospedeiros podem ter papel fundamental na dinâmica e virulência de possíveis epidemias. Recentemente para a espécie *Leishmania donovani* foram identificados polimorfismos de um

locus gênico bem definido que distinguem cepas do parasita que causam calazar clássico das que causam uma reação dérmica específica pós-calazar (Sreenivas et al., 2004). Portanto, a identificação de possíveis clones ou variantes de *L. infantum chagasi* é de extrema importância para um estudo aprofundado da dinâmica de transmissão e da epidemiologia da doença, principalmente em áreas endêmicas.

Várias abordagens moleculares têm sido utilizadas na caracterização de variantes genéticas em espécies do gênero *Leishmania*: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (Toledo et al., 2002), análise por polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de regiões ITS de DNA ribossomal (Cupolillo et al., 2003) e de DNA do cinetoplasto (Laurent et al., 2007); análise de regiões amplificadas de seqüência confirmada (Lewin et al., 2002); análise por hibridização de sondas de DNA (Southern blotting) (Sreenivas et al., 2004), e análise de regiões de DNA com marcadores microssatélites (Jamjoom et al., 2002; Bulle et al., 2002; Schwenkenbecher et al., 2004; Schwenkenbecher et al., 2005; Ochsenreither et al., 2006; Kuhls et al. 2007). Apesar do relativo sucesso de todas essas abordagens, as que apresentam o maior poder discriminatório são, com certeza, a análise por microssatélites, por se tratarem de marcadores codominantes, abundantes, ubíquos e hipervariáveis (Schwenkenbecher et al., 2004); e a análise por RFLP do DNA do cinetoplasto, pois os números e padrões de fragmentos produzidos permitem uma discriminação refinada entre linhagens do parasita, devido a alta variabilidade de sequencia do DNA do cinetoplasto (kDNA) (Nicolas et al., 2002). Esta técnica tem sido usada com sucesso em diversas abordagens, sendo elas: comparação de linhagens isoladas de diferentes hospedeiros; diferenciação entre ciclos de transmissão zoonótico e antroponótico; identificação de novos genótipos em vetores e hospedeiros; identificação de genótipos relacionados a resistência de drogas; diferenciação entre casos de recidivas e re-infecção e detecção de epidemias (Schonian et al., 2010). Mais precisamente, a análise por RFLP dos minicírculos do kDNA apresenta maior poder de resolução quando aplicada no estudo da genética de populações de linhagens muito próximas, tanto geneticamente quanto geograficamente. (Laurent, et al., 2007; Nasereddin et al., 2009). Além disso, como as diversas espécies do gênero *Leishmania* se reproduzem de modo clonal, salvo raros eventos de reprodução sexuada, a identificação de linhagens muito próximas só é possível com marcadores moleculares com alto grau de polimorfismo (Barker, 2002).

1.3 DNA do Cinetoplasto

O DNA do cinetoplasto (kDNA) é o DNA mitocondrial dos protozoários tripanossomatídeos. Esse grupo de organismos unicelulares amplamente distribuídos na natureza inclui, por exemplo, o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.* que são patógenos humanos; *Phytomonas spp.* que infectam plantas; e *Crithidia fasciculata* que é um parasita de insetos.

O kDNA é uma das peculiaridades mais incomuns desses parasitas. É uma estrutura única na natureza, uma rede gigante de DNA consistindo de alguns milhares de DNAs circulares que são topologicamente interligados, sendo que cada célula apresenta uma rede de DNA dentro da matriz da sua única mitocôndria. Essa rede contém dois tipos de moléculas de DNA: minicírculos presentes em aproximadamente 10.000 cópias por célula e maxicírculos presentes entre 20 a 50 cópias (Shapiro e Englund, 1995).

Os maxicírculos são os homólogos funcionais de DNAs mitocondriais de outras espécies de eucariotos, e nas diferentes espécies de tripanossomatídeos variam em tamanho entre 20 a 40kb. Eles codificam RNAs ribossomais e várias proteínas envolvidas no metabolismo energético da mitocôndria. Os minicírculos compõem aproximadamente 90% da massa da rede de DNA do cinetoplasto, variando em tamanho entre 0,5 e 2,9 kb conforme a espécie. Eles são heterogêneos com relação a sequência, mas idênticos em tamanho numa mesma rede; a sua única função conhecida é codificar pequenos RNAs guia que controla o correto processamento ou edição dos transcritos dos maxicírculos; vale ressaltar que também os maxicírculos codificam alguns RNAs guia (Guilbride e Englund, 1998).

A expressão gênica mitocondrial do cinetoplasto é um evento notável, pois resulta na cooperação entre os transcritos funcionais dos maxicírculos e dos RNAs guia codificados na sua quase totalidade pelos minicírculos. Essa cooperação é necessária porque os transcritos dos maxicírculos são crípticos, ou seja, possuem diversas mutações de quadro de leitura que precisam ser corrigidas (editadas) para a correta tradução das proteínas funcionais.

Essa edição envolve a precisa inserção ou deleção de resíduos uridilatos em sítios internos dos transcritos dos maxicírculos; em alguns transcritos os resíduos de uridilatos incorporados no processo de edição chegam a constituir metade da sequência codificante. A especificidade da edição é controlada pelos RNAs guia codificados principalmente nos minicírculos que servem de molde para a inserção e deleção dos uridilatos; como existe uma edição extensiva de uma grande variedade de transcritos dos maxicírculos, vários RNAs guia são necessários, explicando o grande repertório de sequências de minicírculos presentes na rede de kDNA (Englund et al.,2005).

Além da região codificadora de RNAs guia, os minicírculos também apresentam uma região conservada (geralmente de 100 até 180 nucleotídeos e idêntica em todos os minicírculos de uma mesma rede de kDNA) que contém a origem de replicação. Dependendo da espécie de tripanossomatídeo, os minicírculos podem apresentar uma, duas ou quatro regiões conservadas. Quando presentes, as múltiplas regiões se apresentam posicionadas em 180° e 90°, respectivamente (Guilbride e Englund, 1998).

1.4 Sequenciamento do gene ortólogo ao fator de inibição de migração dos macrófagos (MIF) de *Leishmania infantum chagasi*.

O fator de inibição de migração de macrófagos é uma citocina que tem um papel importante na inibição da indução de apoptose em macrófagos (Calandra et al., 2003). Vários eucariotos primitivos codificam genes similares ao MIF que mostram similaridade com os genes MIF de mamíferos, entre eles os nematódeos *Brugia malayi* e *Ancylostoma ceylonicum* (Pastrana et al., 1998). Essas citocinas também foram descritas em protozoários patogênicos, entre eles *Eimeria spp*, *Plasmodium falciparum* e mais recentemente em *Leishmania major* (Kamir et al., 2008). Como o gene MIF codifica uma citocina imunomoduladora, e é encontrado em vários parasitas patogênicos ele pode ter um papel importante na resposta imune do hospedeiro frente à infecção por esses parasitas. Fatores homólogos ao MIF secretados em *L. infantum chagasi* podem então interferir na resposta imune do hospedeiro favorecendo o estabelecimento da infecção.

Em colaboração com o laboratório de pesquisa do Instituto de Doença Tropicais Natan Portella em Teresina-PI, chefiado pelo Dr. Carlos Henrique Nery Costa, foi realizado o seqüenciamento de dois genes de *L. infantum chagasi* homólogos ao gene do fator de inibição da migração de macrófagos humano (MIF) (número de acesso: NG_012099.1) para a pesquisa de mutações nas diferentes amostras testadas.

1.5 Sequenciamento do fragmento de ITS-1 de *Leishmania infantum chagasi*

Para o gênero *Leishmania*, a região de ITS-1 (internal transcribed spacer 1) do gene do RNA ribossômico tem sido amplamente estudada (Cupolillo et al., 2005; Schonian et al., 2003), e se mostra com um número adequado de polimorfismos para a distinção, pelo menos, ao nível de espécie. Em busca de um marcador genético em região não codificante no DNA nuclear de *L. infantum chagasi* foi realizado o seqüenciamento da região de ITS-1 em amostras de *Leishmania infantum chagasi* utilizadas neste estudo. Além disso, em um protocolo descrito por Schonian e colaboradores (2003), é possível o diagnóstico diferencial da maioria das espécies de *Leishmania* de importância médica pela digestão com a enzima de restrição *HaeIII* do fragmento amplificado por PCR da região ITS-1.

Objetivos

O presente trabalho tem como meta identificar possíveis variantes genóticas de *L.infantum infantum chagasi* presentes na área endêmica de Teresina no Estado do Piauí, e comparar com os genótipos encontrados em Campo Grande no Estado de Mato Grosso do Sul e Bauru no Estado de São Paulo. Além disso, um objetivo secundário seria identificar e eleger um marcador molecular robusto e com poder discriminatório para futuros estudos envolvendo a epidemiologia e a dinâmica de transmissão de *L.infantum chagasi* no Brasil.

Material e Métodos

3.1 Amostras e extração de DNA

O material de estudo para as análises preliminares com os marcadores microsatélites consistiu de 50 amostras de culturas de formas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* isoladas de pacientes de Teresina – PI, gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos Henrique Nery Costa do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela, e pela Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz, da Universidade Federal do Piauí. No caso do estudo utilizando o DNA do cinetoplasto, foram adicionadas ao trabalho 157 isolados de *L. infantum chagasi*, sendo 88 de Teresina, 54 de Campo Grande – MS, cedidos pelo pesquisador Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior da Universidade Federal do Mato grosso do Sul, e 15 amostras extraídas do banco de lâminas do Hospital Estadual de Bauru em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza. O DNA das formas promastigotas em culturas com o meio líquido Schneiders, e o das promastigotas em flebótomos infectados foi obtido por um processo simples de preparação do DNA com a resina Chelex® (Bio-Rad): Alíquotas de 1ml das culturas são transferidas para tubos de 1,5 ml e centrifugadas por 1 min a 10000 rpm, o sobrenadante é então descartado e a fase sólida da amostra ressuspendida em 1ml de uma solução contendo 10% (m/v) da resina diluída em água. Posteriormente a amostra é mantida aquecida por 15 min a 95 °C, e decorrido esse intervalo a amostra é novamente centrifugada por 1 min a 10000 rpm, o sobrenadante contendo o DNA é então cuidadosamente aspirado (de maneira que toda a resina permaneça no tubo de origem), e armazenado em um novo tubo a -20 °C até o momento do uso.

O DNA das formas amastigotas de amostras de medula óssea de cães foi obtido pela extração com o kit illustra blood genomicPrep mini spin (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras provenientes do banco de lâminas foram extraídas com o mesmo kit após a raspagem do material das lâminas com o uso de bisturis estéreis baseado no método descrito por Schonian e colaboradores (2003).

3.2 PCR para a genotipagem

Um painel composto de vinte e quatro pares de oligonucleotídeos descrito por Jamjoom et al., 2002, Schwenkenbecher et al., 2004; Ochsenreither et al. 2006, Kuhls et al. 2007 foi utilizado nas reações de PCR para a amplificação das regiões do DNA contendo marcadores microssatélites das amostras extraídas . As reações foram realizadas em um volume de 25µl contendo 1 mM de MgCl₂, 10mM tampão Tris – HCl (pH 8.3) contendo 50mM KCl, 0,3 pmol de cada um dos oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*), 0,1 mM de dNTPs, 1 unidade de *Taq* polimerase (GE Healthcare), 5µL da amostra de DNA, e água até completar o volume. As condições da reação são: 1 min a 95°C; seis ciclos de 30s a 95°C, 30s à temperatura de anelamento de cada par de oligos (listadas na tabela 1) e 45s a 72°C; seguidos de 26 ciclos de 30s a 92°C, 30s a temperatura de anelamento de cada par de oligos (listadas na tabela 1) e 55s a 72°C. . Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO BRL®) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

Tabela 1. Painel de oligonucleotídeos usados na genotipagem dos microssatélites.

Oligo	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	T_A (°C)
LIST7033	CATTGCTGAGTGCTGCTAGTG	ATGAGCGTACTGGGCACAC	58
LIST7036	CTCTCTCGTCACCACAGCAC	TCCCTCTCGTTGGTGAAGTT	58
GA2	GATCACAGCGACGTCTGAAG	CCTGCTGCCACCATCTTAGC	56
GA10	ACTCACTCCGTTGGGATGAT	CGCGCATATCTCTATCCACT	42
Li22-35	CTTGATGTTTCGGGTTAGCAAGT	ATGCACACCAAAAATCATGTG	52
Li23-41	GATCGGAGGTGACAGCGT	CCTTTAACTGCCAGTGCG	52
Li41-56	TTGCTTCATGATAACAACCTTGG	CCTGTTGGTGTGAGTTCGTG	50
Li45-24	GCGCCTACAGGCATAAAGGA	CTGGCGCATCAACGGTGT	54
Li71-5/2	GCACGGTCGGCATTGTGA	GATAAACGAGATGGCCGC	56
Li71-7	GCTGCAGCAGATGAGAAGG	GTGAGAAGGCAGGGATTCAA	50
Li71-33	CTCCTTTCACACCGCCTCT	GAGAGAAGACGAGCCGAAGT	50
Lm2TG	AAAAAGCGAGGAATGAAAGAA	TCCCTCCCCTCTACAACCTT	53
Lm4TA	TTTGCCACACACATACACTTAG	GTAGACGACATCGCGAGCAC	54
TubCA	GGCGTGGTTGCTAAACTGAT	GCCTGCGCACACAGAGAC	58
Li46-67	GATCCCTTCGGATTACTGC	CTGCTAGCGAGGGGATAGG	50
GA3	GCAGGGCGCACACATACCACA	CGCAGCTATTGTCGGCCCGG	53
GA1	TCGGAGTCACCTCGCACCGC	GGTGGGGCAGGTAAAGCGGC	56
GACA1	CTGCCTGCCTGTCCGTGCCT	GGAGAAGAAGAAATGGTGAG	60
GTG3	TAGAGTGACATCAGGGAGGG	GCCGACAGCGTCGTCTGCCG	54
LIST7035	AAAGGTATGATACGCCTGTGG	ACCGCAAAGAACGGACAT	58
CS19	TGCAGCAGATGAGAAGGAAA	GTGAGAAGGCAGGGATTCAA	56
CS20	CGTTGGCTGTTGATTGTGTA	GCGTGGCAATCTCCTCATT	56
LIST7031	CCACTGGTGGAAATAGAAAGACT	GGAGAACTAAAACGAGCAGCA	58
LIST7039	CTGGCACTCTTTCGCTCTTT	GAGACGAGAGGAACGGAAAA	58

Os oligonucleotídeos que apresentaram boa consistência foram então testados quanto ao grau de polimorfismo dos seus produtos de amplificação através de eletroforese em gel, utilizando a agarose de alta resolução MetaPhor (Cambrex) na concentração de 3%, conforme recomendação do fabricante. 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO BRL®) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

3.3 Genotipagem dos Fragmentos Amplificados

Dez pares de oligonucleotídeos foram novamente sintetizados e desta vez conjugados com fluorescência para a realização de uma análise comparativa, quanto ao tamanho amplificado, em gel de poliacrilamida a 5% no aparelho de sequenciamento automático ABI 377 (Applied Biosystems), utilizando-se o programa GeneScan® e o padrão de tamanho ROX - 500 ® (Applied Biosystems). A escolha dos oligos se deu com base nos polimorfismos observados dos produtos amplificados em gel com a agarose MetaPhor, e no número de alelos observados para cada oligo nos trabalhos de referência: Li45-24, CS19, CS20, Li22-35, Li23-41, Lm2TG, Li41-56, Li71-33, LIST7039, Li71-7.

Para a genotipagem foi realizada uma nova rodada de amplificações por PCR, agora com os oligos fluorescentes, idêntica a já descrita anteriormente. 2µl dos produtos amplificados foram diluídos em 58µl de água, e 3µl da diluição foram adicionados a 2µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25mM EDTA pH 8,0 contendo 50mg/ml Blue Dextran) (5:1) e a 0.5µl de ROX - 500 ® (Applied Biosystems) . No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM ® 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 min e rapidamente transferidas para o gelo.

3.4 PCR-RFLP do DNA do Cinetoplasto (kDNA)

Para as análises do DNA do cinetoplasto foram utilizadas 157 isolados de *Leishmania infantum chagasi*, dentre estes, 98 amostras de cultura iniciadas com material biológico de pacientes humanos (44 de Teresina e 54 de Campo Grande), 42 amostras frescas utilizadas diretamente de aspirados de medula óssea de cães de Teresina, 2 amostras de flebotomíneos infectados, ao se alimentares em alguns cães (todos de Teresina) utilizados como fonte de amostra para esse mesmo estudo e 15 amostras de aspirados de medula de Bauru. As reações de PCR para a amplificação foram realizadas com os oligos LINR4 e LIN19 (Aransay et al., 2000) gerando um fragmento amplificado de 720 pb que representa quase a totalidade do minicírculo. As reações foram realizadas em um volume de 50µl contendo 1 mM de MgCl₂, 10mM tampão Tris – HCl (pH 8.3) contendo 50mM KCl, 0,3 pmol de cada um dos

oligonucleotídeos (*forward* e *reverse*), 0,1 mM de dNTPs, 1 unidade de *Taq* polimerase (GE Healthcare), 5µL da amostra de DNA, e água até completar o volume. As condições da reação são: 3 min de desnaturação inicial a 94 °C; trinta e três ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 58 °C e 1min a 72 °C; seguido de 10min de extensão final a 72 °C. Posteriormente os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO BRL®) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV. Antes da digestão os produtos de PCR foram precipitados da seguinte forma: adicionou-se aos produtos 100µl de etanol 95%, com incubação a T.A. por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM por 25 min a T.A. O etanol 95% foi então removido por inversão dos tubos e, a seguir, adicionou-se 200µl de etanol 70% e centrifugou-se a 10000 RPM por 5 min a T.A. O pellet foi então ressuscitado em 20µl de água e quantificado com o uso de espectrofotômetro Nanodrop. As leituras das quantificações variaram de 340 a 558 ng/µl de DNA, sendo que as quantidades utilizadas nas digestões foram padronizadas em 1000 ng de produto de PCR, com o intuito de garantir de que cada amostra utilizada tivesse a mesma quantidade de DNA inicial na digestão. Os produtos foram então digeridos com as enzimas de restrição *RsaI*, e *HpaII* separadamente (Promega) sob o seguinte protocolo: em um volume final de 20µl da reação foram adicionados 12,3µl de água estéril, 2µ do tapão de reação 10X, 0,2µl de BSA acetilada (10µg/µl), 0,5µl de cada enzima de restrição (10u/µl) e 5µl do produto de PCR ressuscitado. A reação foi colocada então em bloco aquecido a 37 °C por 2 horas. Decorrido o tempo de digestão, o volume total da reação (20µl) foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose de alta resolução Metaphor 3% (FMC BioProducts) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 110V por 2 horas as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

Os fragmentos gerados na digestão foram utilizados na construção de uma matriz binária (1 indica a presença de um fragmento e 0 a ausência), que foi convertida numa matriz de distância com o uso do programa RESTDIST, que por sua vez, foi utilizada na construção de um dendrograma pelo método de UPGMA com a utilização do programa NEIGHBOR (ambos os programas fazem parte do pacote de programas PHYLIP, versão 3.6, disponível em:

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). A árvore fenética resultante foi construída com o programa TREEVIEW versão 1.

Além da metodologia descrita acima, outra abordagem foi utilizada na análise por PCR-RFLP do DNA do cinetoplasto. Um fragmento de 447pb da região variável de uma classe de minicírculos específica para o complexo *L. donovani* foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos MC1 (GTTAGCCGATGGTGGTCTTG) e MC2 (CACCCATTTTTCCGATTTTG) (Cortes et al, 2004). Após a amplificação os produtos foram digeridos com as enzimas de restrição RsaI, e HpaII conforme protocolo descrito acima. Este método foi testado porque produz um padrão de fragmentos menos complexo para diversas enzimas de restrição, permitindo uma comparação mais simples e direta nas amostras analisadas conforme Cortes e colaboradores (2006).

3.5 Sequenciamento dos genes MIF de *Leishmania infantum chagasi*

Para o seqüenciamento foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos; MIF1740 (ATGCCGGTCATTCAAACG e CTCTGGTTTGCCGAGTACA) e MIF1750 (ATGCCGTTTCTGCAGAC e AGTCATCACGAAGTCCTC), fornecidos pelo Dr. Carlos Henrique Nery Costa, juntamente com 77 amostras dos produtos de PCR amplificados para os genes MIF1 (número de acesso: XM_001468253.1) e MIF2 (número de acesso: XM_001468252.1), o tamanho dos fragmentos para ambos os genes são de 370 pb. Os produtos foram purificados enzimaticamente com o kit ExoSAP-IT (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, 5µl dos fragmentos purificados foram utilizados na reação de seqüenciamento. As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) utilizando-se 4µl de 2,5X Save Money (400mM Tris-HCl pH9,0, 10mM MgCl₂), 4µl de BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 pmol dos oligonucleotídeos, e 4µl do DNA genômico a 5ng/µl. As reações de seqüenciamento foram realizadas com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4, com rampa de 1°C/seg, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas

a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o *primer forward* e outra para o *reverse*. A cada reação de seqüenciamento foram adicionados 80µl de isopropanol 65%, incubando a T.A. por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 RPM por 25 min a T.A. O isopropanol foi então removido por inversão dos tubos e, a seguir, adicionou-se 200µl de etanol 70% e centrifugou-se a 10000 RPM por 5 min a T.A. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas em T.A. e o DNA foi eluído em 2µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25mM EDTA pH 8,0 contendo 50mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em seqüenciador automático ABI PRISM ® 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 3 min e rapidamente transferidas para o gelo.

As seqüências de bases geradas automaticamente foram alinhadas com auxílio do programa MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) e analisadas com auxílio do programa CLUSTAL X, e então comparadas com outras disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.6 Sequenciamento do fragmento de ITS-1 de *Leishmania infantum chagasi* e diagnóstico específico por RFLP

Em busca de um marcador genético no DNA nuclear de *L. infantum chagasi* foi realizado o seqüenciamento da região de ITS-1 (internal transcribed spacer 1) do gene do RNA ribossômico, em 50 amostras de isolados de *L. infantum chagasi*. Para o gênero *Leishmania*, a região de ITS-1 tem sido amplamente estudada, e se mostra com um número adequado de polimorfismos para a diferenciação, pelo menos, ao nível de espécie. Para a amplificação por PCR foram utilizados os pares de oligonucleotídeos LITSR e L5.8S segundo Schonian e colaboradores (2003). O protocolo de seqüenciamento foi idêntico ao descrito anteriormente para os genes MIF.

Sempre que foi necessária, a confirmação de espécie se deu seguindo ainda o protocolo de Schonian e colaboradores (2003), foi realizada a digestão do produto de PCR

amplificado com os oligos LITSR e L5.8S com a enzima *HaeIII* conforme protocolo descrito no item 3.4

3.7 Clonagem e sequenciamento de minicírculos do DNA de cinetoplasto *Leishmania infantum chagasi*

Para a confirmação de que as reações de PCR baseadas no kDNA de *Leishmania infantum chagasi* estavam realmente amplificando a região pretendida, decidimos seqüenciar os produtos amplificados. Como existem várias seqüências de minicírculos diferentes em cada parasita foi necessário clonar os produtos, conforme protocolo abaixo.

3.7.1 Ligação

A ligação foi realizada com o kit InstAclone PCR cloning Kit (Fermentas) . Para cada amostra a ser seqüenciada foi montada uma reação contendo: 3 µL do vetor, 6 µL do Tampão de Ligação 5X, 5 µL do produto de PCR , 5 µL de água ultrapura autoclavada e 1 µL de T4 DNA ligase. As reações foram mantidas em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf AG, Germany) a 22°C por 16 horas, seguidas de 10 minutos a 65°C para inativação da enzima T4 ligase.

3.7.2 Preparação de Células Competentes

Com a ajuda de um palito estéril, pequenas alíquotas de culturas de diferentes cepas de *E. coli* (DH5α, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, USA); BL21(DE3)CodonPlus, BL21(DE3)CodonPlus-RP, ArcticExpress™(DE3) (Stratagene, USA); Rosetta(DE3) (Novagen, USA); BL21(Invitrogen, USA) ou BL21-SI™(Life Technologies) mantidas em placas com meio LB/ágar ou em cultura permanente a -80°C, foram inoculadas em 3 mL de meio líquido SOB (Tryptona 2%, Extrato de levedura 1%, NaCl 17 mM, MgCl₂ 10 mM e KCl 5 mM) e incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm por 14 horas. Após este período, 500 µL destas culturas foram usados para inocular 50 mL de meio SOB os quais foram incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm até atingir a absorbância de 0,6 a 600nm. As culturas foram então mantidas no gelo

por 15 minutos e adicionadas de 1 mL de $MgCl_2$ 1 M previamente filtrado. A seguir, as células foram centrifugadas a 4000 x g por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram desprezados. Os precipitados de células foram ressuspensos em 20 mL de solução gelada de KCl 100 mM, $MnCl_2$ 50 mM, KAC 30 mM pH 6,9, $CaCl_2$ 10 mM, glicerol 15%, pH 5,8 e incubadas no gelo por mais 15 minutos. Procedeu-se então nova centrifugação a 4000 x g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos com 2 mL da solução gelada de NaMOPS 10 mM pH7,0, KCl 10 mM, $CaCl_2$ 74 mM, glicerol15%, pH 6,2. Porções de 100 μ L destas preparações foram transferidas para microtubos de 1,5 μ L e armazenadas a -80°C.

3.7.3 Transformação

Os plasmídeos contendo os insertos de interesse foram primeiramente utilizados para transformar células de *E. coli* DH 5 α . Para cada reação de transformação foram utilizados 100 μ L de células competentes e o volume total da reação de ligação (30-40 μ L) ou entre 100 e 200 ng de DNA plasmidial. As reações foram incubadas por 30 minutos em gelo, e posteriormente submetidas a um choque térmico de 90 segundos a 42°C seguidos de 5 minutos em gelo. A seguir, as células foram recuperadas por 1 hora a 37°C sob agitação (180 rpm) após a adição de 800 μ L de meio LB líquido sem antibiótico. As reações de transformação foram então plaqueadas em meio LB/ágar contendo ampicilina 100 μ g/mL. As placas foram mantidas a 37°C por 16 horas. Como controle negativo foram utilizadas as reações de ligação contendo somente os plasmídeos sem inserto, e como controle positivo amostras de plasmídeos fechados.

3.7.4 Sequenciamento dos clones

Após o crescimento das bactérias transformadas, foi realizado o PCR diretamente de colônias individuais com os primers LINR4 e LIN19 para a confirmação do inserto. As amostras positivas para o inserto foram então seqüenciadas utilizando o mesmo par de oligos (LINR4 e LIN19) conforme o protocolo descrito no item 3.5.

Resultados

4.1 PCR para a genotipagem

Dos 24 pares de primers testados, 18 apresentaram um único produto do tamanho esperado, entre 80 e 180 pb (Figura 3). Os 6 restantes, oligos: Lm4TA, LIST 7035, GA3, GA1, GACA e GTG3 apresentaram dois ou mais produtos (Figura 4), ou bandas de tamanho muito maior do que o esperado (Figura 5). Portanto, do painel inicial de 24 oligos, 18 foram utilizados para os experimentos posteriores.

M 1 2 3 4 5 6 NO

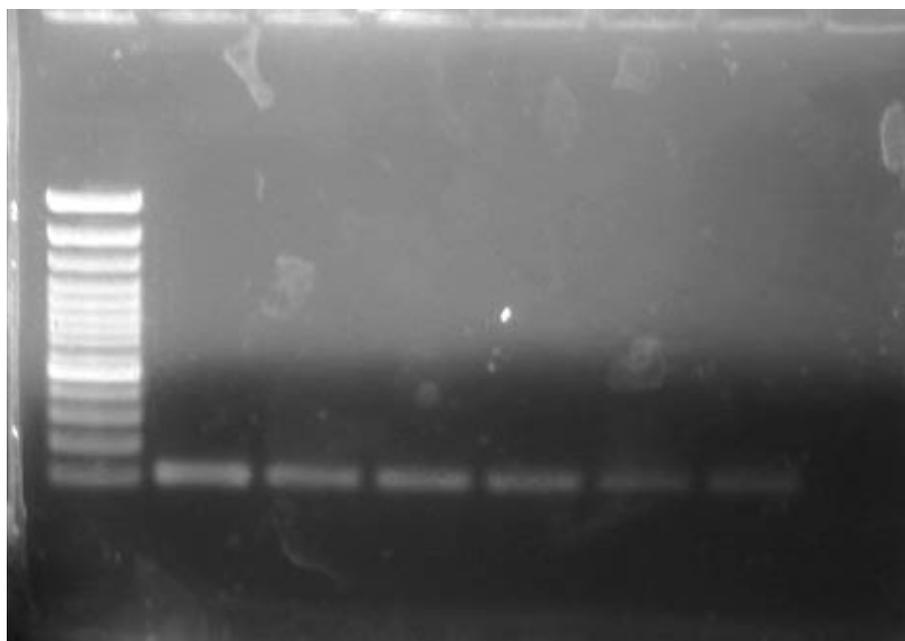


Figura 3. Reação de PCR com oligo Li45-24. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 6 correspondem ao produto da amplificação pelo oligo Li45-24 em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina; (NO) controle negativo.

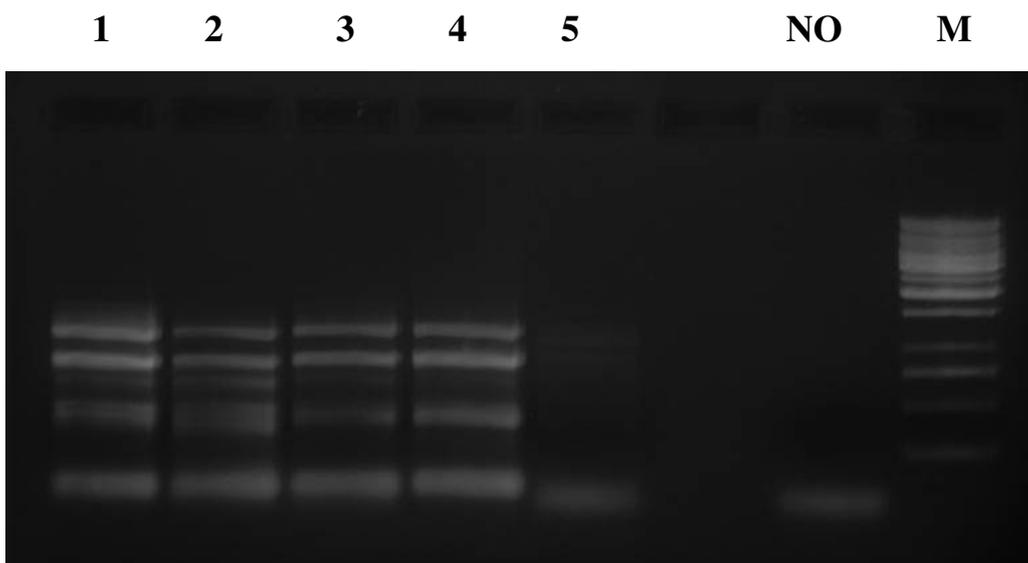


Figura 4. Reação de PCR com oligo GACA1. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 5 correspondem ao produto da amplificação pelo oligo GACA1 em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina; (NO) controle negativo.

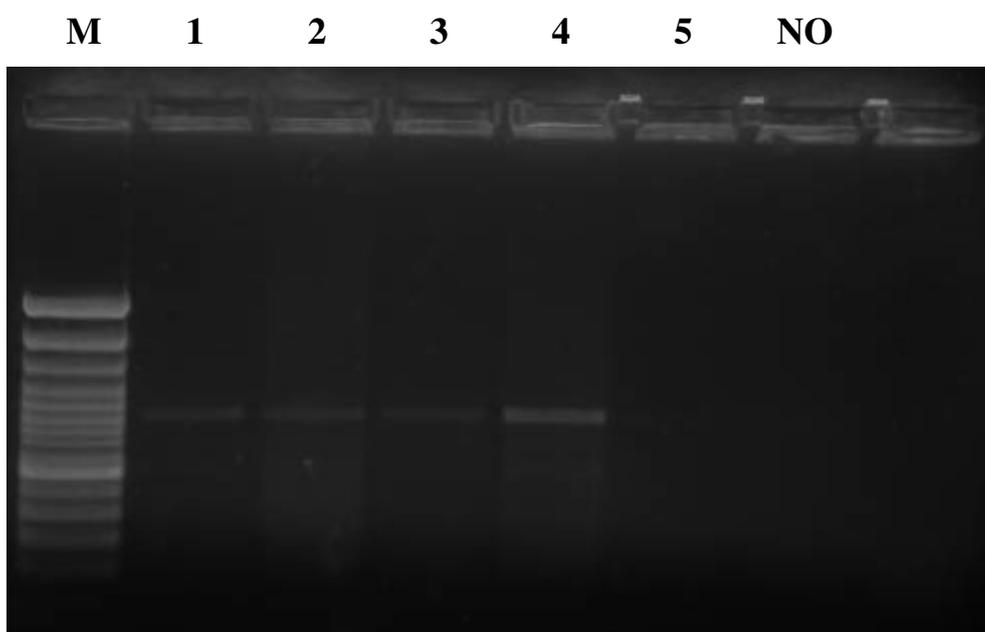


Figura 5. Reação de PCR com oligo GA3. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 5 correspondem ao produto da amplificação pelo oligo GA3 em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina; (NO) controle negativo.

Para o teste de polimorfismo quanto ao tamanho, todos os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel com a agarose de alta resolução MetaPhor. Porém, a utilização dessa agarose não conferiu a reprodutibilidade esperada. Como a agarose deve ser utilizada em alta concentração (3-4%) durante o processo de solidificação, freqüentemente, ocorrem deformidades em vários pontos do gel, o que resulta numa migração diferencial em regiões distintas do gel, acabando por confundir os resultados obtidos, ou seja, fica difícil inferir se a variação de tamanho das bandas se deu por uma diferença real de tamanho entre as bandas, ou se ela se dá por um artefato da técnica (Figura 6). Contudo, para um único oligonucleotídeo testado (Li45-24) o resultado observado foi consistente (Figura 7), o que foi comprovado posteriormente na genotipagem pelo seqüenciador automático.

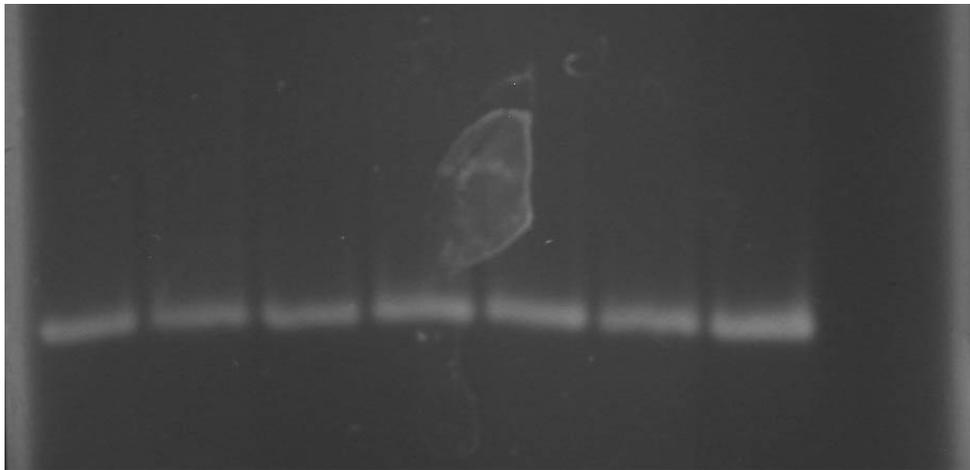


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose de alta resolução MetaPhor dos produtos amplificados pelo oligo Li23-41 em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chaqasi* de Teresina.

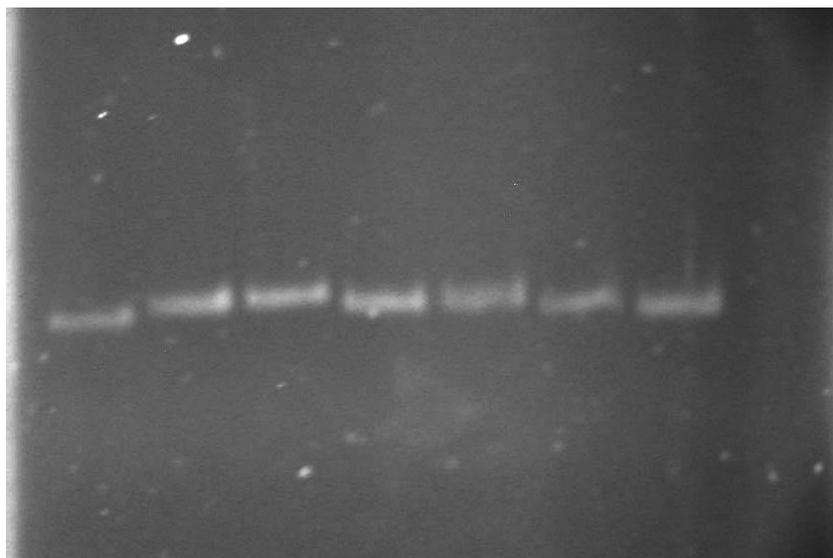


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose de alta resolução MetaPhor dos produtos amplificados pelo oligo Li45-24 em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina.

4.2 Genotipagem dos Fragmentos Amplificados em Seqüenciador Automático

O primeiro oligonucleotídeo a ser testado no seqüenciador automático foi o oligo Li45-24, que já havia mostrado polimorfismo quanto ao tamanho na análise por eletroforese utilizando agarose de alta resolução. O polimorfismo foi confirmado na genotipagem no seqüenciador, porém somente dois alelos com tamanhos diferentes foram observados (Figura 8). Outros 9 oligonucleotídeos foram testados; CS19, CS20, Li22-35, Li23-41, Li71-7, Li71-33, Lm2TG, Lm4TA, TubCA, porém todos foram monomórficos.

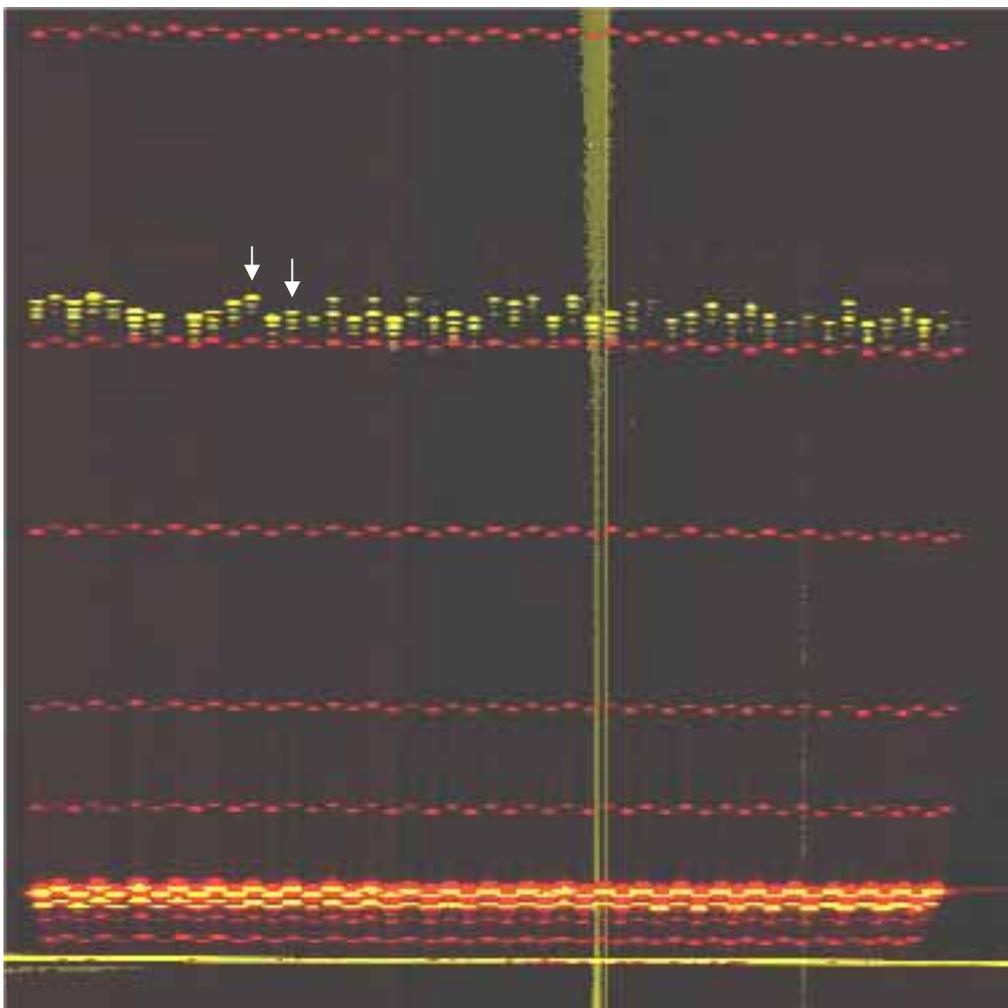


Figura 8. Imagem do gel obtida da genotipagem em seqüenciador automático com o oligo Li45-24. Marcações em vermelho mostram o padrão de tamanho ROX-500, marcações em amarelo mostram os alelos gerados pelo oligo conjugado com fluorescência. As setas indicam pelo menos dois alelos de tamanhos diferentes.

4.3 Sequenciamento do gene ortólogo ao fator de inibição de migração dos macrófagos e da região de ITS-1 de *Leishmania infantum chagasi*

O seqüenciamento dos genes MIF1 e MIF2 não revelou nenhum polimorfismo presente nas 77 amostras testadas. Como os genes em questão estão envolvidos com a resposta imune do hospedeiro e com estabelecimento da infecção, foram comparadas as sequencias dos genes entre os parasitas isolados graves com as de casos não complicados de Leishmaniose Visceral; ainda assim, nenhum polimorfismo foi achado. As sequencias da região de ITS-1 também se mostraram idênticas em todos os isolados analisados e com 100% de similaridade com as sequencias de *L. infantum* depositadas no GenBank.

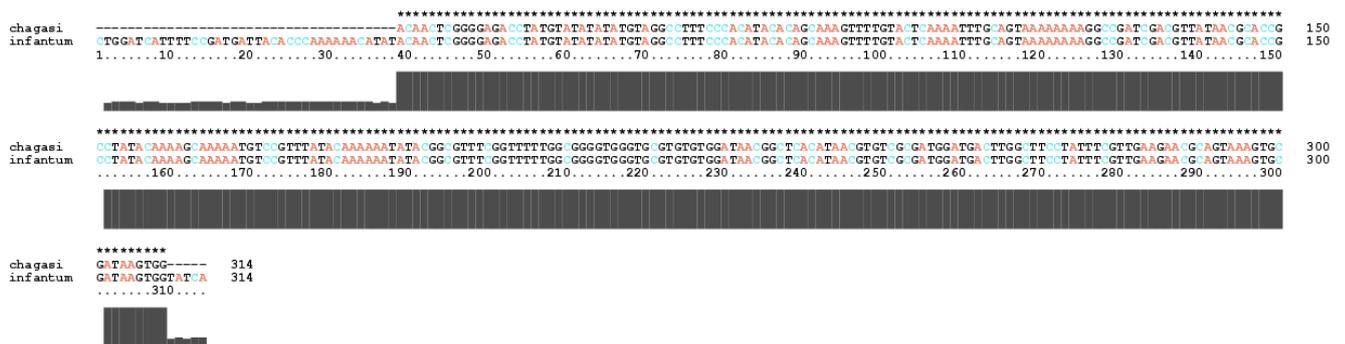


Figura 9. Alinhamento das sequencias de ITS-1 obtidas no estudo. chagasi: sequencias obtidas nas amostras analisadas no estudo. infantum: sequencia obtida no GenBank para *Leishmania infantum*

4.4 PCR-RFLP do DNA do Cinetoplasto (kDNA) com os primers MC1 e MC2

Os fragmentos de kDNA de interesse foram amplificados com sucesso a partir dos oligos MC1 e MC2, gerando um fragmento de 447 pb (Figura 9). Tanto a digestão com a enzima *RsaI* (figura 10) quanto a digestão com *HpaII* (figura 11) geraram apenas um único padrão de digestão para todas as 50 amostras provenientes de Teresina testadas.

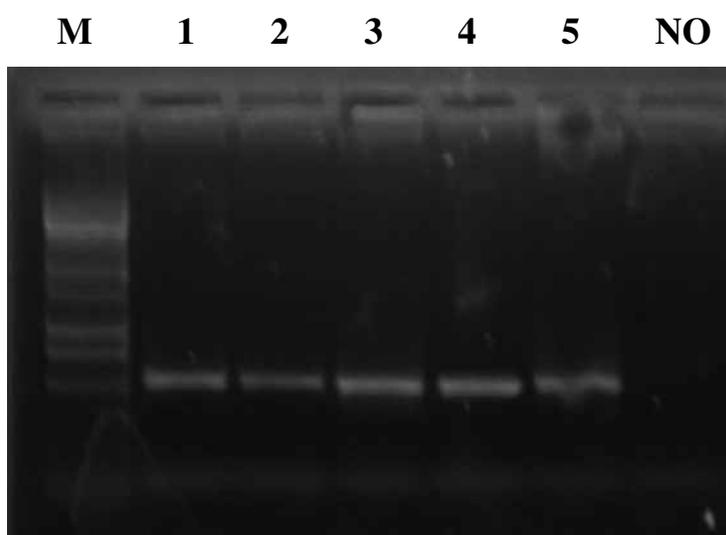


Figura 10. Reação de PCR com os primers MC1 e MC2. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 5 correspondem ao produto da amplificação em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina; (NO) controle negativo.

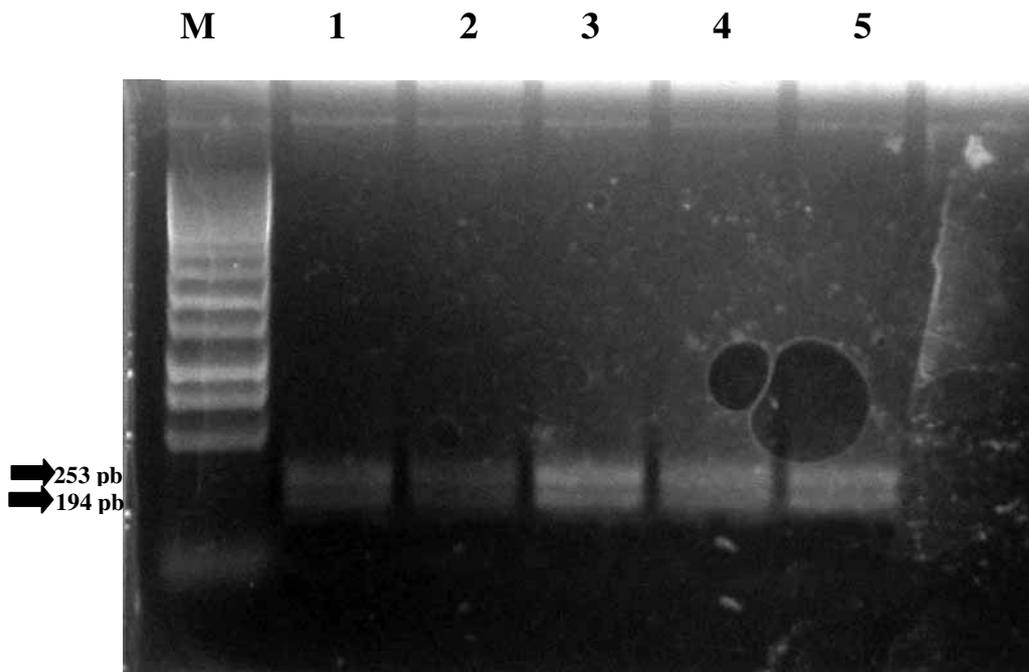


Figura 11. Reação de digestão com a enzima *RsaI* dos produtos de PCR amplificados com os primers MC1 e MC2. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 5 correspondem a digestão dos produtos amplificados em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina.

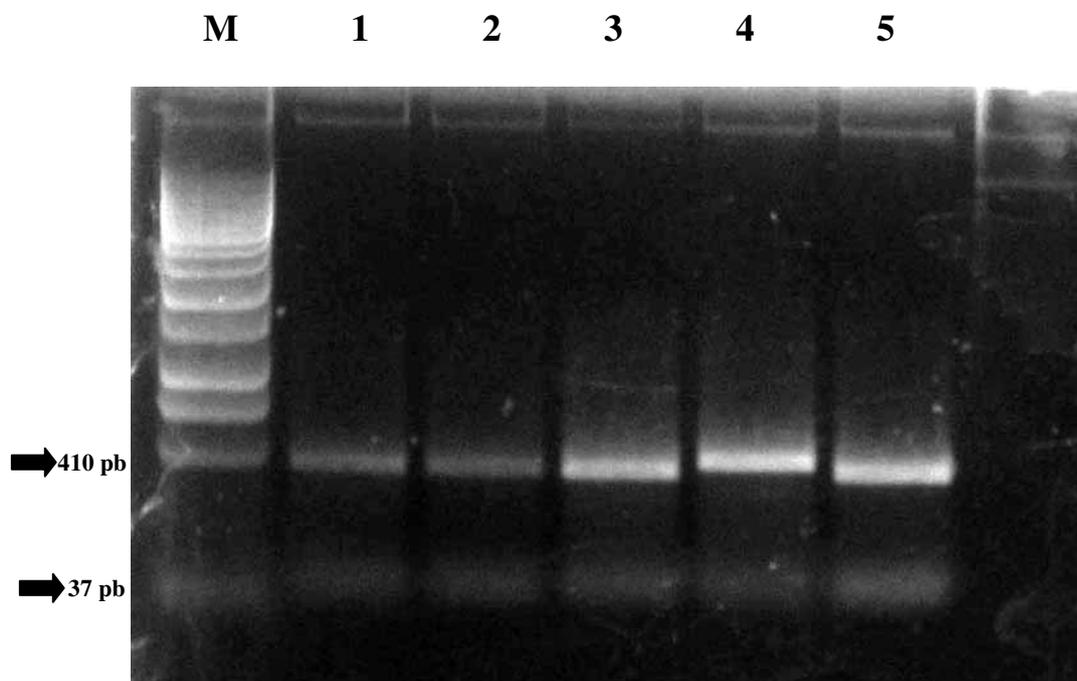


Figura 12. Reação de digestão com a enzima *HpaII* dos produtos de PCR amplificados com os primers MC1 e MC2. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 5 correspondem a digestão dos produtos amplificados em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina.

4.5 PCR-RFLP do DNA do Cinetoplasto (kDNA) do minicírculo completo

Os fragmentos de kDNA de interesse foram amplificados com sucesso a partir dos oligos LinR4 e Lin19 utilizados no estudo (Figura 12). A análise por RFLP dos minicírculos do DNA do cinetoplasto no nosso estudo, também se mostrou eficiente na detecção de padrões de restrição distintos entre as amostras (Figura 13). Como os produtos abaixo de 100 pb podem ser confundidas com dímeros de primers e as bandas acima de 700 pb podem ser confundidas com produtos não digeridos, apenas as bandas dentro desta faixa foram utilizadas na análise por RFLP. A figura 14 mostra a representação dos padrões mais comuns obtidos de áreas geográficas diferentes. Pode-se notar que para as amostras de Bauru um padrão bem distinto dos demais foi observado.

As 157 amostras testadas, gerando 28 fragmentos consistentes e distintos, resultaram em 72 genótipos únicos mostrados na árvore fénetica ilustrada na figura 15.

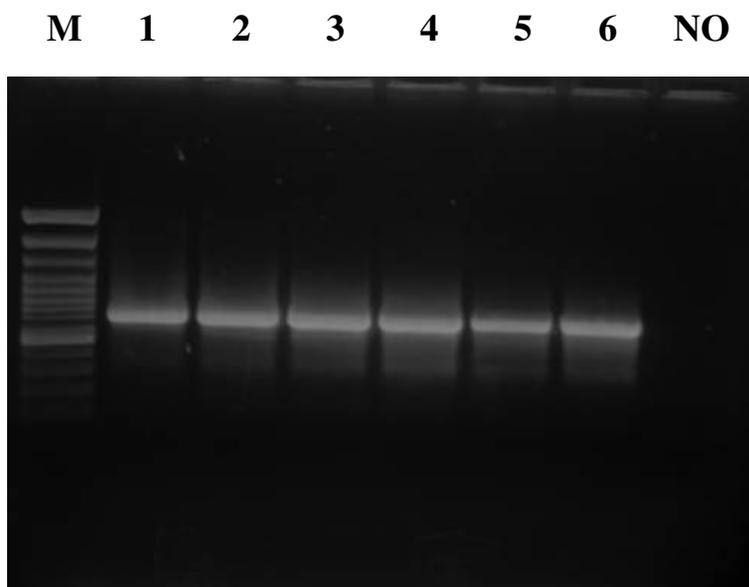


Figura 13. Reação de PCR com os oligos LINR4 e LIN19. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 6 correspondem ao produto da amplificação de 720 pb em diferentes amostras de isolados de *L.infantum chagasi* de Teresina; (NO) controle negativo.

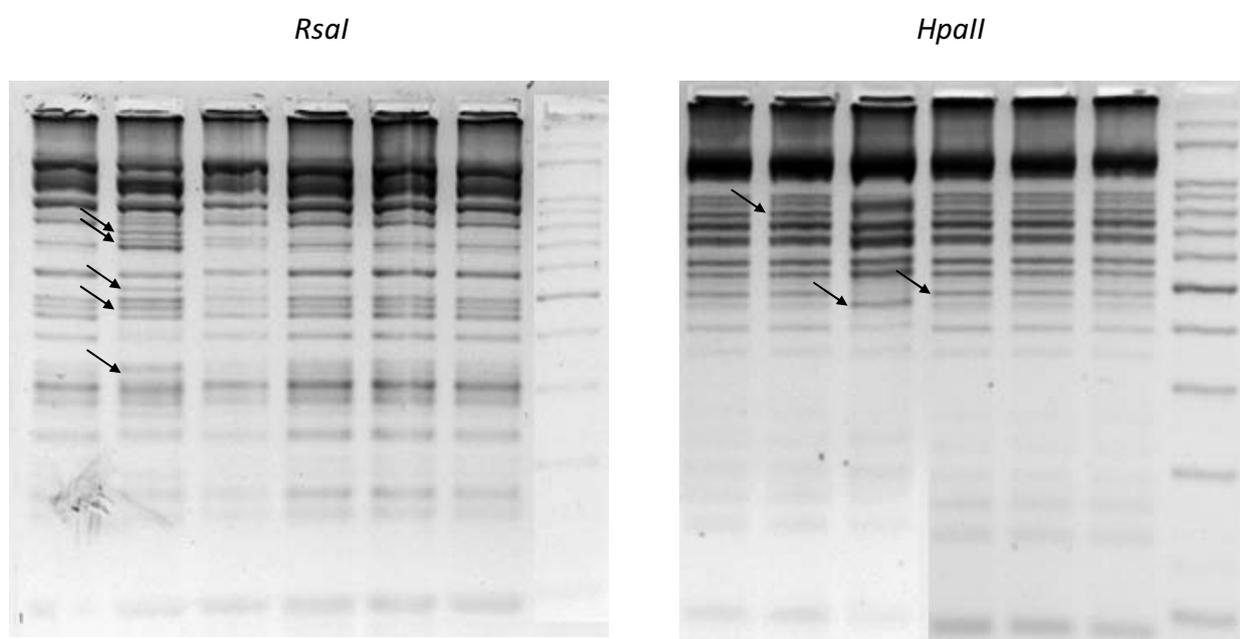


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose da reação de digestão com as enzimas de restrição *RsaI* e *HpaII*. As setas mostram algumas diferenças nos fragmentos gerados pela digestão. O ultimo poço no gel, para as duas enzimas mostram um ladder de 50 pb.

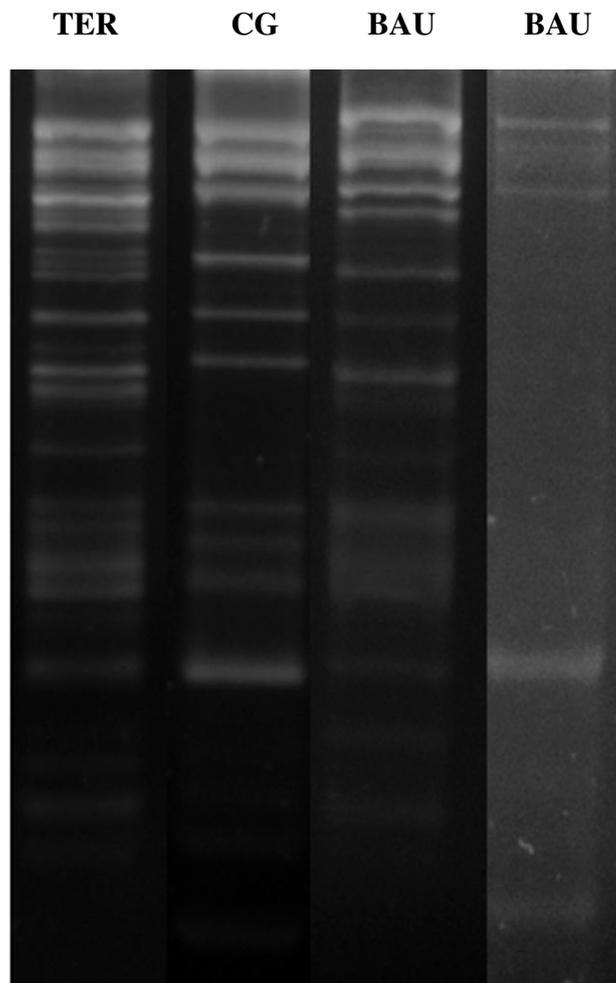


Figura 15. Padrões de RFLP representativos de cada localidade, com destaque para os dois padrões bem distintos encontrados nas amostras de Bauru. TER: Teresina; CG: Campo Grande e BAU: Bauru.

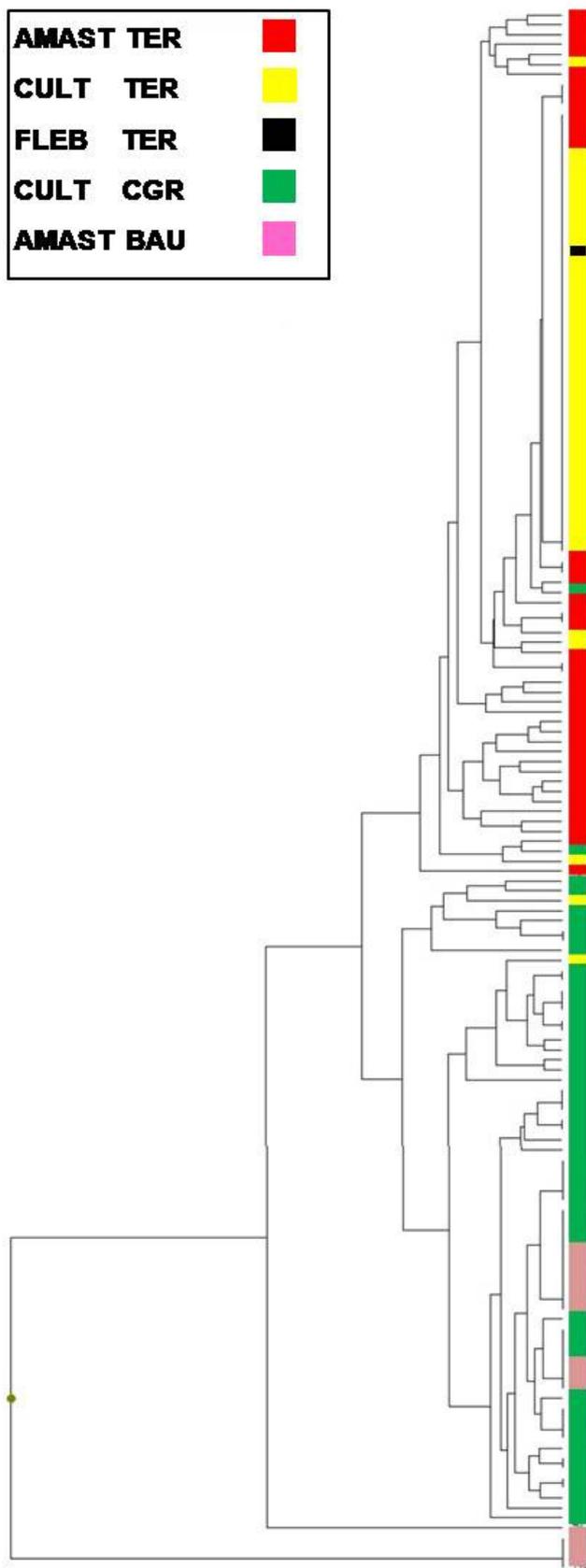


Figura 16. Arvore fenética (UPGMA) construída com os dados de RFLP do kDNA e mostrando a distribuição de 157 isolados de *Leishmania chagasi*.

4.6 Sequenciamento dos clones dos minicírculos do DNA do cinetoplasto de *Leishmania infantum chagasi*

O seqüenciamento dos clones confirmou que as reações de PCR realmente estavam amplificando o kDNA de *Leishmania infantum chagasi*. Porém, além da homologia com as sequencias de minicírculos, várias sequencias apresentaram homologia com regiões cromossômicas de *Leishmania*; particularmente com o cromossomo 27 (Tabela 2).

Tabela 2: Sequencias dos clones analisados de *L. infantum chagasi*. As sequencias em vermelho depositadas são as que anteriormente apareciam com homologia às anteriormente encontradas no estudo e foram substituídas em fevereiro de 2011.

Amostra	Acesso BLAST	Descrição	query coverage	max ident
LTG 1	AJ275334.1	<i>Leishmania infantum</i> kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	98%
	FR799614.1	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	85%
LTG 2	AJ010076.2	<i>Leishmania donovani</i> kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, clone 18	21%	92%
	FR799614.1	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome 27	69%	85%
LTG 5	AF291093.1	<i>Leishmania infantum</i> kinetoplast minicircle sequence	33%	79%
LTG 6	AF169138.1	<i>Leishmania chagasi</i> kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	100%	99%
LTG 34	AJ010081.1	<i>Leishmania donovani</i> kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 12	100%	97%
	FR799614.1	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome 27	23%	84%
LTG 36	AJ270147.1	<i>Leishmania</i> sp. kinetoplast minicircle DNA, isolated parasites	20%	91%
	FR799614.1	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome 27	19%	90%
LTG 37	AF190882.1	<i>Leishmania infantum</i> isolate MHOM/ES/81/LEM307 kinetoplast minicircle	22%	90%
	FR799614.1	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	100%
LTG 41	AF169138.1	<i>Leishmania chagasi</i> kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	100%	99%
LTG 42	AJ010076.2	<i>Leishmania donovani</i> kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, clone 18	100%	72%
	FR799614.1	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20%	97%

Foram encontradas sequencias com até 100% de identidade com sequencias depositadas para o cromossomo 27 de *Leishmania infantum*, porém, em fevereiro de 2011 as sequencias depositadas para o genoma de *L. infantum* foram substituídas por novas sequencias. Nesse novo genoma, várias sequencias obtidas nesse estudo, não aparecem mais com a similaridade encontrada anteriormente, conforme mostra a tabela x nas sequencias em vermelho.

A figura 16 mostra a região cromossômica anotada anteriormente para *L. infantum*, com destaque para a região de homologia com uma sequencia de minicírculo encontrada no estudo. A figura ainda destaca a posição dos primers LINR4 e LIN19 e primers adicionais em que buscamos, sem sucesso, amplificar e seqüenciar um fragmento de 2.255 pares de base dessa região cromossômica.

ATCACCCCAAACCCAGGGCTATAGCCAACCGAGGCCACCATTATAGCCAACCACCAATGTCCAAAGGTCTCCACA
 AAAAGCAGCCCAGCGGAAACCACCAAACTTCCAACAGCAACCGCAAAAATAAAGCCCAAGAAGCCCATTCCAAGCCA
 CCCAAGCTAGAACACCCAAAATAAAGCCGCGAGACCCAGGGTTTCAGGCCAATCCAGCCCAGGGGAGCCAATTTCC
 GGCCACCACCCGCGCCTATTTTACACCAACCCAGTTTTCCGCCCGAATTCATTTTGGTATTTTGGCCCTTTT
 TTGAACGGGATTCTGCACCCATTTTCGGTTTTTCGCAGAACGCCCTACCCGAGGACCAGAAAAGTTTGAAAATT
 TCGGCAGTTTTCGGCCATTTTGGTTTTTCAGCCACTTCCACCCAACCCTCCAACAAAAATTCAATTTTACTGTTT
 TACAGTCTTCTGTAGGAATAGCTTGTACACCAGATCAGTCTAGTCAATATCATAGCATATAACACAAAACTTACGACTT
 ACAAAAATTAACGCGAAAGATACTCTATACGACGACTCTAGATTAACTATACGAAGACTATTCCTATGTACCATCTGAA
 CAGTGTCTTCTATTATATAATAAGCATGCGAGTTACTACOGAACTCTTGTATAGTGTCCTAAGCGGAATACCCAAAC
 CTATCATAATATATATAATAATAAAGTAAAGCAAGGCAAAATGCCATCCACCAACAACCCACCCCTAACAGTCTCTA
 CGCAGCCCTCAAAAAGTTATCCAACGTTCAAACCTCAAGATCACCCAAAACCCAGGGCTATAGCCAACCGAGGCCACC
 ATTTATAGCCAACCACCAATGTCCAAAGGTCTCCACAAAAAGCAGCCAGCGGAAACCACCAAACTTCCAACAGCAA
 CCGCAAAAATAAAGCCCAAGAAGCCCATTCCAAGCCACCCAAGCTAGAACACCCAAAATAAAGCCGCCAGACCCAGG
 GTTTCAGGCCAATCCAGCCCAGGGGAGCCAATTTCCGCCACCACCCAAGTGATCAATACGAAGGAAAATCGCCAA
 AAACAAAGCAGCAGCCAATATCAAAATTCAAACCGCAAAACAATCCTCCAGGCCAGGGTTTCAGCCAATCCAA
 CCCAGGGGAGCCAATTTCCAACCCACCCGGCCCTATTTACACCAACCCAGTTTTCCGCCCGCAATCCAAAA
 ATGGCAATTTTGGTCAAAAATGAACGGGATTTCTGCACCCATTTTCGGATTTCGCAGAACGCCCTACCCGGAGG
 ACCAGAAAAGTTTGGATTTTGACCGATTTTGCAATTTCTCCCCGAACCCCTACAGCCCAACGAACCACACAAC
 AATCTGCTCCGACACACTCAGCTCAACCCTTCAAGTTCAACCGTAAAGAGCGTAAGCTTAAGTACATTACAA
 GCTACAGTAACACTACACAATTTTAGGTATAATAATACATGGCAATACAACGGTAAGGTAACAATAGCATCTATATAGA
 CTACATTTACGTTATAATAGATATCTAATACACTTACTGTATACTAGATAATAAACATATTCCTAAGGCAAGGGAAGCT
 AATAGCCCCAAATGCTAGCAAAAGCCCTAATAATAAGAATATTCTATTATCAAGGCAAAACCCTACGTCAATCACCT
 CCAACCCCAAACCTCAAACGCTAGTATCCACCATCCAATCAACCAACGCCACATCCAACCCGAACCTAAAATTCAA
 CTCCAACCGACCCATAGATTATAAAACATTATCACAATAACCCACACCACATACCTGAAGAGTCGGCGGCACCCAC
 CAAGTGATCAATACGAAGGAAAATCGCCAAAAACAAGCAGCAGCCAATATCAAAATTCACCCACGCAAAAACAAT
 CCTCCAGGCCAGGGTTTGAAAAGGCTCTGCGTGAGATTATGGAGCTGCTAGAGAGAAAATGCCACCATGCGTCCG
 ATATGAAGCGGTTCTAGTCTCTGCGACTATCACAGAGGGGTTGAGCGACTGTGCGACTTTGCGCTGCGCAGGAA
 CATTGTCCGCATCGGCAGACACAAGACACATTCTCTGTCCOGACAACGTTGAAGCAGCACTACGTGATGGTGCCG
 GTGAAGCACCGTCTCTCCGTTCTCTCAGCTTCTTCCGCTCCCAACGACGCTGGGGCTAACAAAGATCATCGTGT
 TGTTTCAACGGCGGACAGTACGGAGTCTGTACCTGCTCGCTTCTCGC

Figura 17. Sequencia do cromossomo 27 de *L. infantum*. Em verde o oligo LIN19; em vermelho o oligo LINR4; em azul os oligos desenhados para a amplificação do fragmento de 2.255; em laranja a região idêntica a de um clone de minicirculo seqüenciado, com a sequencia menor correspondendo a parte do mesmo fragmento encontrado (maior). As setas mostram a orientação dos primers.

4.7 Confirmação da espécie de *Leishmania* pelo PCR-RFLP da região de ITS-1

Para a confirmação da espécie de *Leishmania* presente nas amostras utilizadas no estudo foi utilizado o PCR-RFLP da região ITS-1 conforme descrito por Schonian e colaboradores (2003). Após a amplificação por PCR do fragmento contendo a região ITS-1 foi realizada a digestão do produto utilizando enzima *HaeIII*. Todas as categorias de amostras foram testadas (amastigotas de Teresina e Bauru, culturas de Campo Grande e Teresina e flebótomos de Teresina) e para todas elas a espécie identificada foi *Leishmania infantum chagasi* (figura 17).

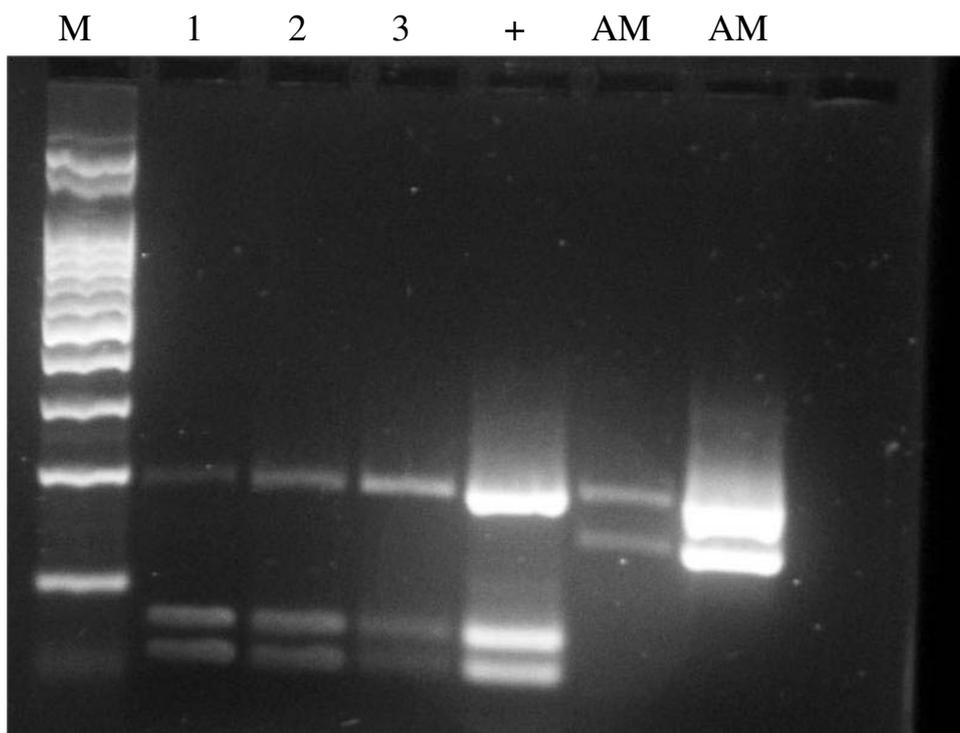


Figura 18. Digestão da região ITS-1 de *Leishmania*. (M) Padrão de peso molecular (100 pb), colunas de 1 a 3 correspondem a amostras de *L. infantum chagasi* analisadas no estudo; + amostra confirmada de *L. infantum chagasi* servindo de controle positivo; AM amostras confirmadas de *Leishmania amazonensis*.

Discussão

A transmissão das leishmanioses ocorre atualmente em 88 países, tanto no velho mundo (África Setentrional e Oriental, Oriente Médio, Ásia e Europa Meridional) quanto no novo mundo (América do Sul e Central). Somente para a Leishmaniose Visceral (LV) a prevalência mundial é de aproximadamente 13 milhões de pessoas infectadas, com uma incidência de pelo menos 500.000 novos casos por ano. Em toda a bacia do mediterrâneo e na América Latina o principal agente etiológico da LV é o parasita *Leishmania infantum chagasi*. A transmissão ocorre, essencialmente, através de um ciclo zoonótico, tendo os cães domésticos como reservatórios e o homem como hospedeiro secundário (Desjeux, 2004).

Durante os últimos 20 anos, a epidemiologia da *L. infantum chagasi* tem se modificado. No sul da Europa, desde 1985, o aumento da prevalência da AIDS permitiu a emergência da co-infecção HIV/ *Leishmania* e o aparecimento de um ciclo antroponótico através do compartilhamento de seringas de usuários de drogas intravenosas (Alvar *et al.*, 1996). Além disso, ocorreram outras mudanças na epidemiologia da *Leishmania infantum chagasi*, como a disseminação em direção ao norte na Europa e América, e a identificação de outros mamíferos como tendo papel no ciclo de transmissão. (Gramiccia e Gradoni, 2005). Essas contínuas modificações na epidemiologia da LV evidenciam a necessidade de ferramentas poderosas de tipagem com o intuito de monitorar a distribuição geográfica de diferentes populações de parasitas e implementar medidas de controle adequadas.

Recentemente, especificamente duas técnicas tem se destacado por fornecerem um grande poder discriminatório: a análise por microssatélites e a análise por RFLP dos minicírculos do DNA do cinetoplasto. Em um estudo utilizando 25 linhagens de *Leishmania infantum* obtidas de humanos e cães em três focos de transmissão de LV na Espanha essas duas técnicas foram as que melhor se aplicaram na discriminação das linhagens estudadas (Botilde *et al.*, 2006).

A técnica de PCR-RFLP dos minicírculos de kDNA foi a mais discriminatória, mostrando 21 padrões diferentes para as 25 linhagens testadas com apenas uma enzima usada (*Rsal*). Para os 15 marcadores microssatélites testados, foram observados entre um e sete alelos para cada marcador, e foram observados 20 diferentes genótipos dentre as 25 linhagens analisadas. (Botilde *et al.*, 2006).

Em outro estudo um painel totalmente novo contendo 11 marcadores microssatélites foi testado em 53 linhagens de *L.infantum* em sua maioria originárias da Europa e América do Sul, e em 10 linhagens de *L.donovani* da Índia, Sudão e Etiópia. Das 63 linhagens estudadas 60 apresentaram genótipos únicos e ainda houve uma clara separação em clusters das amostras da Europa e da América do Sul em relação as amostras de *L.donovani* da África e Índia. (Ochsenreither et al., 2006)

Houve também separação em clusters, em um estudo com microssatélites utilizando 91 linhagens de *L.infantum* e *L.donovani* originárias de várias regiões endêmicas do mundo (África Ocidental, Índia, Região do Mediterrâneo, América do Sul e Oriente médio). O estudo mostrou uma clara distinção entre as linhagens de *L.infantum* e *L.donovani*, além de uma separação em relação ao tipo de ciclo epidemiológico envolvido na transmissão; ou seja, linhagens originárias de locais onde o ciclo de transmissão é zoonótico ficaram separadas das linhagens providas de focos onde a transmissão é antroponótica. (Kuhls et al., 2007).

Para o presente trabalho, de um painel inicial de 24 marcadores microssatélites 10 foram selecionados e utilizados efetivamente nos estudos de genotipagem. Somente um único marcador foi polimórfico, e ainda assim apresentou uma variabilidade muito baixa com somente dois alelos sendo identificados. Apesar de esse resultado evidenciar uma baixa heterogeneidade genotípica ele não é incomum, visto que em um trabalho de genotipagem realizado com 24 cepas de *Leishmania donovani* isoladas no Nepal (Laurent et al., 2007), de um painel de 13 marcadores microssatélites testados, somente um apresentou-se polimórfico. Em um trabalho mais recente, também realizado no Nepal, a técnica de genotipagem por microssatélites foi comparada com outros marcadores nucleares e com PCR-RFLP para os minicírculos do kDNA na análise de 34 isolados de *L.donovani*. Dos cinco marcadores microssatélites testados somente um foi informativo, gerando sete dos oito genótipos diferentes observados. (Van der auwera et al., 2010). Desses dois estudos relatados no Nepal a técnica com maior poder discriminatório foi o PCR-RFLP para os minicírculos do kDNA. No primeiro, a técnica gerou 41 fragmentos com três enzimas utilizadas (*RsaI*, *HpaII* e *HaeIII*) e identificou 21 genótipos únicos entre as 24 linhagens testadas. No segundo, foram identificados 18 genótipos de 34 cepas testadas com a utilização de uma única enzima (*HaeIII*).

A baixa diversidade genotípica observada como resultado da análise por marcadores microssatélites do presente estudo pode ser explicada principalmente por dois fatores: 1- Todas as amostras analisadas são da área endêmica de Teresina – PI; portanto a pequena distancia geográfica entre as regiões de onde cada cepa foi isolada pode estar relacionada com a pequena distância genética observada; 2- Os trabalhos que relatam grande variabilidade genotípica e heterogeneidade genética na análise por marcadores microssatélites têm na sua grande maioria, amostras originária da África, Europa e Ásia, onde os parasitas que causam LV surgiram muito tempo antes do que na América do Sul (Lukes et al., 2007). Em um recente trabalho, foram utilizados vários tipos de marcadores moleculares (microssatélites, RFLP, sequencias de DNA codificantes e não codificantes) conjuntamente na análise molecular de 16 linhagens de *L. infantum* e 9 linhagens de *L. donovani*. A análise foi de alta resolução, utilizando 745 marcadores informativos, e permitiu o rastreamento molecular e a reconstrução filogenética do gênero *Leishmania*. Os resultados mostraram que o ancestral comum de *L. donovani* e *L. infantum* apareceu na Ásia Central há mais ou menos 20 milhões de anos, e há um milhão de anos divergiu, dando origem a *L. infantum* na Europa e *L. donovani* na África e Índia. *L. infantum* foi então introduzida na América do Sul pelos descobridores na época das grandes navegações há mais ou menos 500 anos. (Lukes et al., 2007).

Portanto, comparado com o enorme tempo cronológico envolvido na diferenciação entre *L. donovani* e *L. infantum*, os 500 anos de história de LV na América do Sul são insuficientes para gerar variabilidade genética. O resultado obtido com as análises com os primers MC1 e MC2 (figuras 10 e 11) onde um fragmento de 447pb foi amplificado e submetido a digestão com as enzimas *RsaI* e *HpaII* também reforça essa hipótese. Todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo genótipo, que foi idêntico ao encontrado para as amostras analisadas provenientes do Brasil, pelo menos na análise com essas duas enzimas, no trabalho de Cortes e colaboradores (2006). Ainda nesse mesmo trabalho foram observados 13 genótipos distintos em amostras originárias de Portugal.

Por sua vez, a técnica de RFLP dos minicírculos do kDNA parece extremamente útil e eficaz principalmente quando se busca distinguir linhagens muito próximas de *Leishmania*. Nos resultados apresentados no presente trabalho, houve uma clara distinção entre as amostras de Teresina (concentradas no ramo superior da árvore filogenética (figura 15), com a exceção de

2 amostras) e de Campo Grande juntamente com as de Bauru (concentradas no ramo inferior da árvore, com a exceção de 3 amostras) evidenciando que foi possível traçar uma relação entre distância genética e origem geográfica. Ainda, em quatro amostras provenientes de Bauru foi identificado um genótipo bem distinto dos normalmente encontrados para essa localidade (figura 14); esse genótipo nos chamou a atenção e para confirmar o achado realizamos por mais duas vezes o PCR do cinetoplasto e a digestão com as enzimas de restrição. A quantificação de DNA inicial antes da digestão também sempre apresentou a mesma faixa (340 a 558 ng/μl). Por último realizamos o RFLP com a região ITS-1 para nos certificarmos que o genótipo observado era de um isolado de *L. infantum chgasi*, o resultado confirmou o padrão esperado para a espécie (figura 17). Todos esses indícios levam a crer que o padrão de RFLP encontrado não é um artefato da técnica, mas sim realmente um genótipo diferente. Duas possíveis explicações para esse achado podem ser elaboradas: 1- Esse genótipo pode simplesmente ser de uma linhagem distinta geneticamente dos demais isolados analisados em Bauru e/ou 2- Esse genótipo pode ter sido selecionado após tratamento e recidiva da infecção, visto que o DNA do parasita foi extraído da coleção de lâminas do Hospital Estadual de Bauru, onde são diagnosticados e tratados todos os casos da doença na região. Considerando as duas hipóteses seria de grande importância consultar os prontuários dos pacientes diagnosticados, internados e submetidos a tratamento no referido hospital, a fim de se obter características da sintomatologia da doença, origem do paciente, progressão da doença e do tratamento e também histórico de internações.

Além disso, nas amostras de Teresina, houve uma forte tendência de agrupamento das amostras de cultura, em detrimento das amostras frescas isoladas de cães, onde se concentrou a maioria da variabilidade genotípica. O emprego dessa técnica tem se mostrado de suma importância em trabalhos de genotipagem do gênero *Leishmania*, apresentando um poder discriminatório equivalente ao da genotipagem com microssatélites (Botilde et al., 2006). Em alguns casos é considerada a única técnica capaz de produzir padrões detectáveis de polimorfismo entre cepas da mesma espécie, principalmente em se tratando de cepas com origem geográficas muito próximas. (Laurent et al., 2007; Van der auwera et al., 2010)

O seqüenciamento dos genes MIF não revelou nenhum polimorfismo nas linhagens testadas; a região de ITS-1 também se mostrou idêntica em todas as amostras seqüenciadas.

Esses resultados podem sugerir duas interpretações; ou as regiões analisadas são muito conservadas por serem fundamentais para a correta função fisiológica e sobrevivência do parasita, ou as linhagens dos parasitas analisados são predominantemente clonais. Como nenhuma mutação ainda que sinônima foi encontrada, nem mesmo para a região não codificante (ITS-1), a hipótese de linhagens clonais parece ser a mais correta, pois se as sequências dos genes MIF fossem mantidas inalteradas devido à importância desse gene para o parasita, pelo menos alguma mutação sinônima seria encontrada para esse gene. Além disso, como regiões não codificantes teoricamente não sofrem pressão evolutiva, seria de se esperar que pelo menos para as regiões de ITS houvesse algum tipo de mutação.

Esses resultados são corroborados por um artigo de revisão recentemente publicado. (Lynn e McMaster, 2008). Nessa revisão, os autores discutem as diferenças genéticas encontradas para três espécies de *Leishmania*, que causam diferentes manifestações clínicas: *L. major*, que causa leishmaniose cutânea; *L. braziliensis*, que causa leishmaniose mucocutânea; e *L. infantum chagasi*, que causa leishmaniose visceral. Apesar de significativas diferenças morfológicas e nos fenótipos das doenças, a organização genômica e a expressão gênica nessas três espécies são extremamente semelhantes. Com a finalização do genoma dessas três espécies, foi revelada a conservação da sintonia em 99% dos genes. Além disso, parece haver uma forte seleção contra recombinações genéticas, com muito poucos rearranjos cromossômicos observados. Apenas 200 genes ou pseudogenes foram identificados como diferencialmente presentes nas três espécies; isso representa apenas 2,5% dos aproximadamente 8000 genes anotados nessas espécies de *Leishmania*.

Ainda, em um estudo utilizando micro-arranjos foi observado que a maioria dos genes (cerca de 90%) para várias espécies de *Leishmania* são expressos constitutivamente, e que somente um número muito limitado de genes (0,2% - 5,0%) é expresso de maneira estágio específico nas diferentes formas evolutivas do ciclo do parasita (Lynn e McMaster, 2008).

Todos esses estudos levam a crer que a variabilidade genômica nuclear das diversas espécies de *Leishmania* é significativamente baixa, ou pelo menos mais baixa do que o esperado. A nossa hipótese é que o genoma mitocondrial, no caso o genoma do cinetoplasto, pode servir como uma fonte de variabilidade genética desses parasitas.

Um achado interessante foi observado quando vários clones de minicírculos foram seqüenciados para o presente estudo. Foram anotadas sequencias com homologias bem significantes quando comparadas ao DNA cromossômico de *L. infantum chagasi* (Tabela 2). Essa homologia encontrada nos fez imediatamente pensar na hipótese de recombinação entre DNA do cinetoplasto e DNA cromossômico no parasita. Como as regiões conservadas dos minicírculos estão presentes no cromossomo 27, (figura 16; primers LINR4 e LIN19) essas regiões seriam “ hot spots” de recombinação genética entre núcleo e cinetoplasto, o que em última análise poderia contribuir, de maneira dinâmica, para geração de variabilidade genética muito grande para o parasita. Porém, recentemente, as seqüências depositadas no GenBank para o genoma de *L. infantum* foram substituídas, e a região do cromossomo 27 onde se inseriam as sequencias de minicírculos foi totalmente alterada. Esse fato é curioso, e a provável explicação é que o genoma anterior não foi anotado e seqüenciado com o devido cuidado, e o DNA cromossômico foi contaminado com sequencias do DNA de minicírculos. Porém, ainda são observadas sequencias de minicírculos com bastante homologia ao cromossomo 27 de *Leishmania donovani* (Tabela 2).

Os minicírculos do DNA do cinetoplasto desempenham um papel fundamental no correto funcionamento genético mitocondrial, portanto esse DNA provavelmente está mais envolvido com uma rápida resposta a diferentes condições ambientais e situações de estresse fisiológico. Essa resposta provavelmente interfere na adaptabilidade do parasita que pode adquirir vantagens seletivas diferentes conforme a classe de minicírculos que mais prevalece dentro da rede de kDNA.

O fenômeno já descrito da transcinetoplasticidade ilustra de maneira mais clara essa hipótese. Esse fenômeno consiste em mudanças nas sequencias de maxicírculos, que são acompanhadas por uma mudança drástica no repertório de classes de minicírculos.

Culturas de parasitas são submetidas a doses crescentes de drogas que normalmente matam o parasita. Durante a transcinetoplasticidade, que dura por volta de 15 gerações, as sequencias predominantes de minicírculos são reduzidas e finalmente suplantadas por uma classe anteriormente menos freqüente. Durante os estágios intermediários do processo, o número total de minicírculos da rede de kDNA diminui e cada rede contem tanto os minicírculos sensíveis a droga quanto resistentes, essa dinâmica pode ser uma das explicações para os

padrões diferentes de RFLP de minicírculos presentes em algumas amostras de Bauru analisadas no presente trabalho.

Esse processo é totalmente reversível; entre oito a dez meses após a retirada da droga, a composição de minicírculos original é restabelecida. (Shapiro e englund, 1995).

Como conclusão, os resultados do presente estudo mostram que a análise por PCR-RFLP dos minicírculos do DNA do cinetoplasto é mais apropriada do que outras técnicas de genotipagem molecular para a identificação de linhagens de *L. infantum chagasi*; e deve ser o marcador molecular escolhido, especialmente quando as linhagens são simpátricas ou com origem geográfica muito próxima.

Referências bibliográficas

Alonso DP, Ferreira AF, Ribolla PE, de Miranda Santos IK, do Socorro Pires e Cruz M, Aecio de Carvalho F, Abatepaulo AR, Lamounier Costa D, Werneck GL, Farias TJ, Soares MJ, Costa CH. Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *J Infect Dis.* 2007;**195**:1212-1217.

Alvar, J., Gutiérrez-Solar, B., Panchón, I., Calbacho, E., Ramírez, M., Vallés, R., Guillén, J.L., Canavate, C., Amela, C., 1996. AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin. Dermatol.* **14**: 541-546.

Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., et al., 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**: 334–359.

Aransay, A. M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1933–1938.

Barker, G.C., 2002. Microsatellite DNA: a tool for population genetics analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **96**:21–24.

Bhattarai, N.R., Dujardin, J.C., Rijal, S., De Doncker, S, Boelaert, M., Van der Auwera, G. 2010. Development and evaluation of different PCR-based typing methods for discrimination of *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Parasitology*, 137**(6)**:947-57.

Botilde, Y., Laurent, T., Tintaya, W. Q., Chicarro, C., Cañavate, C., Cruz, I., Kuhls, K., Schönian, G., Dujardin, J., 2006. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Inf. Gen. Evol.*, **6**: 440-446

Bucheton B, Abel L, Kheir MM, Mirgani A, El-Safi SH, Chevillard C, Dessein A. Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate

gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun.* 2003;**4**:104-109.

Bulle, B., Millon, L., Bart, J., Gállego, M., Gambarelli, F., Portús, M., Schnur, L., Jaffe, C.L., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J.M., Piarroux, R., 2002. Practical Approach for Typing strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. *J Clin Microbiol*, **40** (9):3391-3397.

Calandra, T., T. Roger. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 791-800.

Camargo-Neves, V.L.F. de, Rodas, L.A.C., Poletto, D.W., Gomes, A.C., 2002. Feeding habitat of *Lutzomyia longipalpis* in Araçatuba County, State São Paulo, Brazil. *Entomol. Vect.* **9** (Supl1) ISOPS IV: 63.

Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac”. (www.cve.saude.sp.gov.br)

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., et al., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**: 873–82.

Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;**98**:12–7.

Cortes S, Mauricio I, Almeida A, Cristovão J M, Pratlong F, Dedet J P, Campino L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol. Int.* 2006; **55** 277-283.

Cupolillo, E., Brahim, L.R., Toaldo, C.B., Oliveira-Neto, M.P., Brito, M.E.F., Falqueto, A., Naiff, M.F., Grimaldi, Jr G., 2003. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *J Clin Microbiol*, **41**: 3126-3132.

Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, **27**: 305-318.

Garin, Y.J., Sulahian, A., Pratlong, F., 2001. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect Immun*, **69**: 7365-7373.

Gramiccia, M, Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1169-1180.

Guilbride, D.L., Englund, P.T., 1998. The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. *J Cell Sci* , **111(Pt 6)**:675-679.

Jamjoom, M.B., Ashford, R.W., Bates, P.A., Kemp, S.J., Noyes, H.A., 2002. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann Trop Med Parasitol*, **96**: 265-270.

Kamir, D., Zierow, S., Leng, L., Cho, Y., Diaz, Y., Griffith, J., McDonald, C., Merk, M., Mitchell, R. A., Trent, J., Chen, Y., Kwong, Y. K., Xiong, H., Vermeire, J., Cappello, M., McMahon- Pratt, D., Walker, J., Bernhagen, J., Lolis, E., and Bucala, R., 2008. A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J. Immunol.* **180**, 8250–8261.

Karplus TM, Jeronimo SM, Chang H, Helms BK, Burns TL, Murray JC, Mitchell AA, Pugh EW, Braz RF, Bezerra FL, Wilson ME. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. *Infect Immun.* 2002;**70**:6919-6925.

Kuhls, K., Keilonat, L., Ochsenreither, S., Schaar, M., Schweynoch, C., Presber, W., Schönian, G., 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect.*, **9**: 334-343.

Laurent, T., Rijal, S., Yardley, V., Croft, S., De Doncker, S., Decuypere, S., Khanal, B., Singh, R., Schönian, G., Kuhls, K., Chappuis, F., Dujardin, J., 2007. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Inf. Gen. Evol.*, **7**: 206-212.

Lewin, S., Schönian, G., Tai, N.E., Oskam, L., Bastien, P., Presber, W., 2002. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Int J Parasitol*, **32**: 1267-1276.

Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E., Englund, P.T., 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol.* **21**:363–369

Lukes, J., Mauricio, I.L., Schönian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirků, M., Chocholová, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Oborník, M., Horák, A., Ayala, F.J., Miles, M.A., 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104** 9375–9380.

Lynn, M.A., McMaster, W.R., 2008. Leishmania: conserved evolution – diverse diseases. *Trends Parasitol*, **24(3)**:103-105.

Ministério da Saúde. Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília. 2003.

Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, Peacock CS, Khalil EA, Cordell HJ, Howson JM, El Hassan AM, Bereir RE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. *Genes Immun.* 2003;**4**:351-355.

Mohamed HS, Ibrahim ME, Miller EN, White JK, Cordell HJ, Howson JM, Peacock CS, Khalil EA, El Hassan AM, Blackwell JM. SLC11A1 (formerly

NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur J Hum Genet.* 2004;**12**:66-74.

Nasereddin, A., et al., Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. *Vet. Parasitol.* (2009), *In Press*

Nicolas, L., Prina, E., Thierry Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1666-1669.

Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schönian, G., 2006. Multilocus Microsatellite Typing as a New Tool for Discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 Strains. *J Clin Microbiol*, **44 (2)**: 495-503.

Pastrana, D. V., N. Raghavan, P. Fitzgerald, S. W. Eiseinger, C. Metz, R. Bucala, R. P. Scleimer, C. Bickel, A. L. Scott. 1998. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Infect Immun.* **66**: 5955-5963.

Sambrook, J., E. F. Fritsh, T. Maniatis. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 1989.

Shapiro T. A., Englund P. T., 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 117– 143.

Schonian, G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig H D, Presber, W, Jaffe C L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003 **47**(1):349-58

Schonian, G, Kuhls, K, Mauricio, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitol.* 2010 **16**: 1-21.

Schwenkenbecher, J.M., Fröhlich, C., Gehre, F., Schnur, L.F., Schönian, G., 2004. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Inf Gen Evol* **4**: 99–105, 2004.

Schwenkenbecher, J.M., Wirth, T., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., Schallig, H., Al-Jawabreh, A., Hamarsheh, O., Azmi, K., Pratlong, F., Schönian, G., 2005. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol*, In Press.

Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças - CCD. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo, 2006.

Sreenivas, G., Raju, B.V.S., Singh, R., Selvapandiyar, A., Duncan, R., Sarkar, D., Nakhasi, H.L., Salotra, P., 2004. DNA Polymorphism assay distinguishes isolates of *Leishmania donovani* that cause kala-Azar from those that cause post-kala-azar dermal leishmaniasis in humans. *J Clin Microbiol*, **42**:1739-1741.

Toledo, A., Martín-Sánchez, J., Pesson, B., Sanchiz-Marín, C., Morillas-Márquez, F., 2002. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol Biochem Parasitol*, **119** : 257-264.

Turco, S., Späth, G.F., Beverley, S.M., 2001. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol*, **17** (5):223-226.

Werneck, G.L., 2010. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, **26**(4):644-645.

Woolhouse, M. E., Taylor, L.H., Haydon, D.T., 2001. Population biology of multihost pathogens. *Science* **292**:1109–1112.

