

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

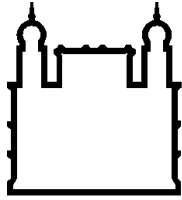
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Desenvolvimento e padronização de uma reação de PCR
multiplex para a genotipagem de protozoários patogênicos**

Elisa Cavalcante Pereira

RIO DE JANEIRO

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Elisa Cavalcante Pereira

**Desenvolvimento e padronização de uma reação de PCR
multiplex para a genotipagem de protozoários patogênicos**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Alberto Martín Rivera Dávila

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P436 Pereira, Elisa Cavalcante

Desenvolvimento e padronização de uma reação de PCR multiplex para a genotipagem de protozoários patogênicos / Elisa Cavalcante Pereira. – Rio de Janeiro, 2015.

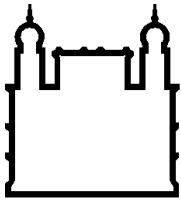
xv, 112 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 74-86

1. PCR. 2. Multiplex. 3. Genotipagem. 4. Protozoário. 5. Filogenia. I. Título.

CDD 579.4



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Elisa Cavalcante Pereira

**Desenvolvimento e padronização de uma reação de PCR
multiplex para a genotipagem de protozoários patogênicos**

Orientador: Dr. Alberto Martín Rivera Dávila

Aprovada em: / /

EXAMINADORES:

Dra. Claudia Masini D'Avila Levy

Dr. Adeilton Alves Brandão

Dr. André Luis Rodrigues Roque

SUPLENTE:

Dr. Edmundo Carlos Grisard

Dra. Lilian Rose Pratt Riccio

REVISOR:

Dr. Adeilton Alves Brandão

Rio de Janeiro, 16 de novembro de 2015.

É com muito orgulho que dedico este trabalho a
vovó Alda (Aldinha) (*in memoriam*), com ela
aprendi o que é superar as maiores
adversidades e ainda ter forças
para continuar sorrindo.

Agradecimentos

Aos meus pais Silas Alfredo Pereira e Carmen Cavalcante Pereira que sempre me incentivaram durante toda a vida e ainda aturaram minha variação de humor constante, junto com a minha irmã Luisa.

Ao meu marido Guilherme que me aturou e me engordou nos momentos em que eu estava mais nervosa com a dissertação, e me ajudou a superar os problemas que ocorreram no meio do caminho, sempre com paciência, bom humor e acima de tudo, muita compreensão, a qual foi essencial para que pudéssemos juntos concluir mais esta etapa ao longo dos nossos 10 anos de juntos.

Ao meu orientador, Dr. Alberto Dávila, que abriu as portas de seu laboratório e permitiu que eu concluísse mais esta etapa na minha carreira acadêmica.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas: Nelson, ao DOUTOR Rodrigo por me ajudar sempre quando eu mais precisei, Renata, Antônio, Fábio Bernardo, Fábio Mota, Mayla, Isis, Thais, Melise, André, Rangeline e Letícia.

Aos meus amigos que sempre entenderam a minha ausência, mas continuaram caminhando junto comigo para que eu não me sentisse sozinha.

Às minhas amigas queridas, Rachel Lins, Priscila Moura, Ohanna Cavalcanti e Dudinha, pessoas maravilhosas que são presentes da FIOCRUZ (e eu vou me juntar finalmente a elas como mestres).

À CAPES pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento da dissertação.

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que
renunciar para conseguir. “

Dalai Lama

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Lista de abreviaturas, siglas e símbolos | ix |
| Lista de figuras | xi |
| Lista de tabelas | xiii |
| Lista de quadros | xiii |
| Resumo | xiv |
| Abstract | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Protozoa | 2 |
| 1.1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) | 3 |
| 1.1. 2. Classe Kinetoplastea | 4 |
| 1. 1. 3. Filo Apicomplexa | 5 |
| 1. 2. Genotipagem | 6 |
| 1. 2. 1. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase | 7 |
| 1. 2. 1. 1. PCR <i>multiplex</i> | 8 |
| 1. 2. 2. Genômica Comparativa | 9 |
| 1. 3. Filogenia | 10 |
| 1. 4. <i>Loci</i> utilizados para a genotipagem | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2. 1. Objetivo geral | 15 |
| 2. 2. Objetivos específicos | 15 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3. 1. Obtenção dos parasitas | 17 |
| 3. 1. 1. Extração do DNA genômico | 19 |
| 3. 2. Escolha e desenho dos iniciadores | 19 |
| 3. 3. Padronização inicial das PCRs <i>singleplex</i> | 22 |
| 3. 4. Padronização inicial da PCR <i>multiplex</i> | 23 |
| 3. 5. Visualização dos produtos de PCR | 26 |
| 3. 6. Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento | 26 |
| 3. 7. Análise do sequenciamento | 27 |
| 3. 8. Construção das árvores filogenéticas | 28 |
| 4. RESULTADOS | 29 |
| 4. 1. Teste de sensibilidade dos iniciadores | 30 |
| 4. 1. 1. Classe Kinetoplastea | 30 |
| 4. 1. 1. 1. <i>Locus Seryl-tRNA synthetase</i> (SerRS) | 31 |
| 4. 1. 1. 2. <i>Locus Triosephosphate isomerase</i> (TPI) | 32 |
| 4. 1. 1. 3. <i>Locus Leucyl-tRNA synthetase</i> (LeuRS) | 33 |
| 4. 1. 1. 4. <i>Locus U5 snRNP spliceosome subunit</i> (U5 snRNP) | 34 |
| 4. 1. 1. 5. <i>Locus Mismatch repair ATPase</i> (MSH) | 35 |
| 4. 1. 1. 6. <i>Locus Methionyl-tRNA synthetase</i> (MetRS) | 36 |
| 4. 1. 1. 7. <i>Locus GTP-binding protein</i> (DRG1) | 37 |
| 4. 1. 2. Filo Apicomplexa | 39 |
| 4. 1. 2. 1. <i>Locus GTP-binding protein</i> (DRG1) | 39 |
| 4. 1. 2. 1. <i>Locus U5 snRNP spliceosome subunit</i> (U5 snRNP) | 40 |
| 4. 2. Padronização inicial da PCR <i>singleplex</i> para todos os <i>loci</i> | 42 |
| 4. 3. Padronização inicial da PCR <i>multiplex</i> | 47 |
| 4. 3. 1. <i>Multiplex</i> 1 | 47 |
| 4. 3. 2. <i>Multiplex</i> 2 | 48 |
| 4. 3. 3. <i>Multiplex</i> 3 | 49 |
| 4. 3. 4. <i>Multiplex</i> 4 | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 4. 3. 5. <i>Multiplex</i> 5 | 51 |
| 4. 3. 6. <i>Multiplex</i> 6 | 52 |
| 4. 4. Análise Filogenética dos <i>loci</i> utilizados | 55 |
| 4. 4. 1. Classe Kinetoplastea | 55 |
| 4. 4. 1. 1. Árvore filogenética do gene SerRS (par 172) | 55 |
| 4. 4. 1. 2. Árvore filogenética do gene LeuRS (par 38) | 56 |
| 4. 4. 1. 3. Árvore filogenética do gene TPI (par 30) | 57 |
| 4. 4. 1. 4. Árvore filogenética do gene U5 snRNP (par 34) | 58 |
| 4. 4. 1. 5. Árvore filogenética do gene MSH8 (par 20) | 59 |
| 4. 4. 1. 6. Árvore filogenética do gene MetRS (par 143) | 59 |
| 4. 4. 1. 7. Árvore filogenética do gene DRG1 (par 27) | 60 |
| 4. 4. 2. Filo Apicomplexa | 61 |
| 4. 4. 2. 1. Árvore filogenética do gene U5 snRNP (par 35) | 61 |
| 4. 4. 2. 2. Árvore filogenética do gene DRG1 (par 28) | 61 |
| 5. DISCUSSÃO | 63 |
| 5. 1. Teste de sensibilidade para os iniciadores testados | 64 |
| 5. 2. Padronização inicial dos ensaios dos PCRs <i>singleplex</i> | 64 |
| 5. 3. Padronização inicial dos ensaios dos PCRs <i>multiplex</i> | 66 |
| 5. 4. Árvores filogenéticas para Kinetoplastea e Apicomplexa | 66 |
| 5. 4. 1. Árvores das espécies de Kinetoplastea | 66 |
| 5. 4. 2. Árvores das espécies de Apicomplexa | 70 |
| 6. CONCLUSÕES | 71 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |
| 8. ANEXO | 87 |
| 8. 1. Relação dos 39 pares de iniciadores desenhados incluídos os utilizados neste estudo | 88 |
| 9. APÊNDICE | 89 |
| 9. 1. Alinhamentos múltiplos dos <i>amplicons</i> gerados | 90 |

Lista de siglas e abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| H ₂ O | Fórmula molecular da água |
| °C | Graus Celsius |
| BioEdit | Do inglês <i>Biological Sequence Alignment Editor</i> |
| MEGA | Do inglês <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> |
| Blast | Do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CD | Do inglês <i>Compact Disk</i> |
| COG | Do inglês <i>Cluster of Orthologous Groups</i> |
| DDBJ | Do inglês <i>DNA Data Bank of Japan</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Deoxi-nucleotídeos tri-fosfatados |
| DTN | Doenças Tropicais Negligenciadas do inglês NTD (<i>Neglected Tropical Diseases</i>) |
| e-value | <i>Expectation Value</i> |
| EMBL | Do inglês <i>European Molecular Biology Laboratory</i> |
| fg | Fentograma |
| KCl | Fórmula molecular para cloreto de potássio |
| kDNA | Do inglês <i>Kinetoplast DNA</i> |
| KOG | Do inglês <i>Eukariotic Orthologous Groups</i> |
| L | Litro |
| MLEE | Do inglês <i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i> |
| MLMT | Do inglês <i>Multilocus Microsatellite Typing</i> |
| MLST | Do inglês <i>Multilocus Sequence Typing</i> |
| mM | Milimolar |
| mRNA | RNA mensageiro |
| n° | Número |
| NaCl | Fórmula molecular para cloreto de sódio |
| ng | Nanograma |
| nM | Nanomolar |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | Solução fosfato-salina do inglês <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i> |

| | |
|--------|--|
| pd | Pares de base |
| pg | Picograma |
| q.s.p. | Quantidade suficiente para |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SNP | Polimorfismo de base única, do inglês <i>Single Nucleotide Polimorfism</i> |
| Taq | Do inglês <i>Termophilus aquaticus</i> DNA polimerase |
| TAE | Tampão tris-acetato-EDTA |
| tRNA | RNA transportador |
| U.V. | Ultravioleta |
| WHO | Do inglês <i>World Health Organization</i> |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| μm | Micrômetro |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Micrografia eletrônica da rede de kDNA de <i>Critidia fasciculata</i> . | 5 |
| Figura 2: Forma de invasão de um representante do filo Apicomplexa (<i>Toxoplasma gondii</i>) na célula hospedeira. | 6 |
| Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para SerRS para <i>Leishmania</i> . | 31 |
| Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para SerRS para <i>Trypanosoma</i> . | 31 |
| Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para TPI para <i>Leishmania</i> . | 32 |
| Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para TPI para <i>Trypanosoma</i> . | 32 |
| Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para LeuRS para <i>Leishmania</i> . | 33 |
| Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para LeuRS para <i>Trypanosoma</i> . | 33 |
| Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para U5 snRNP para <i>Leishmania</i> . | 34 |
| Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para U5 snRNP para <i>Trypanosoma</i> . | 34 |
| Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para MSH para <i>Leishmania</i> . | 35 |
| Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para MSH para <i>Trypanosoma</i> . | 35 |
| Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para MetRS para <i>Leishmania</i> . | 36 |
| Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para MetRS para <i>Trypanosoma</i> . | 37 |
| Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para DRG1 para <i>Leishmania</i> . | 38 |
| Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para DRG1 para <i>Trypanosoma</i> . | 38 |
| Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para U5 snRNP. | 39 |

| | |
|---|----|
| Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para DRG1. | 40 |
| Figura 19: Teste de PCR <i>singleplex</i> para o <i>locus</i> LeuRS (iniciadores par 38) em <i>Trypanosoma</i> . | 43 |
| Figura 20: Teste de PCR <i>singleplex</i> para o <i>locus</i> LeuRS (iniciadores par 38) em <i>Leishmania</i> . | 44 |
| Figura 21: Teste de PCR <i>singleplex</i> para o <i>locus</i> DRG1 (iniciadores par 28). | 44 |
| Figura 22: Teste de PCR <i>singleplex</i> para o <i>locus</i> U5 snRNP (iniciadores par 35). | 45 |
| Figura 23: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR <i>multiplex</i> 1. | 48 |
| Figura 24: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR <i>multiplex</i> 2. | 49 |
| Figura 25: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR <i>multiplex</i> 3. | 50 |
| Figura 26: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR <i>multiplex</i> 4. | 51 |
| Figura 27: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR <i>multiplex</i> 5. | 52 |
| Figura 28: Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR <i>multiplex</i> 6. | 53 |
| Figura 29: Árvore filogenética para SerRS. | 55 |
| Figura 30: Árvore filogenética para LeuRS. | 56 |
| Figura 31: Árvore filogenética para TPI. | 57 |
| Figura 32: Árvore filogenética para U5 snRNP. | 58 |
| Figura 33: Árvore filogenética para MSH. | 59 |
| Figura 34: Árvore filogenética para MetRS. | 59 |
| Figura 35: Árvore filogenética para DRG1. | 60 |
| Figura 36: Árvore filogenética para U5 snRNP. | 61 |
| Figura 37: Árvore filogenética para DRG1. | 61 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Relação das 17 doenças tropicais negligenciadas segundo a OMS. | 3 |
| Tabela 2: Relação das espécies, cepas e código das coleções dos parasitas utilizados no presente estudo. | 18 |
| Tabela 3: Degenerações das bases nucleotídicas de acordo com a nomenclatura da IUPAC. | 20 |
| Tabela 4: Sequências dos iniciadores usados para amplificar os fragmentos dos genes. | 21 |
| Tabela 5: Protocolo para os ensaios <i>singleplex</i> . | 22 |
| Tabela 6: Protocolo comum às 6 reações de PCR <i>multiplex</i> . | 24 |
| Tabela 7: Resultado do ensaio de sensibilidade. | 41 |
| Tabela 8: Resultado das PCRs <i>singleplex</i> . | 46 |
| Tabela 9: Comparação do comprimento dos fragmentos de DNA dos <i>loci</i> utilizados. | 54 |

Lista de Quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Comparação dos seis protocolos de PCR <i>multiplex</i> adotados contendo as espécies utilizadas, as temperaturas adotadas, a concentração de MgCl ₂ e o conjunto de marcadores que foi utilizado. | 25 |
|---|----|

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM PCR *MULTIPLEX* PARA A GENOTIPAGEM DE PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elisa Cavalcante Pereira

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), como a doença de Chagas, tripanossomíase africana, entre outras, afetam cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo. Apesar do impacto causado por estas doenças, as mesmas continuam sendo pouco estudadas. O reino Protista, ao qual os agentes etiológicos dessas doenças pertencem, incluem espécies de importância veterinária que causam muitas perdas para a indústria pecuária. Com os avanços da genética molecular, técnicas como a genotipagem estão sendo usadas cada vez mais utilizadas para o estudo de protozoários parasitos. Genes ortólogos conservados em protozoários podem ser utilizados como *loci* para genotipagem desses protozoários, de modo a obter uma melhor caracterização interespecífica. Neste estudo, foram utilizadas técnicas de PCR *singleplex* e *multiplex* para a genotipagem de 16 espécies de protozoários de três diferentes gêneros: *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. (classe Kinetoplastea) e *Plasmodium* spp. (filo Apicomplexa). Como metodologia de biologia molecular foram utilizados PCR e sequenciamento, bem como em bioinformática, onde foi utilizado filogenia molecular. Para esta finalidade, foram desenhados 39 pares de iniciadores degenerados e usados com o DNA genômico de espécies de protozoários de dois grupos: filo Apicomplexa e classe Kinetoplastea, em seguida, as reações de PCR foram realizadas a fim de padronizar as reações para um PCR *multiplex*. Além disso, os seguintes parasitos de importância para a saúde pública: *T. cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *Plasmodium falciparum* e *P. Vivax*, foram utilizados neste trabalho. A partir dos 39 pares de iniciadores, 9 pares foram selecionados compreendendo 7 *loci* para o presente estudo: metionil-tRNA sintetase, leucil-tRNA sintetase, seril-tRNA sintetase, subunidade U5 snRNP do spliceossomo, *mismatch repair ATPase*, triosefosfato isomerase e *GTP-binding protein*. Os testes a partir de diluições seriadas dos DNAs de *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp., onde mostraram uma sensibilidade de até 1 pg/ μ L de DNA (para o *locus Leucyl-tRNA synthetase* em *Trypanosoma* e *Leishmania*). A reação inicial de PCR *singleplex* padronizada foi eficiente para todos os *loci*, o que proporcionou o desenho da reação de PCR *multiplex*, onde o melhor resultado foi a reação número 5, a qual foi utilizada um conjunto de iniciadores dos genes *GTP-binding protein*, *U5 snRNP spliceosome subunit* e *Leucyl-tRNA synthetase*, que quando integrados permitiram a genotipagem *multilocus* de tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. A metodologia aplicada para a genotipagem destas espécies de parasitas foi bem-sucedida, e pode-se destacar após a observação de conjunto de resultados que o melhor *locus* em termos de especificidade, sensibilidade e fidelidade aos dados encontrados na literatura, foi *Leucyl-tRNA synthetase*, que apresentou resultados satisfatórios em todas as análises.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DEVELOPMENT AND PADRONIZATION OF A MULTIPLEX PCR FOR GENOTYPING PROTOZOAN PATHOGENIC

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elisa Cavalcante Pereira

According to the World Health Organization (WHO), Neglected Tropical Diseases (NTDs), examples being Chagas disease, African trypanosomiasis, among others, affect about 1 billion people in the world. However, they are little studied, despite its great impact on health. Also, they include species of veterinary importance that cause great harm to the livestock industry. The kingdom Protista, containing etiological agents of NTDs, they include species of veterinary importance and that cause great harm to the livestock industry. With advances in molecular genetics, techniques such as genotyping are being used increasingly used for the study of parasitic protozoans. Orthologous genes conserved in protozoa can be used as *loci* for genotyping, in order to obtain a better interspecific characterization. In this study, we used singleplex and multiplex PCR techniques for genotyping of 16 species of three different genus of protozoans: *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. (class Kinetoplastea) e *Plasmodium* spp. (phylum Apicomplexa). As molecular biology methods were used PCR and sequencing of PCR fragments, as well as bioinformatics, using molecular phylogeny. For this purpose, were designed 39 degenerated primers for species of 2 groups: phylum Apicomplexa and class Kinetoplastea, then, the PCR reactions were performed with the aim of standardizing multiplex PCR reactions. Moreover, parasites of importance to public health such as *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* were used in this study. Based on the 39 pairs of primers, 9 pairs were selected comprising 7 *loci* for this study: methionyl-tRNA synthetase, leucyl-tRNA synthetase, seryl-tRNA synthetase, subunit U5 snRNP the spliceosome, mismatch repair ATPase, triosephosphate isomerase, and GTP- binding protein. The tests from serial dilutions of DNA from *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp., which showed a sensitivity of up to 1 pg/ μ L DNA (for Leucyl-tRNA synthetase locus on *Trypanosoma* and *Leishmania*). The initial standardized singleplex PCR reaction was efficient for all *loci*, which resulted in the design of multiplex PCR reaction, where the best result was the number 5 reaction which was used a set of primers of the GTP-binding protein genes, U5 snRNP spliceosome subunit and Leucyl-tRNA synthetase, which when integrated allowed genotyping trypanosomatides *multilocus* of the genus *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. The methodology used for genotyping of these parasite species was successful, and can highlight after observation of the result set that the best locus in terms of specificity, sensitivity and fidelity to data found in literature, was Leucyl-tRNA synthetase , which showed satisfactory results in all analyzes.

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Protozoários

No século XIX, Owen elevou a classificação dos Protozoários de classe, como originalmente descrito por Goldfuss em 1818, para o nível de reino, chamando de reino Protozoa (Owen, 1858; Owen, 1859). Desta forma, os protozoários foram separados de animais e plantas para uma classificação taxonômica mais elevada. Assim como Owen em 1858, Hogg (reino Primigenum) em 1960 e Haeckel (reino Protista) em 1966, propuseram também a separação do reino, pois anteriormente os protozoários eram simplesmente divididos em plantas e animais, com base na presença ou ausência de cloroplastos ou por realizar fagocitose. Esses critérios foram abandonados porque três táxons bem definidos (dinoflagelados, euglenóides e heterocontes) têm alguns membros de cada tipo e, no caso de dinoflagelados e heterocontes, muitas espécies são tanto fotossintéticas quanto fagotróficas. Sendo assim, os microrganismos unicelulares e heterotróficos que não se enquadravam nos reinos Plantae e Animalia eram classificados como pertencentes ao reino Protista (Cavalier-Smith, 1993).

Segundo Cavalier-Smith (1993), desde o início da década de 1970, novas descobertas sobre a ultraestrutura dos protozoários decorrentes de microscopia eletrônica auxiliaram amplamente nas propostas filogenéticas e melhoraram a classificação em larga escala dos Protistas. Desta forma, os protozoários foram definidos como: "eucariotos unicelulares fagotróficos com mitocôndrias", o que simplificaria o novo reino incluindo a grande maioria dos protozoários, excluindo poucas espécies e incluindo também organismos do filo *Chromista* (Cavalier-Smith, 1993).

Assim, o termo Protozoa é empregado comumente para os organismos móveis que possuem nutrição, normalmente heterotrófica, assumindo diversas morfologias, uma complexidade estrutural e adaptações variáveis para todos os tipos de condições ambientais, pois ao longo dos anos, evoluíram a nível de especializações de organelas ou de citoesqueleto. Embora possuam uma grande variabilidade, permaneceram no nível de organização unicelular (Ruppert & Barnes, 1996). Atualmente, existem mais de 200 mil espécies de eucariotos unicelulares que são classificados como protozoários, dos quais aproximadamente 10 mil são parasitas (Cavalier-Smith, 2003).

1. 1. 1. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013) as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), tabela 1, são um grupo de 17 doenças que acometem principalmente populações de baixa renda e, por isso, não recebem a devida atenção das indústrias farmacêuticas (Yamey & Torreele, 2002; Winters, 2006) mesmo afetando cerca de 1 bilhão pessoas a cada ano em todo o mundo. Dentre essas doenças, se destacam a doença de chagas (*Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909)), a tripanossomíase africana (*T. brucei* – doença do sono), leishmaniose (*Leishmania spp.* (Cunha e Chagas, 1937)) causadas por estes protozoários parasitas da classe Kinetoplastea (*Trypanosoma spp.* e *Leishmania spp.*).

Tabela 1. Relação das 17 doenças tropicais negligenciadas segundo a OMS. Relação de quatro diferentes tipos de patógenos que acometem principalmente populações mais pobres de acordo com a resolução WHA66.12. (WHO, 2013)

| Doenças Tropicais Negligenciadas | | | |
|---|---|---|------------------------------------|
| Protozoa | Bactéria | Helminto | Vírus |
| Doença de Chagas (<i>Trypanosoma cruzi</i>) | Úlcera de Buruli (<i>Mycobacterium ulcerans</i>) | Cesticercose / Teníase (<i>Teania solium</i> e/ou <i>Taenia saginata</i>) | Dengue e Chikungunya (CHIKV) |
| Tripanossomíase africana / Doença do sono (<i>Trypanosoma brucei</i>) | Hanseníase (<i>Micobacterium leprae</i>) | Dracunculíase / Doença do verme-da-guiné (<i>Dracunculus medinensis</i>) | Raiva (RABV) |
| Leishmanioses (<i>Leishmania spp.</i>) | Tracoma (<i>Chlamydia trachomatis</i>) | Equinococose (<i>Echinococcus granulosus</i>) | |
| | Bouba (<i>Treponema pallidum pertenuae</i>) | Trematodíases transmitidas por comida ¹ Filariose linfática (<i>Wuchereria bancrofti</i>) Oncocercose / Cegueira do rio (<i>Onchocerca volvulus</i>) Esquistossomose Helmintos transmitidos pelo solo ² | |

¹Clonorquíase (*Clonorchis sinensis*), opistorquíase (*Opisthorchis viverrini* e *O. felinus*), fasciolose (*Fasciola hepatica* e *F. gigantica*) e paragonimíase (*Paragonimus spp.*).

²Lombriga (*Ascaris lumbricoides*), diarreia crônica (*Trichuris trichiura*) e ancilostomíase (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*).

1. 1. 2. Classe Kinetoplastea

A classe de protozoários Kinetoplastea, anteriormente classificada como ordem (Vickerman *et al*, 2004), possui uma particularidade, seu DNA mitocondrial único, ou kDNA, sendo os únicos organismos a possuírem essa estrutura denominada cinetoplasto (Vickerman, 1976) estruturada como uma enorme rede concatenada de DNA circular, como pode ser observado na figura 1 (Lukes *et al*, 2002). Esta classe pertence ao supergrupo Excavata, que contem a família Trypanosomatidae, que por sua vez possui todos os seus representantes parasitas e de flagelo único (Maslov *et al*, 2001). Entre eles se encontram numerosos parasitas de importância medica, como os agentes etiológicos da doença de Chagas, leishmanioses e doença do sono, causadas pelos três maiores parasitas do grupo, contendo inclusive parasitas de importância veterinária, *T. vivax* responsável pela tripanossomose bovina e *T. evansi* pela tripanossomose equina (Hoare, 1972; Maxie *et al*, 1979; García *et al*, 2003).

Outra família pertencente a esta classe é a Bodonidae, que é composta por representantes biflagelados e majoritariamente de vida livre, principalmente de ambientes aquáticos, que se alimentam de bactérias e pequenos eucariotos (Pattersonm, 1989; Arndt *et al*, 2000). Os representantes desta família mostram uma variedade de estilos de vida, tanto de vida livre, tais como os gêneros *Bodo*, *Parabodo*, *Dimastigella*, *Rhynchobodo*, *Cruzella*, quanto parasitária, que são representados por ectoparasitas da pele e brânquias de peixe, como *Ichtyobodo*, endoparasitas do trato reprodutivo de caracóis (algumas espécies *Cryptobia*) e de trato gastrointestinal de peixe (algum outro *Cryptobia*) e também por parasitas digenéticos de sangue de peixe (*Trypanoplasma*) transmitido por sanguessugas (Maslov *et al*, 2001).

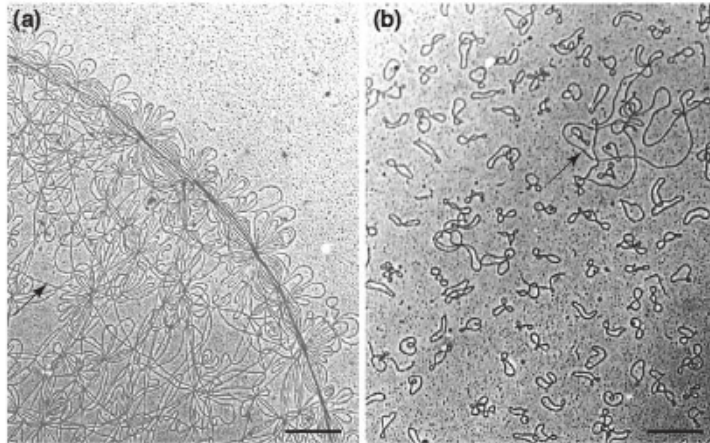


Figura 1. Micrografia eletrônica da rede de kDNA de *Critidia fasciculata*. (a) Segmentos da rede intactos. Pequenos *loops* são denominados minicírculos e os *loops* maiores (seta) são os maxicírculos. A rede inteira é elíptica, planar e possui aproximadamente 10 μm por 15 μm . Escala da barra lateral 0,3 μm . **(b)** Rede de kDNA linearizada pela topoisomerase II. Minicírculos 2,5 Kb e maxicírculos 38 Kb (seta). Barra de escala com 0,5 μm . (Adaptado de Shapiro e colaboradores 1999).

1. 1. 3. Filo Apicomplexa

O filo Apicomplexa contém protozoários parasitas, que possuem um complexo apical, um conjunto único de organelas envolvidas na invasão de células hospedeiras (Figura 2). O filo inclui o gênero *Plasmodium*, parasita responsável pela malária, *Toxoplasma gondii*, um parasita responsável pela toxoplasmose e capaz de infectar praticamente todos os tipos de células em todos os animais homeotérmicos. Além destes, existem outros gêneros de parasitas com grande importância médica e veterinária representantes do filo, como: *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Neospora*, *Theileria* e *Babesia* (Reid, 2015).

Estes parasitas são intracelulares obrigatórios e, portanto, a invasão da célula hospedeira é um passo essencial durante o seu ciclo de vida. Embora a maioria dos patógenos possam contar com fatores de modulação da célula hospedeira para provocar a sua própria endocitose ou fagocitose, a maioria dos parasitas apicomplexas podem penetrar em sua célula hospedeira na ausência de qualquer membrana visível em um processo ativo (Sibley, 2011) que parece estar firmemente ligado à capacidade de se moverem através de um complexo motor que utiliza actinmiosina (Kappe *et al.* 2003).

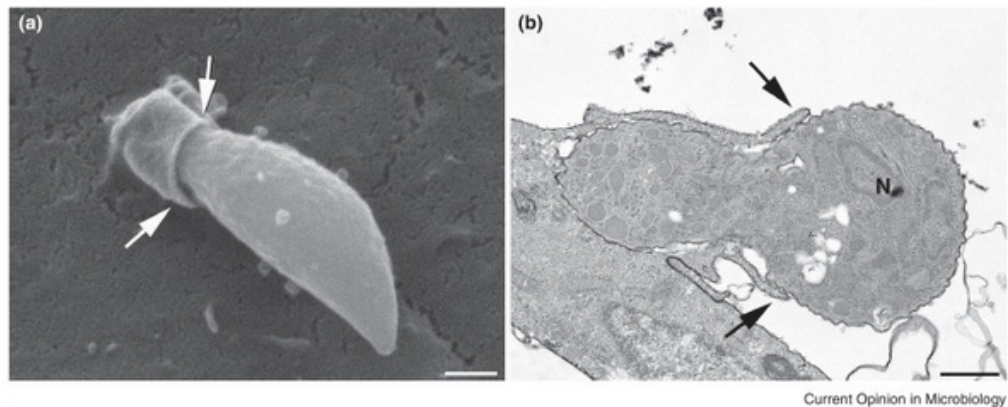


Figura 2. Forma de invasão de um representante do filo Apicomplexa (*Toxoplasma gondii*) na célula hospedeira. Varredura com micrografia de (a) transmissão e (b) eletrônica de taquizoítos de *T. gondii* invadindo uma célula endotelial de cordão umbilical humano. A extremidade apical do parasita é orientada para a célula epitelial, mas também parece ser o desenvolvimento de uma saliência da membrana plasmática da célula hospedeira para formar uma “gola” em torno parasita invasor. N - núcleo. As barras representam 1 μ M. (Meissner *et al.* 2013)

1. 2. Genotipagem

A genotipagem é entendida como o processo de identificação de variações na composição genética, no genótipo, que está contido em uma célula ou organismo (Alberts, 2010). Desta forma, este processo pode ser realizado através de ensaios biológicos e comparações entre outras sequências ou sequências de referência. Essas ferramentas auxiliam no conhecimento da genética das populações e na taxonomia de espécies (Baniecki *et al.* 2015).

Existem diversas formas de genotipagem, e elas podem ser divididas em único *locus* ou *multi-locus*. As abordagens com um único *locus* do genoma (o lugar específico em que um gene se localiza no cromossomo, ou seja, um único marcador) podem ser aplicadas na genotipagem de espécies e/ou populações próximas, em áreas pequenas de distribuição, enquanto uma análise *multi-locus* possibilita um entendimento mais completo da biologia de espécies e populações, podendo elucidar questões inter e intraespecíficas de populações e espécies mais distantes e distribuídas em uma área maior (Spratt, 1999).

A abordagem *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT), utiliza regiões repetitivas em tandem do genoma de 1 a 6 pb, as regiões de microssatélite são neutras e altamente polimórficas, sendo utilizadas para estimar a distância genética e estruturação populacional (Litt & Luty, 1989; Ochsenreither *et al*, 2006; Schönian *et al*, 2011). Em protozoários, mais especificamente *Leishmania* spp, os *loci* microssatélite provaram ser ferramentas poderosas para estudos genéticos de tipagem molecular e da população nesse gênero de protozoários (Gelanew *et al*, 2014). Uma outra abordagem utilizada para a genotipagem é a MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*), que caracteriza isolados de enzimas citoplasmáticas de acordo com a mobilidade das mesmas em eletrorese, e é precursora do sistema MLST.

Estudos de epidemiologia molecular têm utilizado formas de genotipagem *multi-locus* baseadas em MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*), correlacionando dados de pacientes com as cepas que os infectaram e o local. Liu e colaboradores em 2015 utilizaram MLST como abordagem com o objetivo de genotipar o protozoário *Cryptosporidium andersoni*. Através da utilização desta metodologia, os autores conseguiram traçar a origem da infecção por este parasita, que causa diarreia em cavalos, a nível de subtipo (cepa do parasita), utilizando 4 *loci* diferentes a fim de atingir o objetivo proposto.

1. 2. 1. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki *et al*. 1985; Mullis & Faloona, 1987) revolucionou o campo da genotipagem. A PCR, tem como alvo um ou mais fragmento(s) de DNA específico(s) na reação, que é catalisada por uma enzima polimerase de DNA, que precisa de iniciadores adicionados à reação. Devido a sua simplicidade, sensibilidade, especificidade, a PCR é, na verdade, ainda hoje uma parte integrante da maior parte das técnicas de genotipagem.

Uma técnica derivada da PCR tradicional é a PCR quantitativa (qPCR), que é uma grande ferramenta para a detecção de agentes infecciosos (Rougemont *et al*, 2004). Em 2009, Rao e colaboradores descreveram métodos qPCR para detectar *Wuchereria bancrofti* e *Plasmodium* spp em sangue humano e em mosquitos com um único *locus* e *milti-locus*. Onde seus resultados demonstraram o valor potencial desta abordagem para avaliar eficientemente a presença destes agentes patogénicos transmitidas por vetores em populações humanas.

Desta forma, ensaios de genotipagem com alta sensibilidade e baixo custo são poderosas ferramentas para a identificação de infecções e podem promover uma melhor compreensão da genética de população do parasita, bem como a diversidade da infecção ao longo do tempo, como algumas técnicas de PCR (Baniecki *et al.* 2015).

1. 2. 1. 1. PCR *multiplex*

A PCR *multiplex* é uma variante da PCR tradicional na qual duas ou mais sequências alvo podem ser amplificadas através da inclusão de mais de um par de iniciadores na mesma reação. A PCR *multiplex* possui a vantagem de economizar tempo e de ser menos laboriosa. Desde que foi descrita pela primeira vez por Chamberlain 1988, este método tem sido aplicado com sucesso em muitas áreas, incluindo análises de deleção/inserção no gene, mutação e análise de polimorfismo, além da análise quantitativa e transcrição reversa RT-PCR. No domínio das doenças infecciosas, a PCR em *multiplex* tem demonstrado ser uma ferramenta valiosa para a identificação de vírus, bactérias e parasitas (Shuber *et al.* 1993; Crisan *et al.* 1994; Zimmermann *et al.* 1996 Rithidech *et al.* 1997; Harris *et al.* 1998).

Em casos em que a variação genotípica é muito alta, pode ser impossível garantir uma detecção de qualquer genótipo com um número limitado de iniciadores de PCR, por exemplo considerando ensaios *singleplex*. Porém, quando uma análise *multi-locus* é utilizada, torna-se possível uma boa resolução e elucidação de questões evolutivas e filogenéticas (Chamberlain *et al.* 1988; Repp *et al.* 1993; Shigemori *et al.* 2005).

No trabalho desenvolvido por Fredriksson e colaboradores em 2007, os autores destacam a importância da amplificação de múltiplos alvos para aumentar a eficiência de ensaios de genotipagem, onde os mesmos utilizaram uma abordagem com 170 diferentes pares de iniciadores numa mesma reação para 10 genes de câncer humano conhecidos, incluindo o fato de ser uma abordagem mais eficiente para casos de amostras raras.

No campo dos parasitas, em um trabalho realizado com 307 amostras de *T. cruzi*, foi possível utilizar uma abordagem *multi-locus* para genotipar esses parasitas através das DTUs (*Discrete Typing Unit*), que é definido como um conjunto de isolados que são geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por *loci* moleculares ou imunológicos comuns a esse conjunto de *T. cruzi*, onde esse genótipo

pode variar de I – VI (Tibayrenc, 1998). Para tal objetivo, os autores utilizaram uma técnica de PCR *multi-locus* em tempo real (MTq-PCR), onde conseguiram genotipar corretamente todos os 307 isolados de *T. cruzi* (Cura *et al*, 2015).

1. 2. 2. Genômica Comparativa

A genômica comparativa é o estudo da relação entre genomas de diferentes espécies ou linhagens biológicas, desde estruturas até suas funções, e podem ser usadas para inferir função gênica e também para adicionar anotação de novas sequências. A base para este tipo de análise é a hipótese da importância biológica das sequências conservadas entre espécies devido ao controle funcional das mesmas. O primeiro passo é saber escolher corretamente as sequências, e a comparação mais usual é entre organismos filogeneticamente próximos (Nobrega & Pennacchio, 2004; Cuadrat *et al*, 2014).

Em genômica comparativa, a utilização de genes ortólogos e parálogos são fundamentais para o estudo comparativo de espécies. Esses genes são fundamentalmente dois tipos diferentes de genes homólogos que evoluíram, respectivamente, de um único gene ancestral. Os genes ortólogos são aqueles descendentes de um gene presente no último ancestral comum às duas espécies, ocupando o mesmo nicho funcional em diferentes organismos. Já os genes parálogos são resultantes de um processo de duplicação gênica, onde esses genes tendem a evoluir para novas funções (Koonin *et al*, 2004).

Ortologia e paralogia são conceitos fundamentais de genética evolutiva. Uma distinção clara entre ortólogos e parálogos é necessária para a construção de uma classificação evolutiva robusta de genes e anotação funcional de confiança de genomas recentemente sequenciados (Koonin, 2005).

Estudos deste tipo mostram que podem ser estabelecidas relações de ortólogos com genes de espécies taxonomicamente próximas ou distantes para a maioria dos genes de cada genoma sequenciado. Em um trabalho de Tschoeke e colaboradores em 2014 utilizando a abordagem de genômica comparativa em 6 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* com os genomas disponíveis no GenBank (NCBI), os autores puderam observar que *L. amazonensis* e *L. mexicana* compartilham o maior número de genes ortólogos, e conseguiram identificar também a presença de potencial enzimas isofuncionais não-homólogas (NISE) entre *L.*

amazonensis e *Homo sapiens*, que poderiam colaborar para o desenvolvimento de novos alvos de fármacos.

1. 3. Filogenia

A biodiversidade constitui um universo no qual todos os indivíduos apresentam semelhanças e diferenças, variando no tempo, no espaço, na forma e na função. As semelhanças conferem unidade entre os diversos grupos de seres vivos, sendo a identidade garantida pelas diferenças entre eles (Lopes & Vasconcelos, 2012). A filogenética é o estudo das relações evolutivas e a análise filogenética é inferir ou estimar essas relações. A história evolutiva pode ser inferida a partir da análise filogenética e é geralmente retratada como árvores que representam a ancestralidade estimada e as relações herdadas entre moléculas (árvores de gene), organismos (árvore de espécie), ou ambos. A filogenética é também chamada de cladística. A palavra clado pode ser definida como um conjunto de descendentes de um único ancestral, e é derivada da palavra grega para ramo. No entanto, a cladística é um método particular de hipótese sobre relações evolutivas (Brinkman & Leipe, 2001).

Uma árvore filogenética, é um diagrama que ilustra as linhas de descendência evolutiva de diferentes espécies, organismos, ou genes a partir de um antepassado comum. Filogenias são úteis para organizar o conhecimento da diversidade biológica, para as classificações estruturadas, e para fornecer *insights* sobre eventos que ocorreram durante a evolução. Além disso, estas árvores mostram descendência de um ancestral comum porque grande parte das evidências mais fortes para a evolução vem na forma de um ancestral comum (Baum, 2008).

Diversos estudos utilizando filogenia podem ser utilizados como exemplos na evolução de *loci* específicos ou espécies em diversas áreas. Estudos utilizando protozoários de importância médica e veterinária já foram realizados para análise de características adaptativas de seus representantes à ambientes com restrição de nutrientes, como o caso do trabalho de Makiuchi e Nozaki em 2014, que utilizaram espécies parasitas como *Trichomonas vaginalis* e *Giardia intestinalis*, comparados à protozoários de vida livre como *Sawyeria marylandensis*, utilizando como *loci* genes relacionadas à mitocôndria (MROs), a fim de entender os mecanismos evolutivos que levaram a tais vantagens, com a filogenia como ferramenta.

Um outro desafio na área da biologia que pode ser elucidado com o auxílio da abordagem filogenética envolve a taxonomia de espécies. Uma das espécies mais estudadas na área de saúde é o *Trypanosoma cruzi*, que causa a doença de Chagas. Algumas espécies do gênero *Trypanosoma* formam um grupo monofilético conhecido como o clado *T. cruzi*, formado pelas espécies *T. cruzi*, *T. conorhini*, *T. dionisii*, *T. rangeli* e *T. vespertilionis*. Apesar de ser muito estudado, ainda existem incertezas sobre a evolução e estruturação deste clado, e estudos utilizando análises filogenéticas têm avançado bastante neste campo, como é o caso da abordagem de Cottontail e colaboradores em 2014, que utilizaram uma forma de filogenia, PTP (*Poisson Tree Processes*), que é um modelo para a delimitação de espécies em uma árvore filogenética enraizada, onde especiações ou eventos de ramificação são modelados em termos de número de substituições. Nesse trabalho os autores relatam indícios de que o clado *T. cruzi* tem mais espécies que anteriormente relatados, especialmente no Novo Mundo, e isso justifica novas pesquisas e estudo taxonômico utilizando a abordagem filogenética com mais amostras de outras localidades (Stevens et al, 1999; Hamilton et al, 2009; Zhang et al, 2013; Cottontail et al, 2014).

1. 4. Loci utilizados para a genotipagem

A escolha dos genes foi baseada em genes ortólogos/comuns aos parasitas, o que pode favorecer o conhecimento e a busca de novos alvos de drogas para as doenças transmitidas por esses protozoários. No presente estudo, foram utilizados três dos genes da família de enzimas aminoacil-tRNA sintetases, sendo eles SerRS, MetRS e LeuRS. A fidelidade da biossíntese de proteínas depende da ligação específica de aminoácidos em seus de tRNAs correspondentes. Este processo é catalisado por uma família de 20 enzimas, que conseguem distinguir estruturas semelhantes de tRNA e seus aminoácidos (Vincent *et al*, 1997).

O gene SerRS, pertencente à família tRNA sintetase de classe II, codifica a enzima que catalisa a transferência de serina-tRNA, O *locus* LeuRS codifica uma sintetase citosólica, leucina-tRNA, um membro da aminoacil-tRNA sintetase da família de classe I. A enzima catalisa a ligação de leucina no tRNA (Leu), e o gene MetRS catalisa a reação de ligação do aminoácido metionina ao seu tRNA correspondente, pertencendo também à família tRNA sintetase de classe I (Shiba *et al*, 1994). Estes genes vêm sendo bastante estudados em diversos grupos taxonômicos por serem

muito importantes para todos os organismos, uma vez que estão envolvidos na síntese de proteínas. Em estudos realizados em *T. brucei* por Cestari e Stuart em 2013, onde os autores fizeram *knockdown* em um dos genes desta família (IleRS – *Isoleucyl-tRNA synthetase*) se observou 100% de morte dos parasitas. Além deste, em estudos também utilizando *T. brucei*, identificaram inibidores de LeuRS, que já estava chamando a atenção para pesquisas com este *locus* em bactérias, devido às suas características antimicrobianas (Zhang *et al*, 2013; O'Dwyer *et al*, 2015).

As GTPases constituem uma grande família de enzimas hidrolases que se ligam e hidrolisam o GTP. Esta reação ocorre no domínio G, uma região altamente conservada e comum a todas as GTPases (Scheffzek & Ahmadian, 2005). A subfamília DRG (developmentally regulated G - proteins) constitui um dos ramos da superfamília das GTPases (Leipe *et al*, 2002). As proteínas DRGs são altamente conservadas e encontradas em vários grupos de seres vivos como as bactérias, as plantas, os fungos e os animais, sugerindo que essas proteínas possuem um papel celular fundamental (Bourne *et al*, 1991). Apesar disso, estudos utilizando este gene para a genotipagem de protozoários parasitas não foram encontrados na literatura.

O gene TPI, triosefosfato-isomerase, possui um papel fundamental na glicólise, está interligado ao metabolismo de lipídeos, e a via das pentoses fosfato, esse gene é muito importante para os eucariotos, e estudos relacionando com a deficiência nesse gene indicam severas alterações metabólicas (Orosz *et al*, 2009). Este gene vem sendo amplamente utilizado em estudos de caracterização molecular e genotipagem, através da identificação a nível de subtipo dos parasitas principalmente em parasitas dos gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* (Zheng *et al*, 2014; Qi *et al*, 2015).

O *locus* MSH, pertence a uma família de proteínas MutS (*Mutator S*) que constituem função no reparo do DNA e são conservados em todos os organismos, indicando seu papel vital nessa via em todos os organismos. Existem genes nessa família, como MSH2, MSH3, MSH6 e MSH8, e suas proteínas podem interagir e formarem complexos que atuam no reparo do DNA. No caso de MSH2 e MSH6, eles interagem formando um complexo que atuam no reparo do DNA, bem como MSH 2 e MSH3 (Bell *et al*, 2004; Saribasak *et al*, 2009). Estudos para a caracterização molecular desses genes só foram feitos até então para a identificação de mutações pontuais nos genes da família MSH em leveduras que alteravam o fenótipo de

Saccharomyces cerevisiae, não contendo relatos na literatura para genotipagem de protozoários utilizando esses *loci* (Sia *et al*, 2001).

Os *spliceossomos* são grandes arranjos formados por snRNPs que são precursores do mRNA. Para que aconteça o *splicing*, o U5 interage com sequências do éxon no ponto de corte 5', as bases ligadas entre U1 e esse ponto são então despareadas através de um processo que consome ATP e desliga U1 do spliceossomo. U5 então pareia melhor com o precursor de mRNA, ligando-se ao ponto de corte 5'. Isso causa o rompimento do pareamento entre a snRNP U4 e U6, mudando a conformação dessa última e criando condições para que U6 realize sua atividade catalítica. Dessa forma U4 atua como um inibidor de U6, que a impede de agir até que os pontos de corte estejam alinhados (Will & Luhrmann, 2011). Várias linhas de evidência sugerem que diferenças importantes estão presentes entre a translação e processamento do mRNA em sistemas de tripanosomatídeos e outros eucariotos. Mesmo estando bem definidos em mamíferos, snRNPs ainda não estão bem caracterizados em tripanossomatídeos (Silva *et al*, 2011).

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivo geral

Desenvolvimento e padronização da genotipagem *multilocus* de protozoários patogênicos dos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Plasmodium*, utilizando reações de PCR *multiplex* e avaliação das relações filogenéticas entre as espécies de parasitas estudadas através de filogenia molecular.

2. 2. Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade dos 9 pares de iniciadores utilizados com base em diluições seriadas das amostras de DNA para cada um dos três gêneros testados;
- Teste e padronização de PCRs *singleplex* para cada *locus* testado em todas as amostras utilizadas;
- Teste e padronização dos iniciadores que possam ser utilizados para a genotipagem de protozoários patogênicos através das técnicas de PCR *multiplex*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Obtenção dos parasitas

Os parasitas obtidos para este estudo foram cedidos pela Coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz (COLPROT/IOC/FIOCRUZ) que possui como curadora a Dra. Cláudia d'Ávila Levy, do Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia (IOC/FIOCRUZ) e Dr. Edmundo Carlos Grisard do Laboratório de Protozoologia (UFSC) com parasitas do gênero *Trypanosoma*, exceto *T. vivax* que já pertencia ao Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas (IOC/FIOCRUZ), as amostras de parasitas do gênero *Leishmania* foram cedidas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (COLIC), que tem como curadora a Dra. Elisa Cupolillo, do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (IOC/FIOCRUZ) e os parasitas do gênero *Plasmodium* foram cedidas pelo Laboratório de Pesquisas em Malária (IOC/FIOCRUZ) do Dr. Cláudio Ribeiro. As espécies utilizadas neste estudo estão presentes na tabela 2.

As espécies utilizadas na padronização das PCRs para o filo Apicomplexa foram *Plasmodium falciparum*: W2, cepa de referência para cultivo in vitro; PSS1, isolado de *P. falciparum* (brasileiro) adaptado para cultivo in vitro e FUP: cepa de referência para infecção sanguínea em primatas do gênero *Saimiri*, e *Plasmodium vivax*: PV1, PV2 e PV3, amostras de DNA do sangue de pacientes infectados por *P. vivax* atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), provenientes de regiões de Mata Atlântica/RJ.

Tabela 2. Relação das espécies, cepas e código das coleções dos parasitas utilizados no presente estudo. Descrição dos parasitas utilizados neste estudo em forma de tabela, com suas respectivas cepas e códigos em coleções e laboratórios, bem como seu código no Laboratório de Pesquisas em Malária (IOC/FIOCRUZ). As letras (V.) e (L.) representam, respectivamente, *Viannia* e *Leishmania*.

| Parasita e cepa | Código nas respectivas coleções/laboratório |
|---|--|
| <i>Trypanosoma cruzi</i> CL-Brener clone da cepa CL | COLPROT 006 |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y | COLPROT 106 |
| <i>Trypanosoma lewisi</i> | COLPROT 095 |
| <i>Trypanosoma vivax</i> cepa VTA01 | <i>T. vivax</i> VTA01 |
| <i>Trypanosoma evansi</i> | COLPROT 146 |
| <i>Trypanosoma brucei</i> cepa Waghorn/ATCC 30118 | COLPROT 360 |
| <i>Trypanosoma mega</i> | COLPROT 029 |
| <i>Trypanosoma dionisii</i> | COLPROT 343 |
| <i>Trypanosoma conorhini</i> cepa Deane | COLPROT 086 |
| <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> cepa (IFLA/BR/1967/PH8) | IOC/L0575 |
| <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> cepa (MHOM/BR/1975/M4147) | IOC/L0565 |
| <i>Leishmania (L.) major</i> cepa (MHOM/SU/1973/5-ASKH) | IOC/L0581 |
| <i>Leishmania (L.) mexicana</i> cepa (MHOM/BZ/1982/BEL21) | IOC/L0561 |
| <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> cepa (MHOM/BR/1975/M2903) | IOC/L0566 |
| <i>Leishmania (L.) infantum</i> cepa (MHOM/BR/1974/PP75) | IOC/L0579 |
| <i>Plasmodium vivax</i> (isolado) | PV1 |
| <i>Plasmodium vivax</i> (isolado) | PV2 |
| <i>Plasmodium vivax</i> (isolado) | PV3 |
| <i>Plasmodium falciparum</i> cepa FUP | FUP |
| <i>Plasmodium falciparum</i> cepa PSS1 | PSS1 |
| <i>Plasmodium falciparum</i> cepa W2 | W2 |

3. 1. 1. Extração do DNA genômico

Os parasitas foram lavados em PBS estéril (1x) nas seguintes concentrações finais: NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, e então centrifugados por 12 minutos à 15.000 x g. O sobrenadante foi então removido e foi adicionado PBS (1x) novamente e, novamente, as amostras foram centrifugadas à 15.000 x g por 12 minutos, e mais uma terceira vez foi adicionado PBS (1x) e as amostras foram centrifugadas à 15.000 x g por 12 minutos.

Após esta etapa de lavagem, os parasitos foram submetidos a extração com o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), onde o protocolo foi seguido de acordo com as orientações do fabricante.

Para eletroforese foi utilizada a fonte da cuba de eletroforese fabricada pela empresa *Major Science*, modelo MP-3AP, que foi ajustada em todos os ensaios para 100 V, 430 mA, por aproximadamente 1 hora. A eletroforese se deu em uma cuba fabricada pela empresa *Loccus Biotecnologia*, modelo LCH 13x15. O tampão utilizado para preparar o gel e na cuba para a passagem da corrente foi o TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 2mM e pH 8,5). Os DNAs extraídos foram dispostos nos poços do gel de agarose à 1%, contendo GelRed™ (BIOTIUM) 50x diluído para se ligar ao DNA e ser passível de observação à luz U.V., a fim de se avaliar o grau de preservação desse DNA genômico e sua concentração.

3. 2. Escolha e desenho dos iniciadores

Durante um trabalho prévio desenvolvido no laboratório, 348 grupos de ortólogos foram identificados utilizando o *software OrthoMCL*, a fim de identificar o core de proteínas comuns aos 22 protozoários com genomas disponíveis em bancos de dados públicos (Tschoeke, D. A., 2013). A partir destes resultados, os grupos que continham proteínas presentes no maior número de espécies foram utilizados para o desenho de trinta e nove pares de iniciadores (Anexo 8. 1) fruto de um outro trabalho desenvolvido no laboratório (Rona, L. D. P.), onde sequências nucleotídicas dos genes ortólogos foram obtidas a partir do banco de dados do *GenBank*, traduzidas em proteínas, armazenadas localmente e validadas usando as ferramentas *KOGnitor* e *COGnitor*, que mostra se a sequência selecionada pertence ao *KOG/COG* (grupos de genes ortólogos eucariotos/procariotos) respectivo utilizado na busca. Após esta

validação *in silico*, as sequências foram utilizadas para construir os alinhamentos que serviram para o desenho de iniciadores degenerados empregados para gerar fragmentos amplificados por PCR.

Os programas utilizados para o desenho dos iniciadores foram: *MAFFT* para a construção de alinhamentos múltiplos de cada *KOG/COG*, *JalView* para visualizá-los e o *Primer3Plus* para o desenho de iniciadores. Todo o processo foi realizado pelo pipeline *Primer Designer* (http://kineto2.biowebdb.org/primer_designer) para integrar estes programas, escritos em linguagem de programação *Perl*. Após o processo automatizado de validação, alinhamento e desenho dos iniciadores, foi realizada uma análise final dos iniciadores manualmente, onde foi feita a degeneração dos mesmos, baseada na tabela 3.

Tabela 3. Degenerações das bases nucleotídicas de acordo com a nomenclatura da IUPAC. Degeneração utilizada nos iniciadores desenhados.

| Base degenerada | Bases nucleotídicas |
|------------------------|----------------------------|
| M | A ou C |
| W | A ou T |
| S | G ou C |
| K | G ou T |
| Y | C ou T |
| R | A ou G |
| B | C, G ou T |
| D | A, G ou T |
| H | A, C ou T |
| V | A, C ou G |
| I | A, C, G ou T |

Após as análises dos iniciadores desenhados pertencentes a sete *loci* diferentes, *Seryl-tRNA synthetase* – SerRS, *Leucyl-tRNA synthetase* – LeuRS, *Triosephosphate isomerase* – TPI, *U5 snRNP spliceosome subunit* – U5 snRNP, *Mismatch repair ATPase 8* – MSH8, *Methionyl-tRNA synthetase* – MetRS, *GTP-binding protein* – DRG1., nove pares foram selecionados para serem utilizados neste estudo, e estão presentes na tabela a seguir:

Tabela 4. Sequências dos iniciadores usados para amplificar os fragmentos dos genes. Iniciadores degenerados para amplificar as 17 diferentes espécies de espécies de Protozoários.

| n° do Iniciador | Gene | Grupo de Protozoários | Forward | Reverse | Tamanho do Fragmento |
|------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 27 | DRG1 | Kinetoplastea | CGSACGCARAAGAACAA | ATDCCRCCVCGRTCCTT | 518 pb |
| 28 | | Apicomplexa | TCCAAAACRGGAGATGCRAGAAT | TGTCATCTACWGTRGCTTCACA | 510 pb |
| 20 | MSH3 e MSH8 | Kinetoplastea Kinetoplastea | TIYTDACIGGDCCBAAYATGG | GAIGTVCCCHKICCIARYTCRTCBA | 265 pb 268 pb |
| 30 | TPI | Kinetoplastea | AACTGGAARTGYAAYGG | CCAHACVGGYTCGTAGGC | 480 pb |
| 34 | U5 snRNP | Kinetoplastea | GARGTRGARTACATGGA | CGCACVTCRTCMGCYTC | 656 pb |
| 35 | | Apicomplexa | CTGTRTATGAAGTRGACCC | TACTGAAATACAAAKGASGAAAAT | 410 pb |
| 38 | LeuRS | Kinetoplastea | AAYTGGCTIGCIGACTGGC | CGBAGRTCACRGGRTACCA | 350 pb |
| 143 | MetRS | Kinetoplastea | CATGTTCCGKCTKAGCG | ATCYTTTCGTCCACCASCCAT | 439 pb |
| 172 | SerRS | Kinetoplastea | GDGAVGADAAGTAYYTGATTGC | AGCATCTCHRDBCCCATCAT | 577 pb |

3. 3. Padronização inicial das PCRs *singleplex*

Para que fosse possível padronizar uma reação de PCR *singleplex*, como pode ser observado na tabela 5, para cada um dos *loci* utilizados neste estudo, cada *locus* foi testado separadamente para os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium*, a fim de se obter uma temperatura de hibridação que servisse para todos, bem como as demais condições de ciclagem e concentrações dos reagentes para um posterior ensaio *multiplex* (vide item 3. 4, nesta seção). Um controle negativo foi utilizado em todos os protocolos, e as condições de ciclagem para cada reação foram as mesmas. As reações de PCR foram realizadas utilizando as seguintes condições: (1) 95°C de desnaturação inicial por cinco minutos, seguido de (2) 40 ciclos com 95°C de desnaturação, 58°C de temperatura de hibridação e 72°C como temperatura de extensão, sendo cada um por um minuto, e como a extensão final à (3) 72°C por dez minutos, seguido de 4°C por tempo indeterminado. Além disso, todas as reações foram realizadas utilizando o termociclador *Veriti*[®] da *Applied Biosystems*.

Tabela 5. Protocolo para os ensaios *singleplex*. Protocolo padronizado para todas as reações de PCR *singleplex*, com um volume final de 50 µL. Como amostras, foram utilizados um representante de cada gênero, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Plasmodium*. Espécies utilizadas: *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener, *T. cruzi* cepa Y, *T. lewisi*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. brucei*, *T. mega*, *T. dionisii*, *T. conorhini*, *Leishmania amazonensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *Plasmodium vivax* (PV1, PV2 e PV3) e *P. falciparum* (FUP, PSS1 e W2).

| Reagente | Volume (µL) |
|-----------------------------------|-------------|
| H ₂ O Milli Q (q.s.p.) | 28,5 |
| Buffer 5X Green | 10 |
| MgCl ₂ 50 mM | 4 |
| dNTP 10 mM | 2 |
| Iniciador 5' 10mM | 2 |
| Iniciador 3' 10mM | 2 |
| DNA polimerase GoTaq Flexi 5U/µL | 0,5 |
| DNA | 1 |
| Total | 50 |

Após cada reação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%, devido ao tamanho dos fragmentos, e foi adicionado GelRed™ (BIOTIUM) 50x diluído, a fim de se avaliar o tamanho dos fragmentos de DNA e a presença de inespecificidade.

3. 4. Padronização inicial da PCR *multiplex*

Para que fosse possível padronizar uma reação de PCR *multiplex* para a genotipagem dos protozoários da classe Kinetoplastea, um total de seis protocolos (tabela 6 e quadro 1) foram adotados e testados com o objetivo de observar qual a combinação de iniciadores mostraria um melhor resultado para a análise *multilocus* dos *loci* utilizados neste estudo. Um controle negativo foi utilizado em todos os protocolos, e as condições de ciclagem para cada reação foram as mesmas. As reações de PCR foram realizadas utilizando as seguintes condições: (1) 95°C de desnaturação inicial por cinco minutos, seguido de (2) 40 ciclos com 95°C de desnaturação, uma variação temperatura de hibridação dos iniciadores nas diferentes reações e 72°C como temperatura de extensão, sendo cada um por um minuto, e (3) a extensão final à 72°C por dez minutos, seguido de 4°C por tempo indeterminado. Além disso, todas as reações foram realizadas utilizando o termociclador *Veriti*® da *Applied Biosystems*. Após cada reação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2%, devido ao tamanho dos fragmentos, e foi adicionado aos géis brometo de etídio para se ligar ao DNA e ser passível de observação na luz U.V., a fim de se avaliar o tamanho dos fragmentos de DNA e a presença de inespecificidade.

Tabela 6. Protocolo comum às seis reações de PCR *multiplex*.

| Reagente | Volume (μL) |
|--|--|
| H ₂ O Milli Q (q.s.p.) | variável |
| Buffer 5X Green | 10 |
| MgCl ₂ 50 mM | variável |
| dNTP 10 mM | 2 |
| Iniciador 5' 10 mM | variável |
| Iniciador 3' 10 mM | variável |
| DNA polimerase GoTaq Flexi 5U/ μL | 0,5 |
| DNA (50 ng) | 1 |
| Total | 50 |

Quadro 1. Comparação dos seis protocolos de PCR *multiplex* adotados contendo as espécies utilizadas, as temperaturas adotadas, a concentração de MgCl₂ e o conjunto de marcadores que foi utilizado.

| | Multiplex 1 | Multiplex 2 | Multiplex 3 | Multiplex 4 | Multiplex 5 | Multiplex 6 |
|-------------------------|--|---|--|--|--|--|
| Marcador | LeuRS TPI | LeuRS U5 snRNP MSH | LeuRS MSH | LeuRS TPI MSH U5 snRNP DRG1 | LeuRS U5 snRNP DRG1 | LeuRS U5 snRNP DRG1 MSH |
| Temperatura | 58 °C | 60 °C | 59 °C | 59 °C | 59 °C | 59 °C |
| MgCl₂ | 4 mM | 4 mM | 3 mM | 4 mM | 4 mM | 4 mM |
| Espécies | <i>T. cruzi</i> cepa Y e <i>L. guyanensis</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL-Brener, <i>T. cruzi</i> cepa Y, <i>T. lewisi</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. evansi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. mega</i> , <i>T. dionisii</i> , <i>T. conorhini</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL-Brener, <i>T. cruzi</i> cepa Y, <i>T. lewisi</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. evansi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. mega</i> , <i>T. dionisii</i> , <i>T. conorhini</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL-Brener, <i>T. cruzi</i> cepa Y, <i>T. lewisi</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. evansi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. mega</i> , <i>T. dionisii</i> , <i>T. conorhini</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL-Brener, <i>T. cruzi</i> cepa Y, <i>T. lewisi</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. evansi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. mega</i> , <i>T. dionisii</i> , <i>T. conorhini</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL-Brener, <i>T. cruzi</i> cepa Y, <i>T. lewisi</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. evansi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. mega</i> , <i>T. dionisii</i> , <i>T. conorhini</i> , <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> |

3. 5. Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de PCR *singleplex* foram observados a partir de uma eletroforese em gel de agarose a 2%, onde foi adicionado GelRed™ (BIOTIUM) 50x diluído e o marcador de peso molecular *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Fermentas®) foi corrido no gel junto com as amostras para que pudéssemos observar o tamanho dos fragmentos.

Os produtos de PCR *multiplex* e as diluições foram observados a partir de uma eletroforese em gel de agarose 2%, que foram corados com brometo de etídio a uma concentração final de 1 µg/mL e o marcador de peso molecular *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Fermentas®) foi corrido no gel junto com as amostras para que pudéssemos observar o tamanho dos fragmentos.

A fonte da cuba de eletroforese, fabricada pela empresa *Major Science*, modelo MP-3AP, que foi ajustada em todos os ensaios para 100 V, 430 mA, por aproximadamente 1 hora. A eletroforese se deu em uma cuba fabricada pela empresa *Loccus Biotecnologia*, modelo LCH 13x15. O tampão utilizado para preparar os géis e na cuba para a passagem da corrente foi o TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 2mM e pH 8,5).

Para a fotodocumentação dos géis das PCRs *singleplex*, foi utilizado o fotodocumentador da *Loccus Biotecnologia* modelo L-PIX. Para a fotodocumentação dos géis de sensibilidade e das PCRs *multiplex*, foi utilizado o fotodocumentador *DNR* modelo MiniBis Pro, utilizado no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (IOC/FIOCRUZ).

3. 6. Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento

Após a visualização dos produtos de PCR em gel de agarose, os fragmentos que apresentaram banda única foram purificados de forma direta, ou seja, o restante da reação do tubo foi submetido à purificação direta. As amostras que apresentaram alguma inespecificidade foram totalmente submetidas à eletroforese seguido da excisão da banda do gel. Ambas as purificações foram feitas com o kit de purificação em coluna *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), visando seu posterior sequenciamento.

Para a realização do sequenciamento, foram adicionados 3 μL do produto de PCR purificado em 1 μL do seu respectivo iniciador (cada amostra com uma reação com o respectivo iniciador *forward*, e outra reação para *reverse*) à 3,2 pmoles e H_2O Milli-Q (Millipore) para completar o volume final de 7,5 μL por tubo ou poço de reação. Foram utilizados tubos *Eppendorf* de 1,5 mL e microplaca de 96 poços *Axygen*. Após esse processo, as amostras foram enviadas à Plataforma de Sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ e foram sequenciadas em sequenciador capilar ABI 3700, utilizando o reagente *BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit*, pelo método de Sanger, onde somente uma fita do DNA é lida por corrida.

3. 7. Análise das sequências obtidas

O resultado do sequenciamento foi gravado em uma mídia tipo CD na própria plataforma de sequenciamento PDTIS (IOC/FIOCRUZ). As sequências que apresentavam seus cromatogramas, com *software Chromas lite 2.1.1* (Technelysium PTY LTD, 1998), com ambiguidade baixa e alta confiabilidade foram submetidas a uma busca por similaridade utilizando o *blastn* (nucleotídeo contra banco de dados de nucleotídeo) e o *blastx* (nucleotídeo contra banco de dados de proteína) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) (Altschul *et al.* 1990; 1997) contra o banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a fim de confirmar se as sequências obtidas no sequenciamento foram realmente as sequências esperadas dos seus respectivos *loci*.

As sequências foram alinhadas e editadas utilizando o *software BioEdit 7.2.5*. Para o alinhamento das sequências foi utilizado o alinhador *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1997), que é um recurso presente no *software BioEdit 7.2.5*. Após o alinhamento das sequências, as mesmas foram editadas com base no tamanho, para que todas as sequências apresentassem o mesmo tamanho e, além disso, as sequências foram comparadas com seus respectivos cromatogramas, utilizando o *software Chromas lite 2.1.1* (Technelysium PTY LTD, 1998), para evitar possíveis artefatos de sequenciamento.

3. 8. Construção das árvores filogenéticas

As árvores filogenéticas foram construídas a partir das sequências alinhadas pelo *software ClustalW* pelo método de reconstrução de *Neighbor-Joining*, onde foi utilizado o modelo distância-p e a opção *complete deletion* para a remoção de *gaps* e de dados perdidos antes do início das análises. Todas as árvores foram construídas com valores de *bootstrap* baseados em 1000 réplicas. Para cada *locus* de Kinetoplastea e de Apicomplexa foi construída uma árvore com os organismos que apresentaram sequências de qualidade utilizando o *software MEGA 6.0.6* (Tamura *et al.* 2013).

4. RESULTADOS

4. 1. Teste de sensibilidade dos iniciadores desenhados, a partir de diluições seriadas do DNA dos protozoários.

Para cada um dos iniciadores foram realizados testes de sensibilidade que consistiram numa diluição seriada das amostras de DNA dos parasitas testados, seguida da reação de PCR padrão de *singleplex* para cada um dos gêneros testados. A tabela 7 representa esse resultado de forma simplificada, onde é possível comparar os iniciadores por gênero testado.

A menor concentração em que foi obtida amplificação de produto de PCR foi as concentrações de 10 pg/μL de DNA, onde as amostras de *Leishmania* para SerRS e TPI, *Trypanosoma* para DRG1, MetRS e U5 snRNP e *Plasmodium* em U5 snRNP foram amplificadas com sucesso, bem como para a concentração de 1 pg/μL de DNA, a concentração mais baixa, para *Leishmania* e *Trypanosoma* com o marcador LeuRS. Enquanto isso, o par de iniciadores que mostrou a menor sensibilidade foi para a família gênica MSH, onde para o gênero *Leishmania* obteve-se amplificação até a concentração de 10 ng/μL, e na espécie do gênero *Trypanosoma* houve amplificação até uma concentração menor de DNA, 100 pg/μL. Estes resultados indicam uma maior sensibilidade, ou seja, esses iniciadores necessitam de uma menor quantidade de molde de DNA dos *loci* LeuRS, MetRS e U5 snRNP, no caso deste último para os três gêneros testados, e uma menor sensibilidade para MSH.

4. 1. 1. Classe Kinetoplastea

Foram selecionados um representante de cada um dos dois gêneros analisados neste estudo. Os tripanossomatídeos escolhidos foram *Trypanosoma cruzi* cepa Y, e *Leishmania (V.) guyanensis* cepa MHOM/BR/1975/M4147, os mesmos foram selecionados por apresentarem amplificação para todos os *loci* estudados nos ensaios *singleplex* previamente descritos. As mesmas amostras diluídas em série foram utilizadas para todos os *loci*, e as diluições variaram de 100 ng a 0,1 fg.

4. 1. 1. 1. Locus *Seryl-tRNA synthetase* (SerRS)

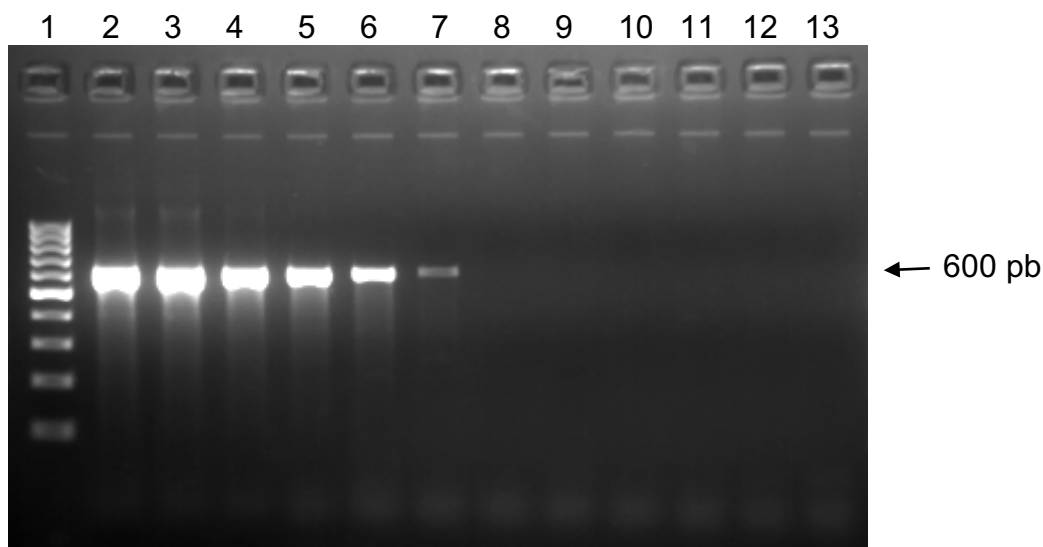


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para SerRS para *Leishmania*. Teste com diluições *locus Seryl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 172) para o gênero *Leishmania*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

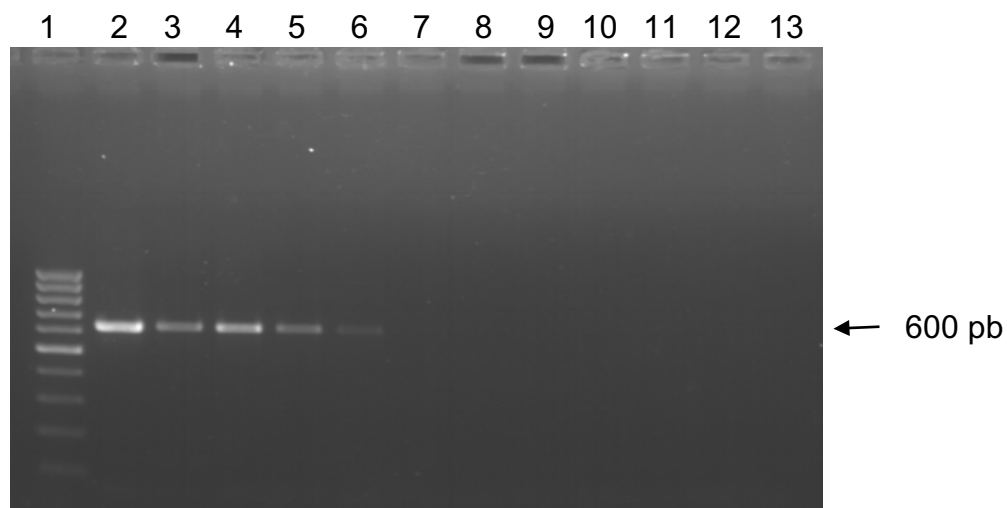


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para SerRS para *Trypanosoma*. Teste com diluições *locus Seryl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 172) para o gênero *Trypanosoma*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as

concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 1. 2. *Locus Triosephosphate isomerase (TPI)*

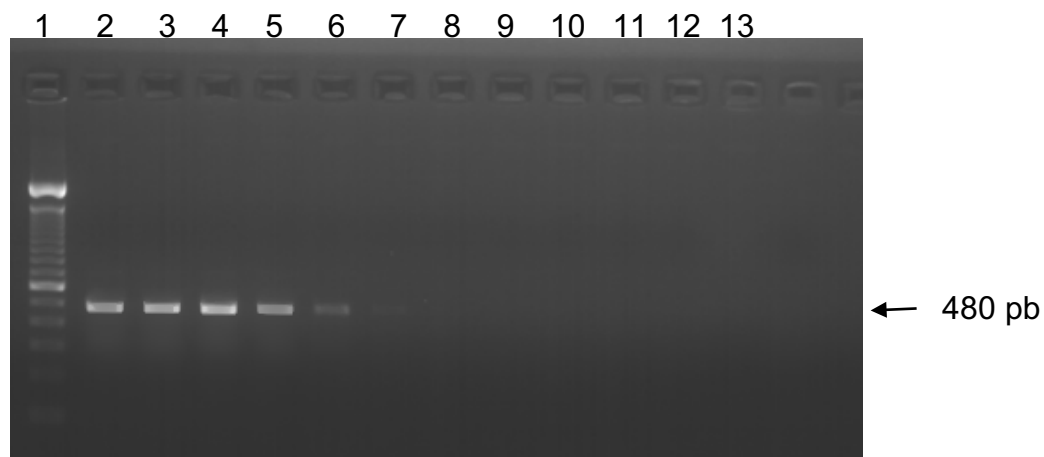


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para TPI para *Leishmania*. Teste com diluições *locus Triosephosphate isomerase* (par de iniciadores 30) para o gênero *Leishmania*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

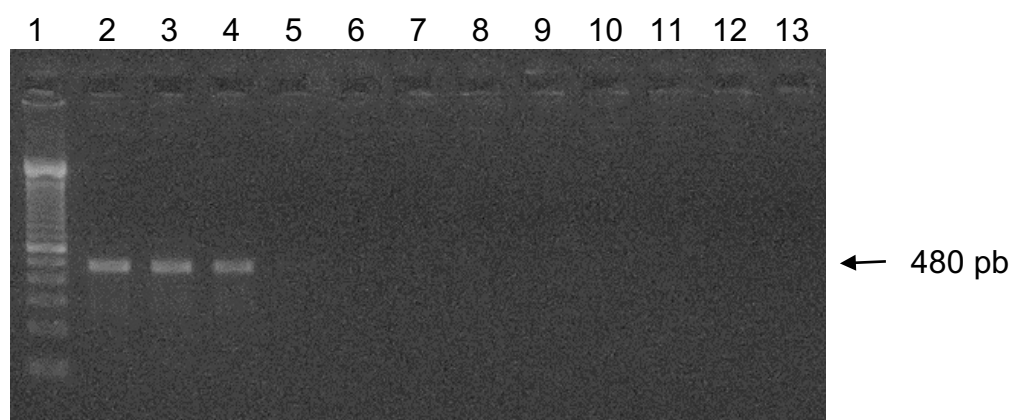


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para TPI para *Trypanosoma*. Teste com diluições *locus Triosephosphate isomerase* (par de iniciadores 30) para o gênero *Trypanosoma*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as

concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 1. 3. *Locus Leucyl-tRNA synthetase (LeuRS)*

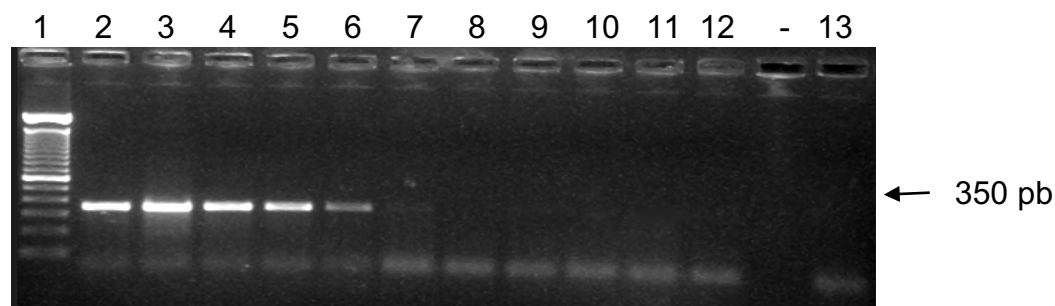


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para LeuRS para *Leishmania*. Teste com diluições *locus Leucyl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 38) para o gênero *Leishmania*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

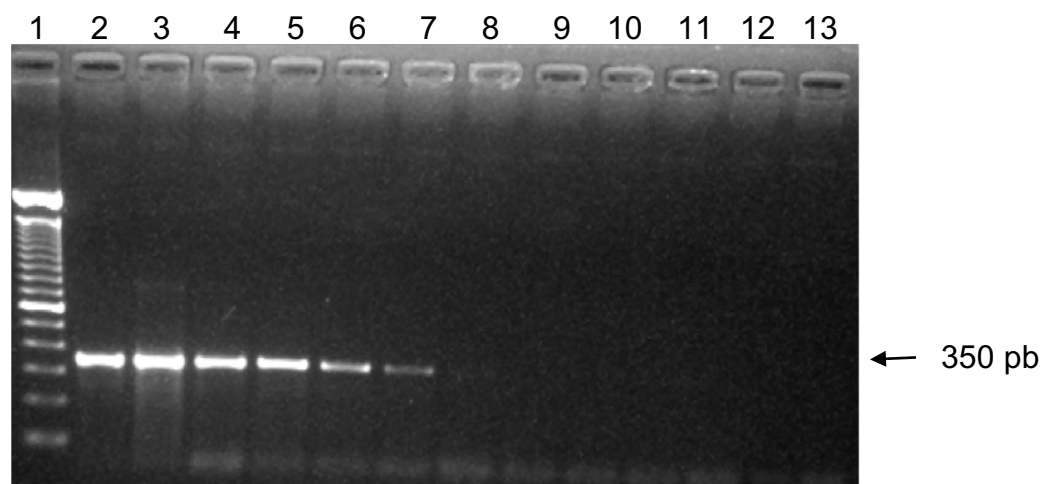


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para LeuRS para *Trypanosoma*. Teste com diluições *locus Leucyl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 38) para o gênero *Trypanosoma*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 1. 4. Locus *U5 snRNP spliceosome subunit* (U5 snRNP)

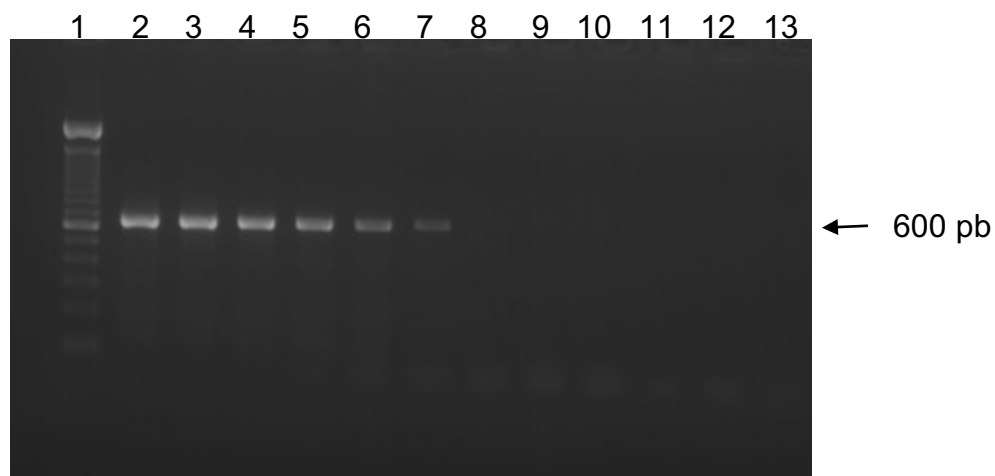


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para U5 snRNP para *Leishmania*. Teste com diluições *locus U5 snRNP spliceosome subunit* (par de iniciadores 34) para o gênero *Leishmania*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

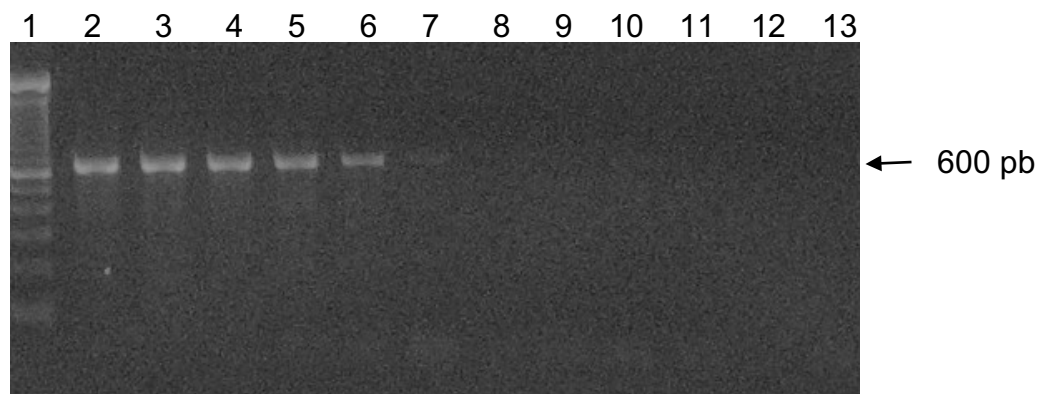


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para U5 snRNP para *Trypanosoma*. Teste com diluições *locus U5 snRNP spliceosome subunit* (par de iniciadores 34) para o gênero *Trypanosoma*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 1. 5. Locus Mismatch repair ATPase MSH2, MSH3 e MSH8 (MSH2, MSH3 e MSH8)

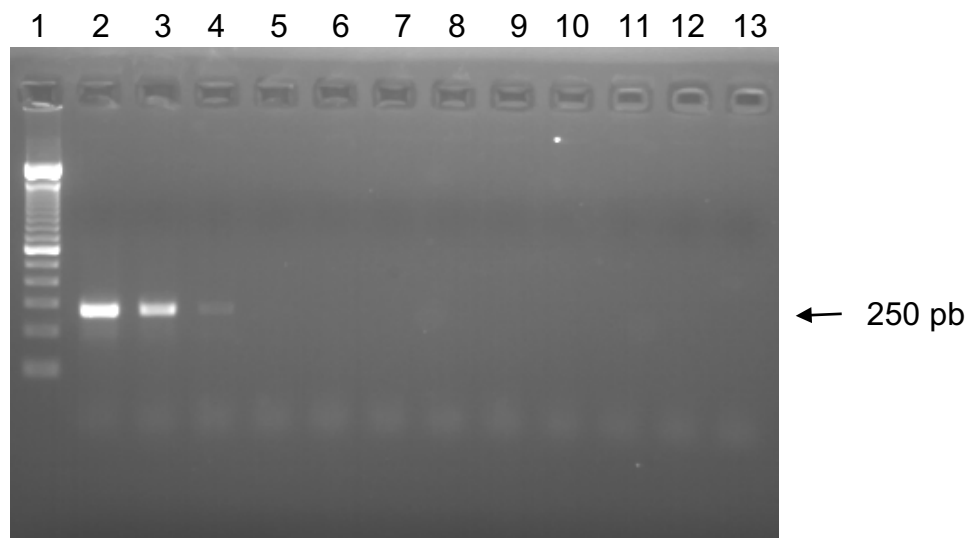


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para MSH para *Leishmania*. Teste com diluições *locus Mismatch repair ATPase MSH2, MSH3 e MSH8* (par de iniciadores 20) para o gênero *Leishmania*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

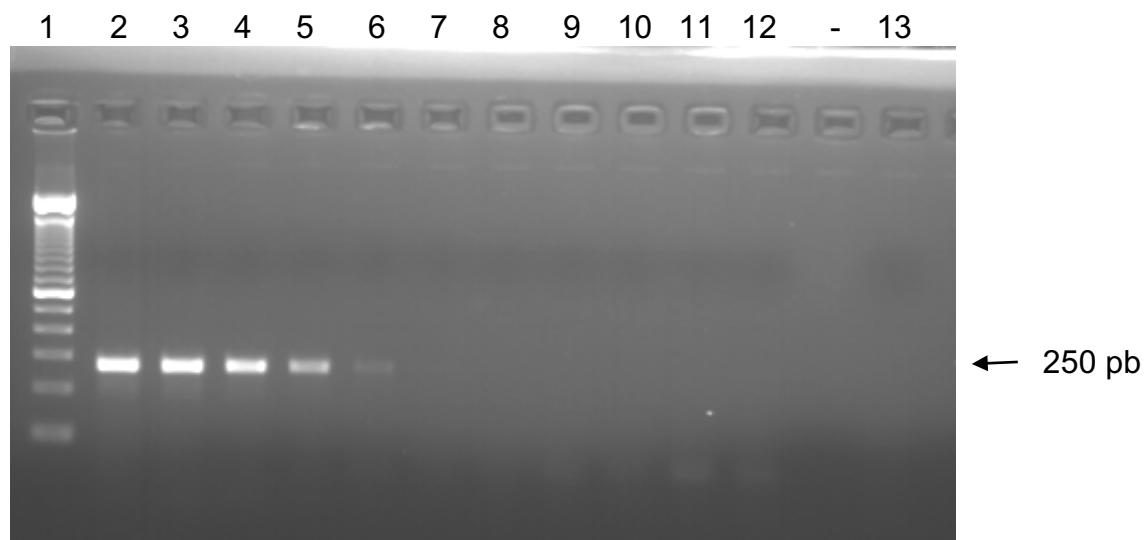


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para MSH para *Trypanosoma*. Teste com diluições *locus Mismatch repair ATPase MSH2, MSH3 e MSH8* (par de iniciadores 20) para o gênero *Trypanosoma*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão

respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 1. 6. *Locus Methionyl-tRNA synthetase (MetRS)*

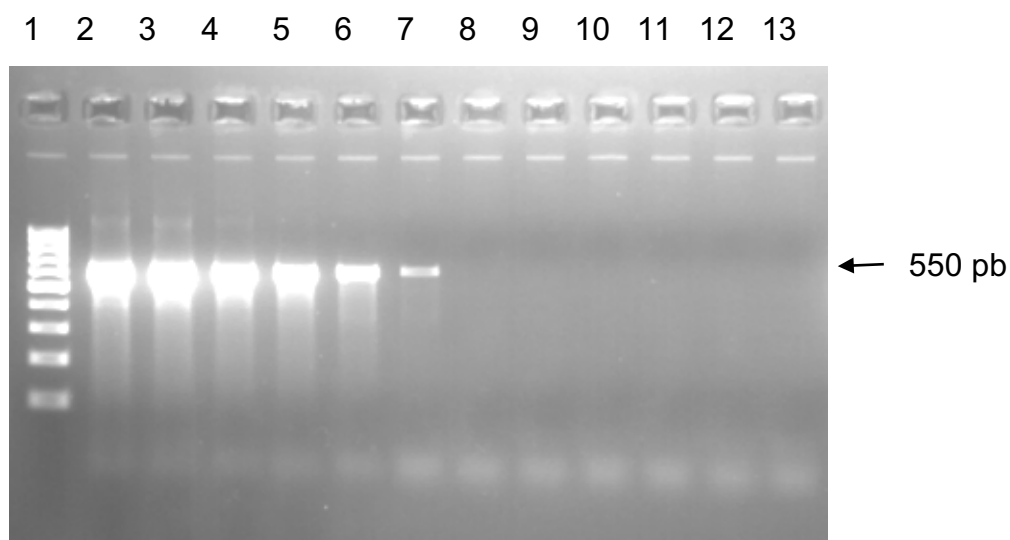


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para *MetRS* para *Leishmania*. Teste com diluições *locus Methionyl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 143) para o gênero *Leishmania*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

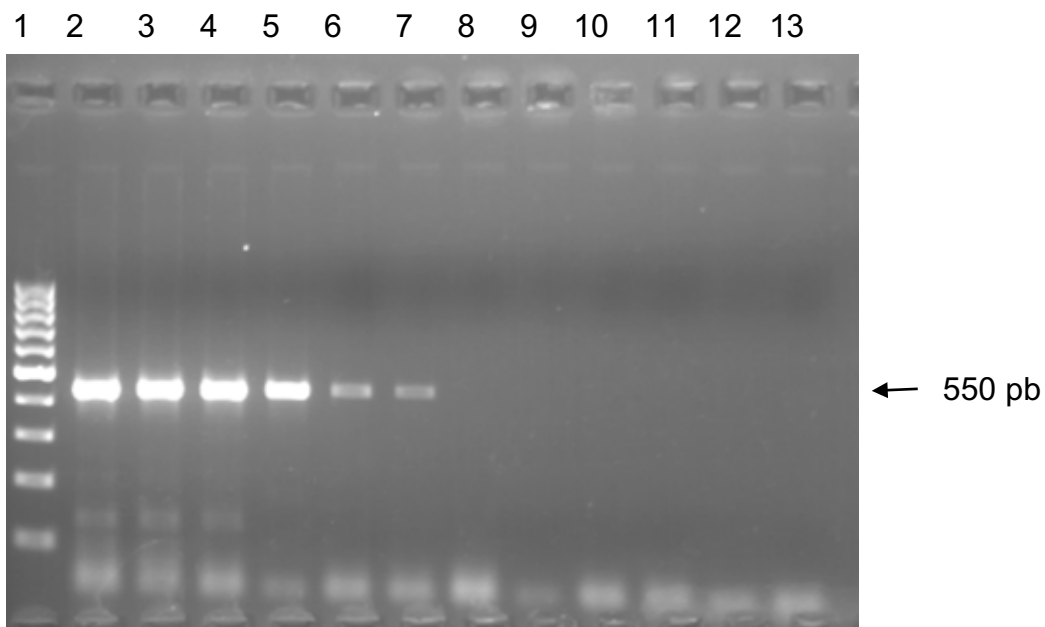


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para MetRS para *Trypanosoma*. Teste com diluições *locus Methionyl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 143) para o gênero *Trypanosoma*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 1. 7. Locus *GTP-binding protein* (DRG1)

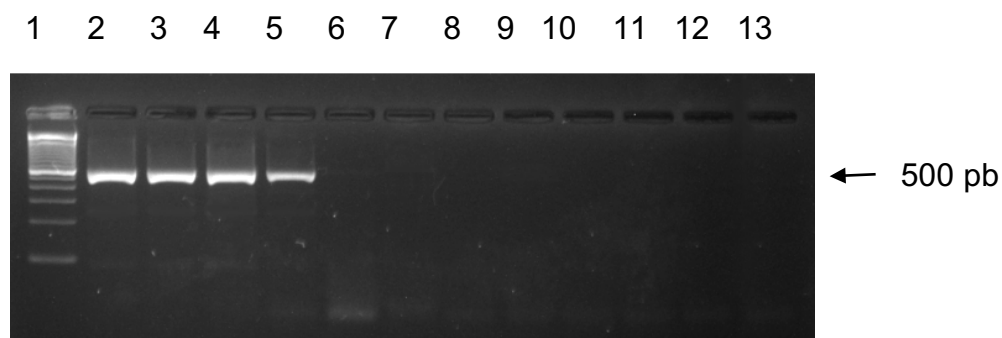


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para DRG1 para *Leishmania*. Teste com diluições *locus GTP-binding protein* (par de iniciadores 27) para o gênero *Leishmania*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

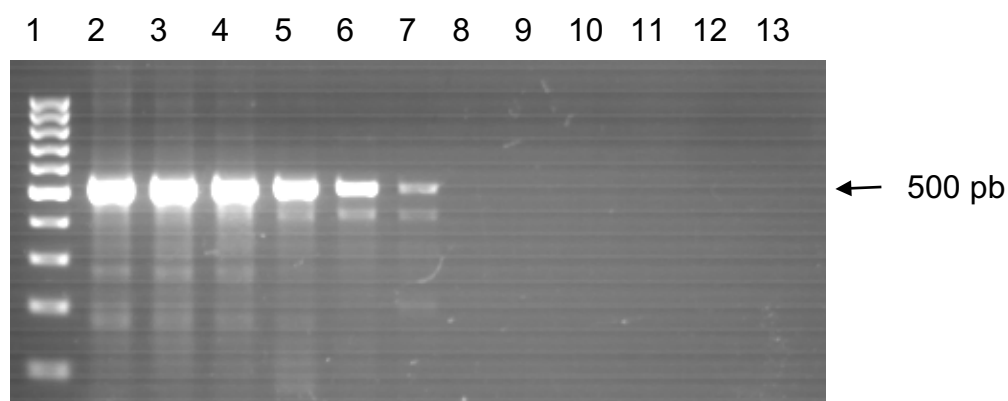


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para DRG1 para *Trypanosoma*. Teste com diluições *locus GTP-binding protein* (par de iniciadores 27) para o gênero *Trypanosoma*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 2. Filo Apicomplexa

Foram selecionados um representante do gênero *Plasmodium* para realizar as diluições. O *Plasmodium falciparum* cepa FUP foi selecionado por apresentar resultados positivos para os dois *loci* estudados nos ensaios *singleplex* previamente descritos. A presente amostra diluída em série foi utilizada para ambos os *loci*, e as diluições variaram de 100 ng a 0,1 fg.

4. 1. 2. 1. Locus *U5 snRNP spliceosome subunit* (U5 snRNP)

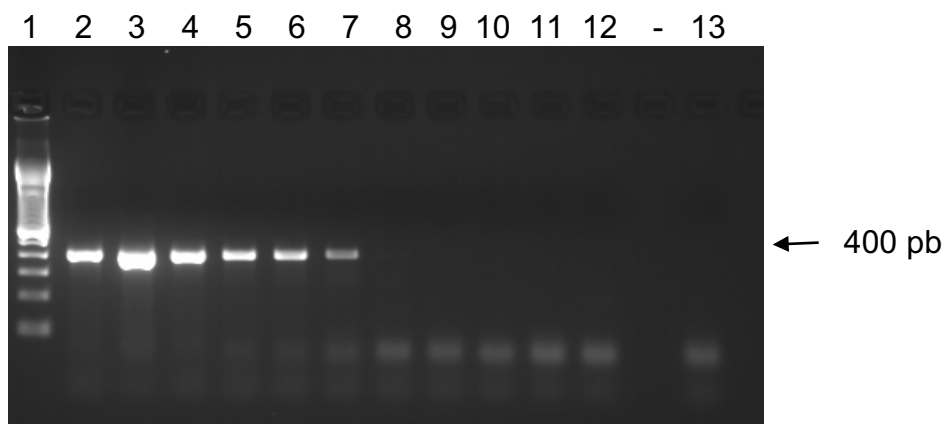


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para U5 snRNP. Teste com diluições *locus U5 snRNP spliceosome subunit* (par de iniciadores 35) para o gênero *Plasmodium*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

4. 1. 2. 2. Locus *GTP-binding protein* (DRG1)

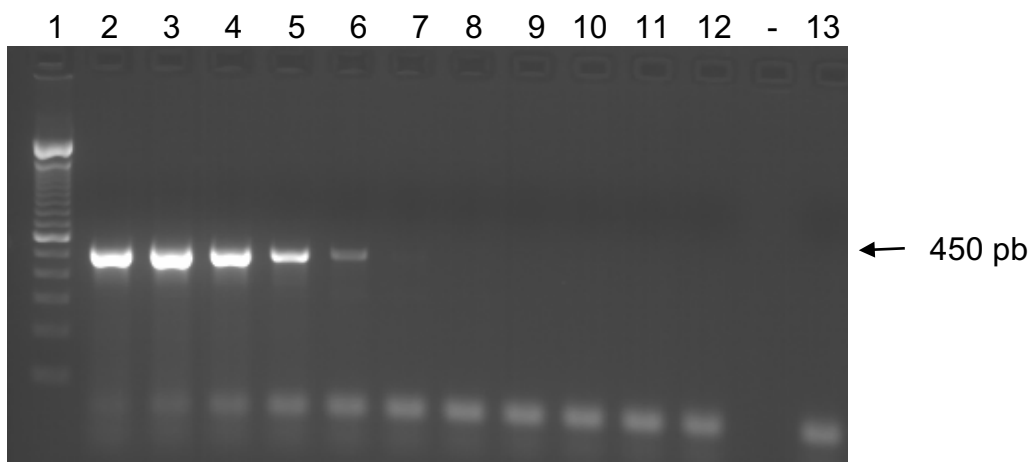


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio para DRG1. Teste com diluições *locus GTP-binding protein* (par de iniciadores 28) para o gênero *Plasmodium*. Na *lane* 1, contém o marcador de peso molecular 100 pares de base, nas *lanes* de 2 a 12 estão respectivamente as concentrações de 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 0,1 fg, por fim, na *lane* 13 contém o controle negativo.

Tabela 7. Resultado do ensaio de sensibilidade. Resultado do teste de sensibilidade a partir da diluição seriada dos DNAs de *Trypanosoma cruzi* cepa Y, *Leishmania guyanensis* e *Plasmodium falciparum* cepa FUP. Os pares de iniciadores estão representados através de seus códigos numéricos. As concentrações utilizadas foram 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 1 fg, 1 fg e 0,1 fg. Onde (+) representa o resultado positivo e (-) representando os negativos.

| Concentração | ng | | | | pg | | | fg | | | |
|------------------------|-----|----|----|---|-----|----|---|-----|----|---|-----|
| | 100 | 50 | 10 | 1 | 100 | 10 | 1 | 100 | 10 | 1 | 0,1 |
| 172 Leishmania | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 172 Trypanosoma | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 30 Leishmania | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 30 Trypanosoma | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 38 Leishmania | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 38 Trypanosoma | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 34 Leishmania | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 34 Trypanosoma | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 20 Leishmania | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 Trypanosoma | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 143 Leishmania | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 143 Trypanosoma | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 27 Leishmania | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 27 Trypanosoma | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 35 Plasmodium | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 28 Plasmodium | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

4. 2. Padronização inicial da PCR *singleplex* para todos os *loci*

Durante a padronização inicial da reação de PCR *singleplex* para todas as amostras, foram utilizadas as mesmas condições para todos os pares de iniciadores. Isto foi feito para que fosse possível posteriormente desenhar uma reação de PCR *multiplex* abrangendo a maior quantidade de *loci* possível, desta forma, estabeleceu-se um protocolo para os diferentes iniciadores utilizados no presente trabalho. Na tabela 8, foi possível sumarizar os resultados obtidos com os ensaios *singleplex*, onde foram testados um total de 17 amostras de DNA para 9 pares de iniciadores para espécies de Kinetoplastea e Apicomplexa.

Inicialmente foi testado o par de iniciadores 38 para o *locus* LeuRS, que apresentou amplificação para todas as espécies testadas (Figuras 19 e 20), assim como os iniciadores para os *loci* TPI e MSH. Para assegurar que não haveria contaminação de espécies de um gênero em reações com espécies do outro gênero, as reações foram realizadas separadamente, e isto ocorreu para todos os *loci*. O *locus* DRG1 (par de iniciadores 27) não apresentou amplificação somente das espécies *T. mega* e *T. brucei*.

Os *loci* U5 snRNP, MetRS e SerRS, par de iniciadores 34, 143 e 172, respectivamente, não apresentaram amplificação para todas as espécies testadas. O par de iniciadores par 34 não amplificou as amostras de *T. mega* e *T. vivax*, o par 143 não amplificou as amostras de *T. mega*, *T. conorhini* e *T. vivax*, e o par de iniciadores 172 não amplificou as amostras de *T. lewisi*, *T. conorhini*, *T. vivax*, *T. evansi* e *T. brucei*, onde o par 172 mostrou ser o par de iniciadores com a menor abrangência dentre os testados.

Os iniciadores para MetRS e SerRS apresentaram o menor número de espécies amplificadas, e os iniciadores para MetRS apresentaram bandas inespecíficas em algumas espécies, mas através do método de excisão da banda foi possível sequenciar a banda esperada. Os iniciadores para o *locus* SerRS não apresentaram bandas inespecíficas, porém foi o par de iniciadores que amplificou o menor número de espécies, sendo 10 dos 15 Kinetoplastea utilizados. Em MetRS, não houve amplificação em *T. vivax*, *T. mega* e *T. conorhini*.

Nos testes com os iniciadores para Apicomplexa, foram utilizadas duas espécies deste filo, *P. vivax* e *P. faciparum*. O *locus* DRG1 (par de iniciadores 28), mostrou-se eficiente para ambas as espécies (Figura 21), porém as cepas de *P.*

falciparum (cepas FUP, PSS1 e W2) amplificaram *P. vivax* (PV1, PV2 e PV3), que possuem a uma mesma cepa, sendo que a amostra PV2 não funcionou em nossos testes. Já o *locus* para U5 snRNP (iniciadores par 35) embora também tenha funcionado para ambas as amostras testadas, mantendo um padrão de amplificação semelhante ao visto com o par de iniciadores 28, o presente par de iniciadores se mostrou mais sensível e ainda houve amplificação da amostra PV2, que não apresentou amplificação para o outro *locus* testado (DRG1). Apesar desta amostra ter sido amplificada, sua especificidade foi baixa, como pode ser observado na figura 22.

Para o *locus* LeuRS, todas as amostras foram amplificadas. Ao observar a figura 19, é possível perceber na *lane* 8 que não houve amplificação, isso ocorreu porquê uma das amostras de *T. vivax* testadas estava com o DNA degradado, mas a outra amostra foi amplificada.

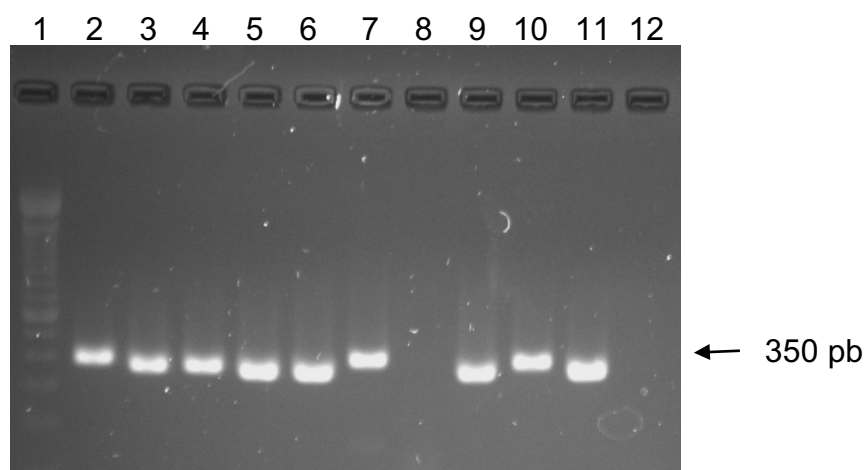


Figura 19. Teste de PCR *singleplex* para o *locus* LeuRS (iniciadores par 38) em *Trypanosoma*. Eletrorese em gel de agarose 2%, onde (1) 100 bp, (2) *Trypanosoma mega*, (3) *T. conorhini*, (4) *T. vivax* 1, (5) *T. cruzi* CL Brener (6) *T. lewisi*, (7) *T. dionisii*, (8) *T. vivax* 2, (9) *T. evansi*, (10) *T. brucei*, (11) *T. cruzi* Y e (12) é o controle negativo.

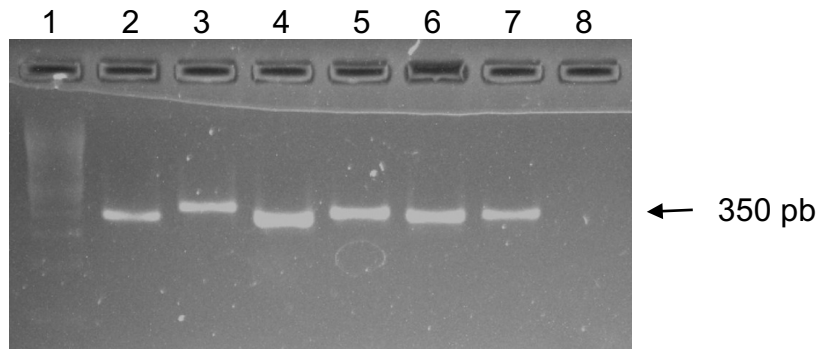


Figura 20. Teste de PCR *singleplex* para o locus LeuRS (iniciadores par 38) em *Leishmania*. Eletrorese em gel de agarose 2%, onde (1) 100 bp, (2) *Leishmania major*, (3) *L. amazonensis*, (4) *L. mexicana*, (5) *L. braziliensis* (6) *L. infantum*, (7) *L. guyanensis*, e (8) é o controle negativo.

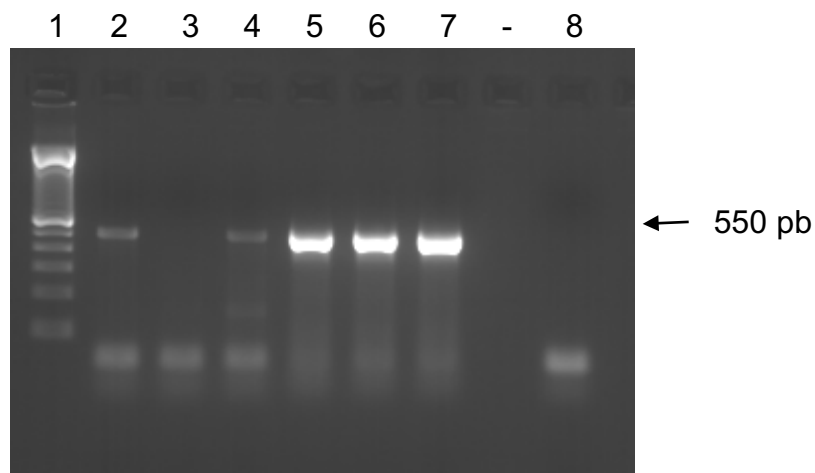


Figura 21. Teste de PCR *singleplex* para o locus DRG1 (iniciadores par 28). Eletrorese em gel de agarose 2% com as amostras de *P. vivax* e *P. falciparum*, onde na *lane* (1) está o marcador de peso molecular 100 bp, na *lane* (2) PV1, (3) PV2, (4) PV3, (5) FUP, (6) PSS1, (7) W2 e (8) está o controle negativo.

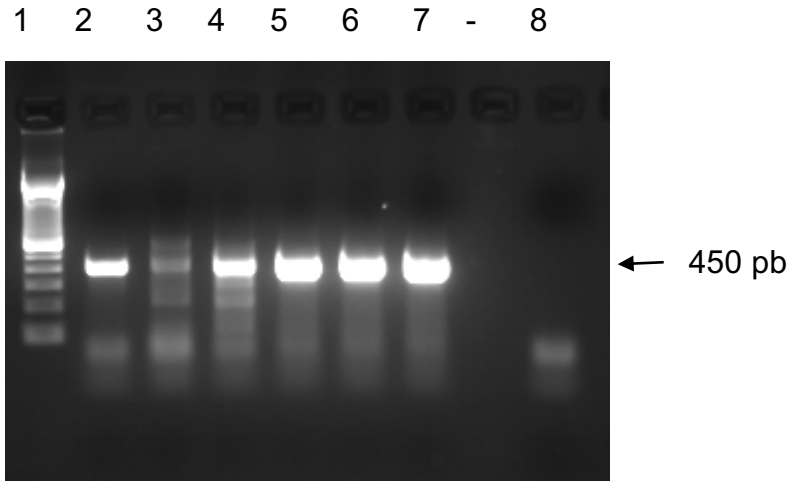


Figura 22. Teste de PCR *singleplex* para o locus U5 snRNP (iniciadores par 35). Eletrorese em gel de agarose 2% com as amostras de *P. vivax* e *P. falciparum*, onde na *lane* (1) está o marcador de peso molecular 100 bp, na *lane* (2) PV1, (3) PV2, (4) PV3, (5) FUP, (6) PSS1, (7) W2 e (8) está o controle negativo.

Tabela 8. Resultado das PCRs *singleplex*. Resultado das PCRs *singleplex* para cada um dos nove *loci* utilizados no presente estudo, *Leucyl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 38), *GTP-binding protein* (par de iniciadores 27), *Triosephosphate isomerase* (par de iniciadores 30), *U5 snRNP spliceosome subunit* (par de iniciadores 34), *Mismatch repair ATPase MSH2, MSH3 e MSH8* (par de iniciadores 20), *Methionyl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 143), *Seryl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 172), *GTP-binding protein* (par de iniciadores 28) e *U5 snRNP spliceosome subunit* (par de iniciadores 35), respectivamente. Os protozoários parasitas utilizados estão listados abaixo e correlacionados com os *loci* para os quais foram testados. Onde (+) representa o resultado positivo (houve amplificação) e (-) representando os negativos (não houve amplificação)

| <i>Parasitas</i> | <i>Leu tRNA synthetase (38)</i> | <i>DRG1 (27)</i> | <i>TPI (30)</i> | <i>U5 snRNP (34)</i> | <i>MSH2, 3 e 8 (20)</i> | <i>Met tRNA synthetase (143)</i> | <i>Ser tRNA synthetase (172)</i> | <i>DRG1 (28)</i> | <i>U5 snRNP (35)</i> |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|----------------------|
| <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Trypanosoma lewisi</i> | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>Trypanosoma mega</i> | + | - | + | - | + | - | + | - | - |
| <i>Trypanosoma dionisii</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Trypanosoma conorhini</i> | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>Trypanosoma vivax</i> | + | + | + | - | + | - | - | - | - |
| <i>Trypanosoma evansi</i> | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | + | - | + | + | + | + | - | - | - |
| <i>Leishmania braziliensis</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Leishmania guyanensis</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Leishmania major</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Leishmania mexicana</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Leishmania amazonensis</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Leishmania infantum</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Plasmodium vivax</i> | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | - | - | - | - | - | - | - | + | + |

4. 3. Padronização da PCR *multiplex*

Para os ensaios de PCR *multiplex* foram utilizados os *loci* LeuRS, U5 snRNP, MSH, TPI e DRG1, pois eram os iniciadores com a maior eficiência dentre os sete testados. Além disso, foram utilizados apenas dois *loci* para Apicomplexa nos ensaios *singleplex*, desta forma, devido ao número limitado de iniciadores disponíveis não foi realizada a PCR *multiplex*. O *locus* para TPI foi encontrado em diversos estudos na literatura como *locus* de protozoários em estudos *multilocus* (Lemee *et al*, 2004; Ghoneim *et al*, 2012; Hu *et al*, 2015), bem como o *loci* U5 snRNP, onde o complexo snRNP foi utilizado como marcador para a identificação de retinite pigmentosa (Benaglio *et al*, 2014).

4. 3. 1. *Multiplex* 1 – Para este ensaio, foram utilizados dois pares de iniciadores para LeuRS com 350 pb e TPI com 480 pb.

Primeiramente foram testados em duas espécies a reação *multiplex* contento dois *loci*, LeuRS e TPI. Nesta reação, foi possível visualizar claramente as bandas esperadas, mas, além disso, também se observou bandas inespecíficas. Os iniciadores selecionados neste primeiro teste foram os que não apresentavam bandas inespecíficas para estes *loci*. Para a reação de PCR *multiplex* 2 a temperatura de hibridação foi aumentada a fim de aumentar a estrigência.

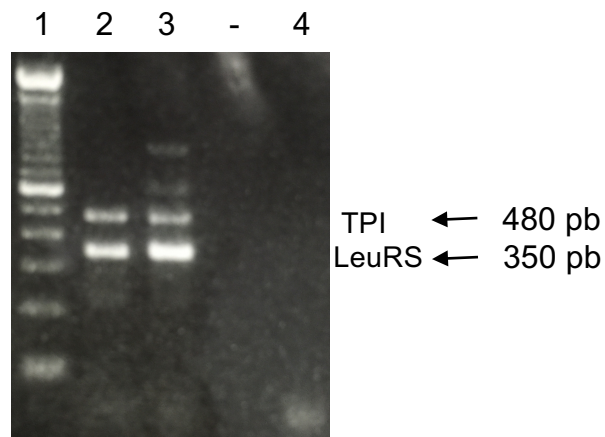


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR *multiplex* 1. Eletroforese para os *loci* LeuRS e TPI. Nas lanes estão presentes o marcador de peso molecular 100 bp (1), *Trypanosoma cruzi* cepa Y (2) e *Leishmania guyanensis* (3) e controle negativo (4), com uma temperatura de hibridação de 58°C.

4. 3. 2. *Multiplex* 2 – Para esta reação, foram utilizados três pares de iniciadores, sendo eles LeuRS com 350 pb, MSH3, 6 e 8 com 265/268 pb e U5 snRNP com 656 pb.

A reação *multiplex* 2, foi executada com uma temperatura de hibridação de 60°C e diminuiu a inespecificidade, foram testados três *loci*, LeuRS, U5 snRNP e MSH, por possuírem tamanhos significativamente diferentes. Apesar de não haver amplificação inespecífica, algumas amostras que funcionavam normalmente quando avaliadas no PCR *singleplex* não amplificaram. Nesta reação, era esperado que não houvesse amplificação de *T. vivax* e *T. mega* com o par de iniciadores 34, que também não amplificou as amostras de *T. dionisii* e *L. braziliensis*. Porém, as amostras de *T. vivax*, *T. mega*, *T. evansi* e *T. brucei* não amplificaram para nenhum dos três *loci*, sugerindo que um aumento de temperatura de dois graus pode ter sido o suficiente para que não ocorresse mais a amplificação.

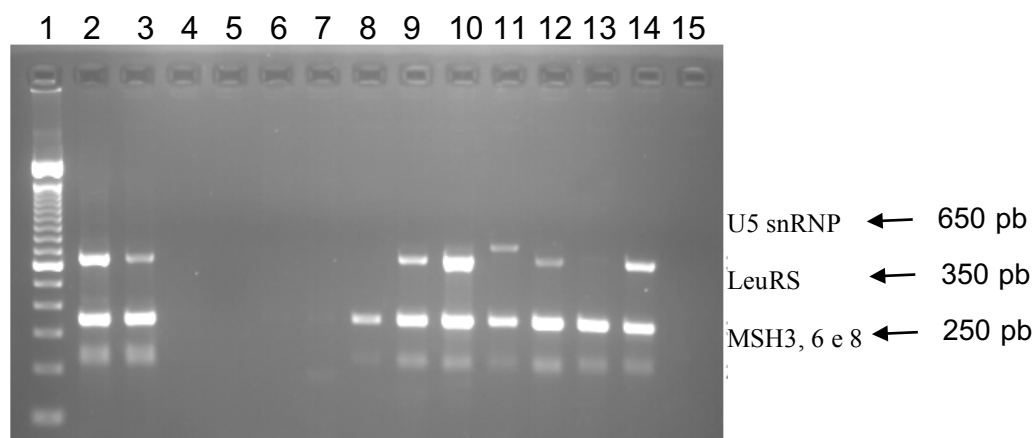


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR *multiplex* 2. Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR *multiplex* para os iniciadores LeuRS, MSH3, 6 e 8 e U5 snRNP. Sendo (1) 100 bp, (2) *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener, (3) *T. lewisi*, (4) *T. vivax*, (5) *T. evansi*, (6) *T. brucei*, (7) *T. mega*, (8) *T. dionisii*, (9) *T. conorhini*, (10) *Leishmania amazonensis*, (11) *L. major*, (12) *L. mexicana*, (13) *L. braziliensis*, (14) *L. infantum* e (15) controle negativo, com uma temperatura de hibridação de 60°C.

4. 3. 3. *Multiplex* 3 – Para este ensaio, foram utilizados os pares de iniciadores para LeuRS com 350 pb, U5 snRNP com 656 pb e MSH3, 6 e 8 com 265/268 pb.

Na reação *multiplex* 3, foram utilizadas as mesmas espécies, porém com uma temperatura de 58°C, mantendo os três *loci* testados na *multiplex* 2, e reduzindo a concentração de MgCl₂ de 4 mM para 3 mM, com o objetivo de testar se sua diminuição não ocasionaria alguma variação no padrão de amplificação, ou se somente reduziria a inespecificidade. Foi possível observar a ausência de amplificação para o *locus* U5 snRNP, e a não amplificação das espécies *T. mega*, *T. evansi*, *T. brucei*, *T. conorhini*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, desta forma, foi escolhido utilizar a concentração máxima de MgCl₂ de 4 mM por reação para que fosse possível amplificar todas as amostras com todos os *loci* testados.

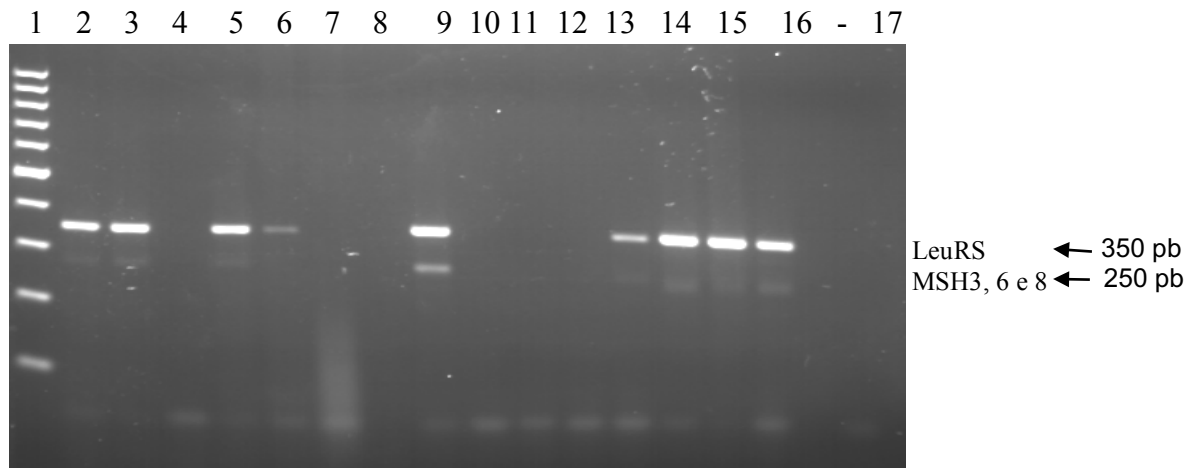


Figura 25. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR *multiplex* 3. Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR *multiplex* com os iniciadores para LeuRS, U5 snRNP e MSH3, 6 e 8. Sendo (1) 100 bp, (2) *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener, (3) *T. cruzi* cepa Y, (4) *T. mega*, (5) *T. lewisi*, (6) *T. vivax*, (7) *T. evansi*, (8) *T. brucei*, (9) *T. dionisii*, (10) *T. conorhini*, (11) *Leishmania amazonensis*, (12) *L. guyanensis*, (13) *L. major*, (14) *L. mexicana*, (15) *L. braziliensis*, (16) *L. infantum* e (17) controle negativo, com uma temperatura de hibridação de 58°C.

4. 3. 4. *Multiplex* 4 – Para este ensaio, foram utilizados cinco *loci*, sendo eles LeuRS com 350 pb, U5 snRNP com 656 pb, DRG1 com 518 pb, TPI com 480 pb e MSH3, 6 e 8 com 265/268 pb.

Para a *multiplex* 4 foram utilizados cinco possíveis pares de iniciadores que poderiam ser utilizados para a padronização da PCR *multiplex*. Devido a competição pelo *template* de DNA, os iniciadores degenerados que possuem maior afinidade pelo fragmento de DNA acabam amplificando os fragmentos com maior eficácia. Observou-se na reação de PCR *multiplex* 4 este padrão, onde os iniciadores para LeuRS e DRG1 amplificaram com maior eficiência, enquanto os outros marcadores, não amplificaram em todas as amostras testadas. Inclusive, o marcador MSH, que manteve sua amplificação nas últimas 3 reações de PCR *multiplex*, não obteve amplificação para grande parte das amostras. Além disso, a temperatura de hibridação, em 59°C, e a concentração de MgCl₂, em 4 mM, foram modificadas.

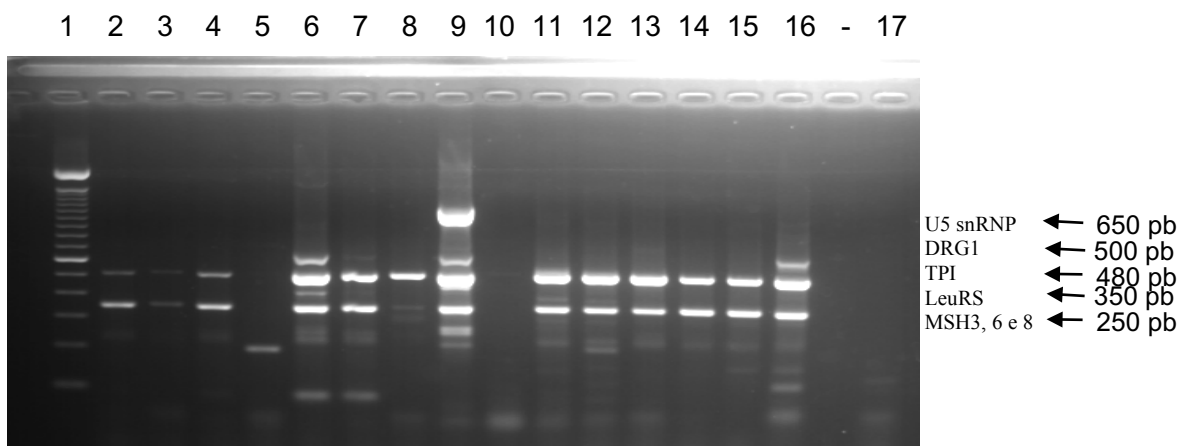


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR *multiplex* 4. Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR *multiplex* com os iniciadores para LeuRS, U5 snRNP, DRG1, TPI e MSH3, 6 e 8. Sendo (1) 100 bp, (2) *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener, (3) *T. conorhini*, (4) *T. lewisi*, (5) *T. mega*, (6) *T. dionisii*, (7) *T. cruzi* cepa Y, (8) *T. vivax*, (9) *T. evansi*, (10) *T. brucei*, (11) *Leishmania braziliensis*, (12) *L. guyanensis*, (13) *L. major*, (14) *L. mexicana*, (15) *L. amazonensis*, (16) *L. infantum* e (17) controle negativo, com uma temperatura de hibridação de 59°C.

4. 3. 5. *Multiplex* 5 - Para este ensaio, foram utilizados três *loci*, sendo eles LeuRS com 350 pb, U5 snRNP com 656 pb e DRG1 com 518 pb.

Devido à quantidade de *loci* que utilizados na reação de *multiplex* 4, os pares de iniciadores para TPI e MSH foram retirados com o objetivo de permanecerem apenas os marcadores mais eficientes na reação de *multiplex* 5. Esta reação foi a que melhor apresentou resultado dentre as seis, apesar das bandas inespecíficas encontradas. Essa inespecificidade na amplificação ocorre também pelo fato de serem diferentes marcadores degenerados e uma reação de PCR *multiplex* que precisa de padronização entre a classe Kinetoplastea, que abrange um grande número de espécies. Nesta reação, a amostra de *T. mega* não foi amplificada para nenhum dos *loci* e deveria amplificar o *locus* LeuRS, a amostra de *T. brucei* apresentou bandas inespecíficas e *T. vivax* amplificou somente para o *locus* DRG1, embora devesse amplificar também para o *locus* LeuRS.

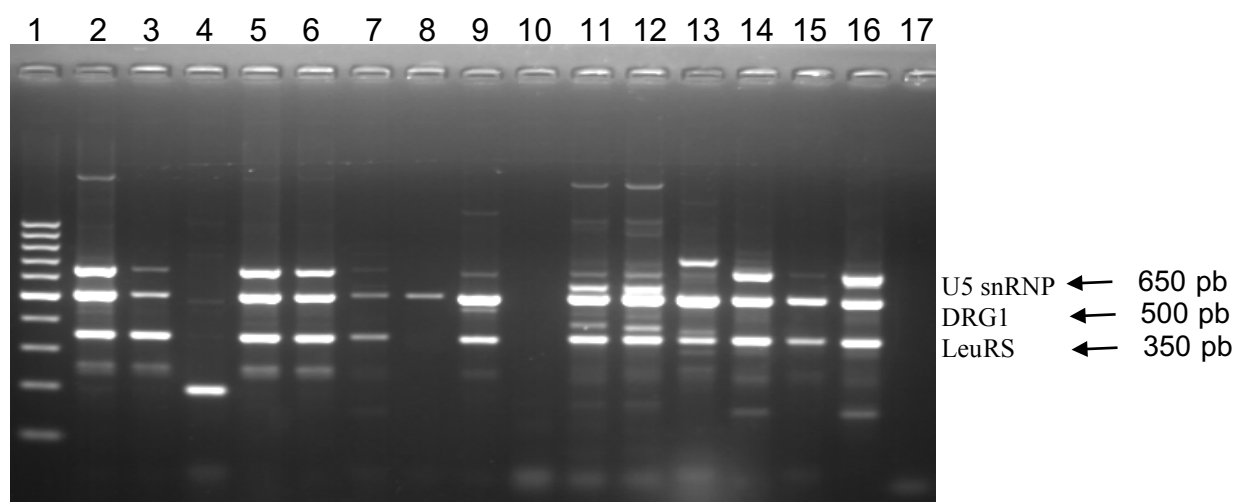


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR *multiplex* 5. Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR *multiplex* com os iniciadores para LeuRS, U5 snRNP e DRG1. Sendo (1) 100 bp, (2) *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener, (3) *T. cruzi* cepa Y (4) *T. brucei*, (5) *T. lewisi*, (6) *T. dionisii*, (7) *T. conorhini*, (8) *T. vivax*, (9) *T. evansi*, (10) *T. mega*, (11) *Leishmania braziliensis*, (12) *L. guyanensis*, (13) *L. major*, (14) *L. mexicana*, (15) *L. amazonensis*, (16) *L. infantum* e (17) controle negativo, com uma temperatura de hibridação de 59°C.

4. 3. 6. *Multiplex* 6 - Para este ensaio, foram utilizados quatro *loci*, sendo eles LeuRS com 350 pb, U5 snRNP com 656 pb e DRG1 com 518 pb e MSH3, 6 e 8 com 265/268 pb.

Na reação de PCR *multiplex* 6, foram adicionados os iniciadores utilizados na reação 5, juntamente com o par de iniciadores para MSH. A partir do momento que este marcador foi adicionado, houve amplificação para este *locus* somente em *T. mega* e *L. amazonensis*, das 15 amostras testadas amplificaram para este *locus*. Além disso, *T. brucei* não amplificou para nenhum dos *loci* testados.

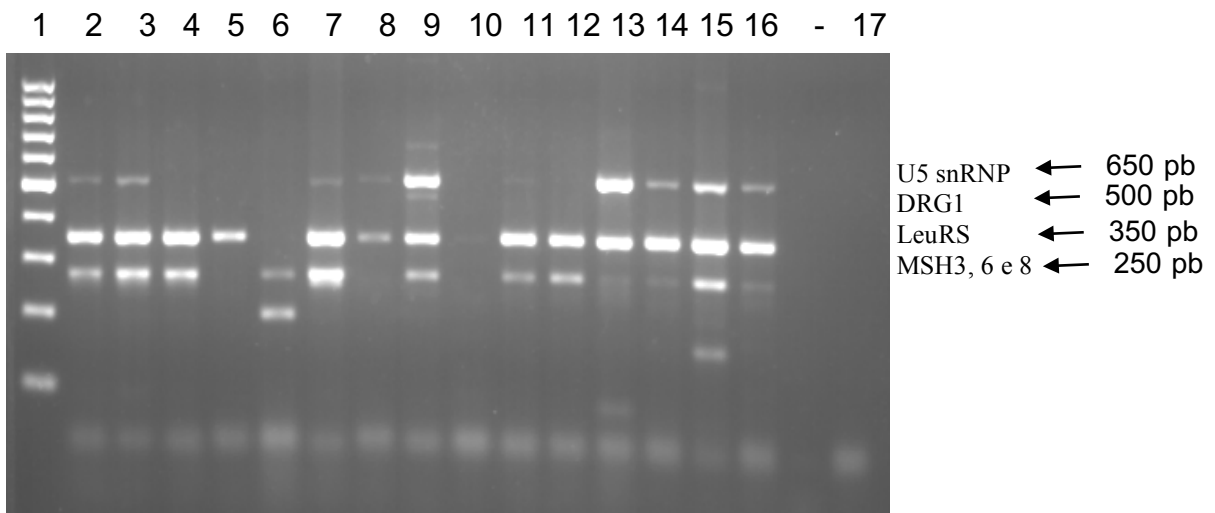


Figura 28. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da PCR *multiplex* 6. Eletroforese em gel de agarose 2% da PCR *multiplex* com os iniciadores para LeuRS, U5 snRNP, DRG1 e MSH3, 6 e 8. Sendo (1) 100 bp, (2) *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener, (3) *T. conorhini*, (4) *T. lewisi*, (5) *T. dionisii*, (6) *T. mega*, (7) *T. cruzi* cepa Y, (8) *T. vivax*, (9) *T. evansi*, (10) *T. brucei*, (11) *Leishmania braziliensis*, (12) *L. guyanensis*, (13) *L. major*, (14) *L. mexicana*, (15) *L. amazonensis*, (16) *L. infantum* e (17) controle negativo, com uma temperatura de hibridação de 59°C.

Após o desenvolvimento dos protocolos e sequenciamento das amostras dos *loci* presentes neste estudo, pôde-se perceber uma diferença no comprimento das sequências em comparação com o comprimento esperado. Apesar de um tamanho menor das sequências oriundas do sequenciamento, esta diferença se mostrou irrelevante para a análise dos dados.

Tabela 9. Comparação do comprimento dos fragmentos de DNA dos *loci* utilizados. Relação entre o tamanho esperado em pares de base, com os diferentes tamanhos de fragmentos observados durante as análises.

| <i>Loci</i> | Tamanho em pares de base | | | | | | | | |
|---|--------------------------|-----------|----------|---------------|-----------|---------------------------|---------------------------|-----------|---------------|
| | Leu tRNA synthetase (38) | DRG1 (27) | TPI (30) | U5 snRNP (34) | MSH8 (20) | Met tRNA synthetase (143) | Ser tRNA synthetase (172) | DRG1 (28) | U5 snRNP (35) |
| Fonte do produto | | | | | | | | | |
| Tamanho esperado do fragmento | 350 | 518 | 480 | 656 | 268 | 439 | 577 | 510 | 410 |
| Eletroforese do fragmento de PCR | 350 | 500 | 480 | 650 | 250 | 440 | 580 | 500 | 400 |
| Alinhamento utilizado para a filogenia (após <i>complete deletion</i>) | 264 | 356 | 370 | 376 | 158 | 314 | 547 | 376 | 270 |

4. 4. Análise Filogenética dos *loci* utilizados

4. 4. 1. Classe Kinetoplastea

4. 4. 1. 1. Árvore filogenética do gene SerRS (par 172)

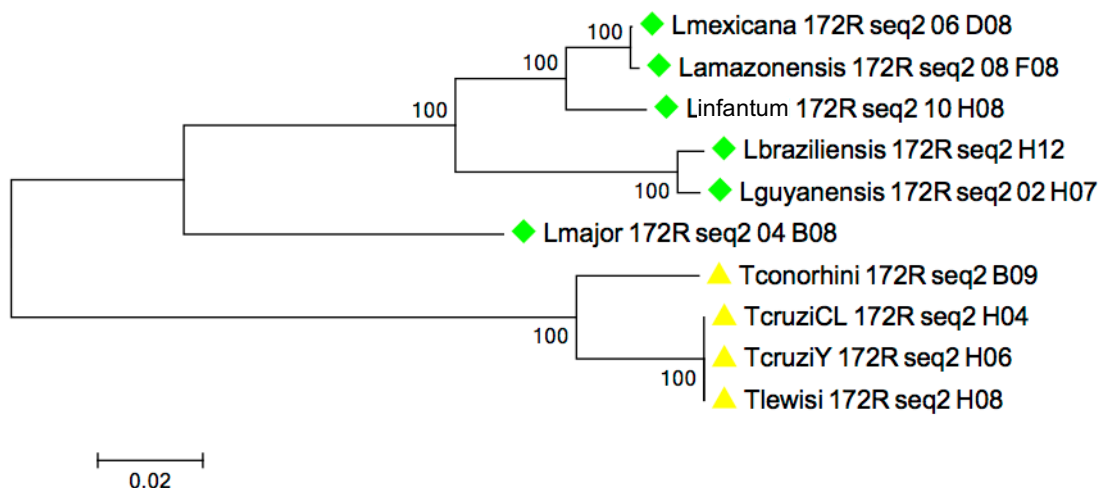


Figura 29. Árvore filogenética para SerRS. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 172 (*Seryl-tRNA synthetase* - SerRS) de espécies da classe Kinetoplastea, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “F” (*foward*) ou “R” (*reverse*), indicando quais sequências foram utilizadas para a construção da árvore, “seq 1 ou 2” significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 1. 2. Árvore filogenética do gene LeuRS (par 38)

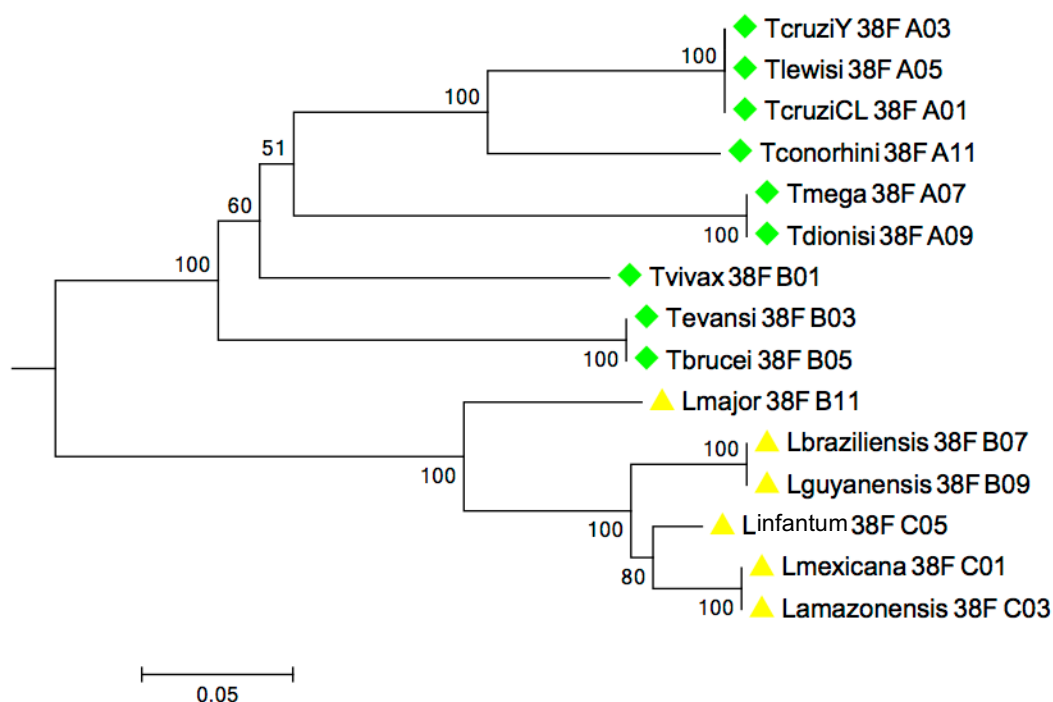


Figura 30. Árvore filogenética para LeuRS. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 38 (*Leucyl-tRNA synthetase- LeuRS*) de espécies da classe Kinetoplastea, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “F” (*forward*) ou “R” (*reverse*), indicando quais sequências foram utilizadas para a construção da árvore, “seq 1 ou 2” significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 1. 3. Árvore filogenética do gene TPI (par 30)

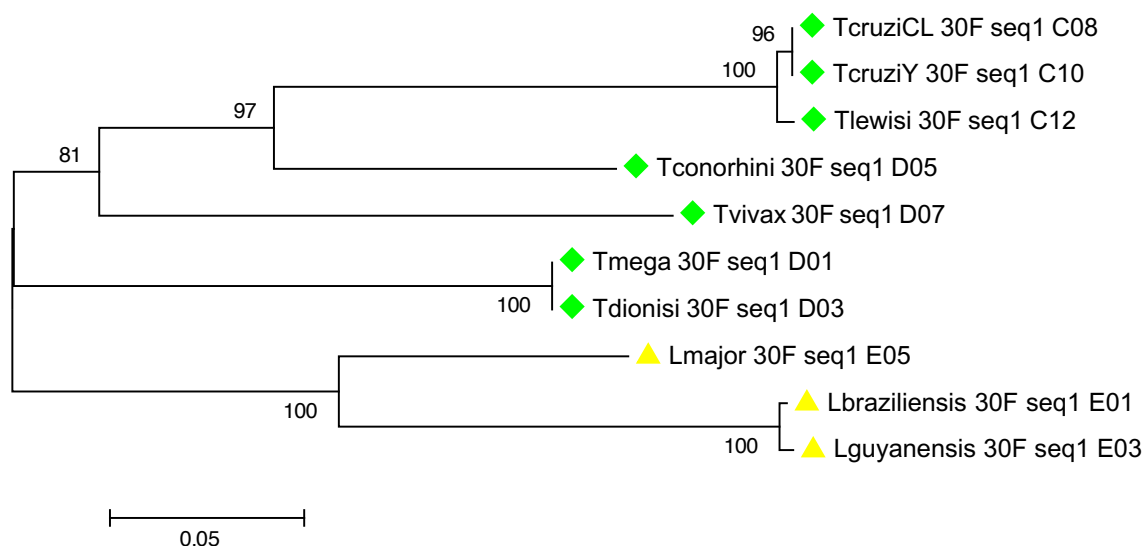


Figura 31. Árvore filogenética para TPI. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 30 (*Triosephosphate isomerase* - TPI) de espécies da classe Kinetoplastea, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “F” (*forward*) ou “R” (*reverse*), indicando quais sequências foram utilizadas para a construção da árvore, “seq 1 ou 2” significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 1. 4. Árvore filogenética do gene U5 snRNP (par 34)

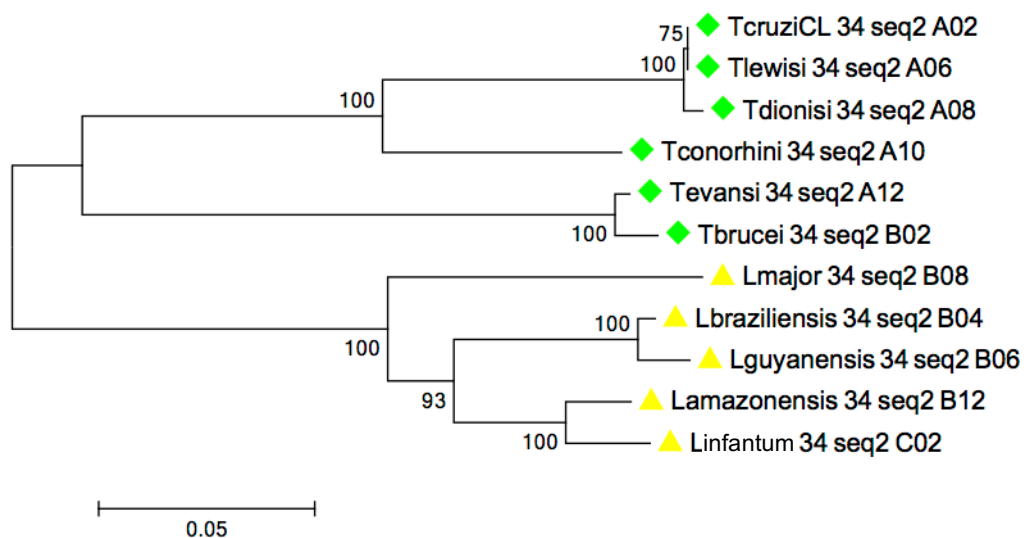


Figura 32. Árvore filogenética para U5 snRNP. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 34 (*U5 snRNP spliceosome subunit - U5 snRNP*) de espécies da classe Kinetoplastea, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “seq 1 ou 2”, que significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 1. 5. Árvore filogenética do gene MSH8 (par 20)

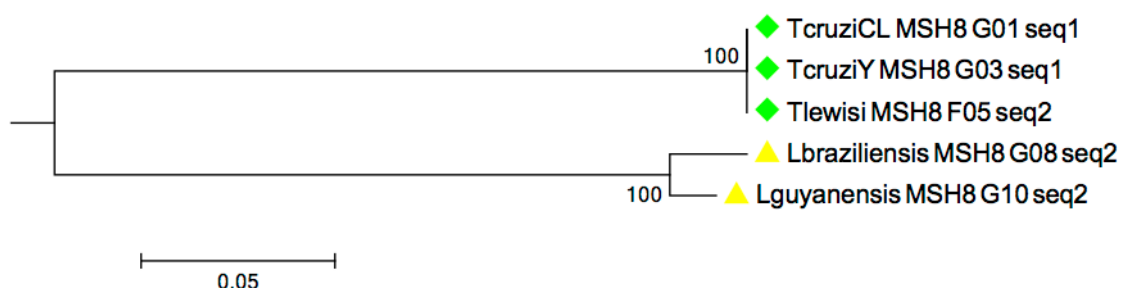


Figura 33. Árvore filogenética para MSH. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 20 (*Mismatch repair ATPase 8 - MSH8*) de espécies da classe Kinetoplastea, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “seq 1 ou 2”, que significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 1. 6. Árvore filogenética do gene MetRS (par 143)

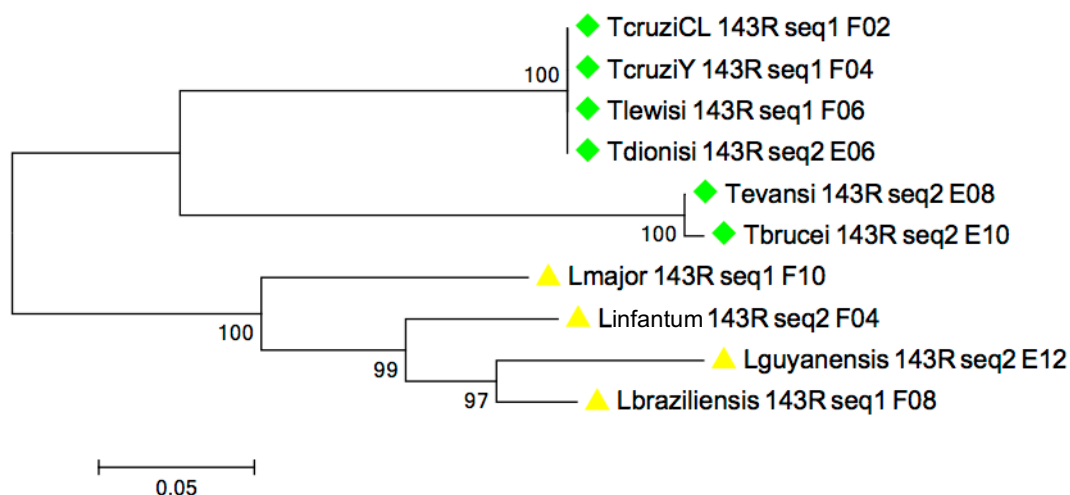


Figura 34. Árvore filogenética para MetRS. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 143 (*Methionyl-tRNA synthetase -*

MetRS) de espécies da classe Kinetoplastea, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “F” (*foward*) ou “R” (*reverse*), indicando quais sequências foram utilizadas para a construção da árvore, “seq 1 ou 2” significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 1. 7. Árvore filogenética do gene DRG1 (par 27)

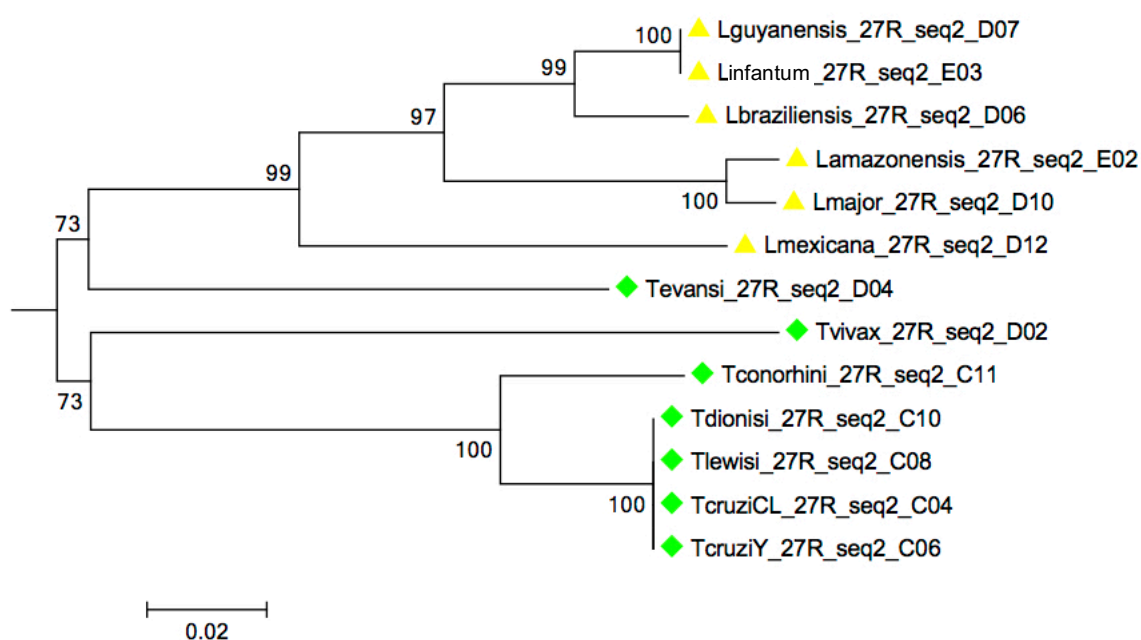


Figura 35. Árvore filogenética para DRG1. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 27 (*GTP-binding protein* - DRG1) de espécies da classe Kinetoplastea, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “F” (*foward*) ou “R” (*reverse*), indicando quais sequências foram utilizadas para a construção da árvore, “seq 1 ou 2” significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que

vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 2. Filo Apicomplexa

4. 4. 2. 1. Árvore filogenética do gene U5 snRNP (par 35)

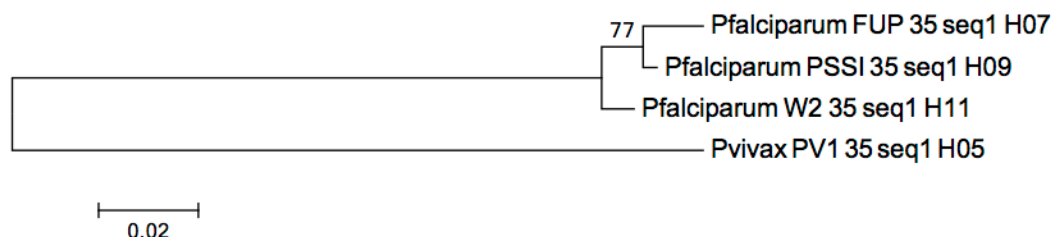


Figura 36. Árvore filogenética para U5 snRNP. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 35 (*U5 snRNP spliceosome subunit - U5 snRNP*) de espécies do filo Apicomplexa, correspondente às espécies *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “seq 1 ou 2”, que significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

4. 4. 2. 2. Árvore filogenética do gene DRG1 (par 28)

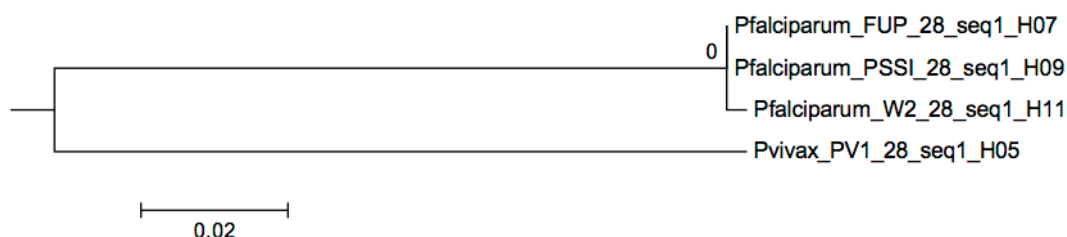


Figura 37. Árvore filogenética para DRG1. Reconstrução filogenética com as sequências obtidas para o par de iniciadores 28 (*GTP-binding protein - DRG1*) de espécies do filo Apicomplexa, correspondente às espécies *Plasmodium falciparum*

e *Plasmodium vivax* pelo método de *Neighbor-Joining*, utilizando como modelo distância-p e com a opção *complete deletion*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap*, baseados em 1000 réplicas. O código alfanumérico ao lado de cada espécie representa o número do par de iniciadores, seguido de “seq 1 ou 2”, que significa de qual sequenciamento a sequência foi obtida e o código que vai de A01 até H12 está relacionado à orientação em que a amostra estava localizada na placa de sequenciamento de 96 poços.

5. DISCUSSÃO

5. 1. Teste de sensibilidade para os iniciadores testados

Dos *loci* encontrados na literatura, é possível perceber que quando os trabalhos relatam a sensibilidade dos iniciadores, são iniciadores específicos para uma determinada espécie, e não degenerados para um grupo de espécies. A utilização de um par de iniciadores para o *locus* TPI, em *Giardia lamblia*, em um estudo de Molina e colaboradores em 2007, mostrou uma amplificação de até 1 pg/ μ L, enquanto os os iniciadores utilizados no presente trabalho para este *locus* apresentou amplificação até uma concentração de até 10 pg/ μ L. Outros estudos de genotipagem utilizando os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* utilizando PCR *singleplex* possuem uma sensibilidade de até 10 fg/ μ L, mas somente com a utilização de iniciadores específicos (Chiurillo *et al*, 2003; Aradaib & Mahid 2006; Winne *et al*, 2014).

5. 2. Padronização inicial dos ensaios dos PCRs *singleplex*

O *locus* TPI, por se tratar de um gene que está envolvido na via glicolítica, acaba sendo bastante utilizado em diversos estudos, inclusive para genotipagem. Joachim e Von Samson-Himmelstjerna em 2001, por exemplo, utilizaram este *locus* para a genotipagem de duas espécies de protozoários parasitas do gênero *Oesophagostomum* que acometem o intestino de porcos. Para isso eles também utilizaram iniciadores degenerados para este gênero, e utilizaram cDNA. Como descrito pelos autores, os resultados obtidos foram satisfatórios na genotipagem.

Para o *locus* U5 snRNP, não foi observada amplificação para este par de iniciadores em *T. mega* e *T. vivax*. Iniciadores para U5 snRNP já foram utilizados na caracterização molecular de *T. brucei* e *T. cruzi* (Ambrósio *et al*, 2007), neste estudo, os autores caracterizaram as subunidades U2, U4, U5 e U6, e quando compararam os resultados obtidos com *T. cruzi* frente aos encontrados para *T. brucei*, puderam perceber que a subunidade U5 é menos conservada em *T. cruzi*, bem como apresentam diferenças na estrutura secundária, mas que são compartilhadas entre os tripanossomatídeos. Nos resultados de sequenciamento obtidos no presente trabalho, não foi possível observar essa diferença com relação à conservação de *T. cruzi* frente as outras espécies testadas (Apêndice 9. 1). Para o *locus* DRG1, não houve amplificação de *T. mega* e *T. vivax*.

As amostras de cultura, no caso das amostras de *P. falciparum*, mostraram amplificação para todas as amostras testadas, enquanto a amostra de *P. vivax* não mostrou amplificação (iniciadores par 28) ou mostrou bandas inespecíficas. No caso de amostras clínicas, este padrão pode ser observado, uma vez que contaminantes provenientes do hospedeiro e inibidores podem gerar artefatos e inclusive impedir a amplificação correta das amostras (Miao & Cui, 2011).

Dos iniciadores testados em Kinetoplastea, alguns representam alvos para novos fármacos contra doenças transmitidas por essas espécies, como é o caso do *locus* MetRS, que é um alvo de inibidores seletivos para *T. brucei*, que por sua vez acaba super-expressando o gene para MetRS com o objetivo de resistir à ação dessas drogas. Os parasitas resistentes apresentam níveis mais baixos de parasitemia e mortalidade em camundongos do que a estirpe progenitora, indicando que as alterações genéticas afetam a aptidão dos parasitas. Os estudos indicam que a resistência aos inibidores de MetRS pode ser induzida, mas que ocorre de forma relativamente lenta e com um custo para a virulência dos parasitas (Ranade *et al*, 2013).

Assim como MetRS, LeuRS tem chamado a atenção por causa de estudos que validaram clinicamente este *locus* como um alvo anti-microbial (Rock *et al*, 2007; Zhu *et al*, 2009), mais atualmente, Ding e colaboradores (2010 e 2011), descreveram inibidores de LeuRS em *T. brucei*, representando um bom alvo para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (Zhang *et al*, 2013).

Os testes realizados em Apicomplexa envolviam testes contendo amostras isoladas de pacientes, todos os iniciadores foram desenhados com o objetivo de não amplificarem DNA humano, podendo servir também como uma ferramenta de diagnóstico. Apesar de não ter havido amplificação em PV2, as amostras PV1 e PV3 foram amplificadas.

5. 3. Padronização inicial dos ensaios dos PCRs *multiplex*

A melhor reação *multiplex* desenhada para estes *loci* foi a reação 5. Apesar da amplificação de algumas bandas inespecíficas, foi possível identificar de forma clara os marcadores utilizados e, além disso, são iniciadores degenerados desenhados para a amplificação de um grande número de espécies pertencentes a classe Kinetoplastea. As amostras que melhor amplificaram foram: *T. cruzi* (ambas as cepas), *T. lewisi*, *T. dionisii*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Uma possível solução para esta questão relacionada com a inespecificidade, poderia ser solucionado através da técnica de RCA (*Rolling Circle Amplification*) (Lizardi *et al.*, 1998), que através de uma sonda, permite a circularização dos fragmentos de PCR obtidos em uma reação isotérmica após a reação de PCR *multiplex*, seguida de degradação dos fragmentos linearizados e replicação círculo-rolante dos *amplicons* circularizados. Em um estudo de Fredriksson e colaboradores em 2007, os autores desenvolveram um ensaio *multiplex* utilizando 170 pares de iniciadores para 10 marcadores diferentes relacionados à câncer. Ainda assim, não houveram problemas com inespecificidade, onde conseguiram amplificar os marcadores de forma clara sem inespecificidade.

5. 4. Árvores filogenéticas para Kinetoplastea e Apicomplexa

5. 4. 1. Árvores das espécies de Kinetoplastea

Foram construídas no total 7 árvores filogenéticas para os 7 *loci* testados e suas respectivas amostras. Os valores de *bootstrap* são valores atribuídos a um teste estatístico de reamostragem em que refletem a robustez da análise filogenética gerada, ou seja, a reprodutibilidade da árvore construída e o quão ela se aproxima da realidade (Gillespie, 1986). Todos os valores de *bootstrap* das árvores construídas foram valores superiores a 90% em quase todos os casos. Em todos os casos foi possível separar corretamente os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*.

Na classe Kinetoplastea, a análise filogenética demonstra que a maioria dos genes ortólogos compartilhados por espécies estudadas gera árvores filogenéticas consistentes com a filogenia geral e aceita do grupo (Ocaña e Dávila, 2011). Em

geral, a filogenia dos genes de *Leishmania* spp. foi consistente com a filogenia de espécie, onde os ortólogos LeuRS, SerRS, U5 snRNP e TPI exibiram uma topologia similar em suas árvores.

A filogenia do gênero *Trypanosoma*, como proposto por Stevens e colaboradores (1999, 2000), foi reconstruído com sucesso em árvores filogenéticas dos genes ortólogos MetRS, TPI e DRG1. *Trypanosoma* e *Leishmania* são gêneros dinâmicos e polimórficos (Devera *et al*, 2003; Guhl & Ramírez, 2011), que têm genomas complexos, rearranjos cromossômicos (Panunzi & Angüero, 2014) e aneuploidia em mosaico (Minning *et al*, 2011; Mannaert *et al*, 2012).

A árvore filogenética para SerRS pôde ser construída baseada em todas as sequências dos amplicons obtidos. Agruparam juntas as duas cepas de *T. cruzi*, como era esperado e *T. lewisi*, que agrupa junto a eles em diversos momentos. *T. conorhini*, que pertence ao clado de *T. cruzi* (Hamilton *et al*, 2007), encontra-se agrupado ao clado formado por *T. cruzi* (cepas CL Brener e Y) e *T. lewisi*.

Na topologia das amostras de *Leishmania*, foi possível perceber na árvore para o marcador SerRS, que as *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* agruparam juntas, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, ambas espécies do novo mundo. As espécies do subgênero *Leishmania* do novo mundo também agruparam juntas, formando um clado composto por *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Em um clado separado, ficou disposta *L. major*, que é do subgênero *Leishmania* mas pertence ao velho mundo, esses dados corroboram com o que seria esperado numa análise dessas espécies, condizendo com o que é encontrado na filogenia de Kinetoplastea (Ocaña e Dávila, 2011).

Na topologia da árvore do marcador LeuRS, foi possível perceber a mesma correlação entre as espécies de *Leishmania*, onde mais uma vez as *Leishmania* dos subgêneros *Viannia* agruparam juntas, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, ambas espécies do novo mundo. As espécies do subgênero *Leishmania* do novo mundo também agruparam juntas, formando um clado composto por *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Em um clado separado, ficou disposta *L. major*, que é do subgênero *Leishmania* mas pertence ao velho mundo, esses dados corroboram com o que seria esperado numa análise dessas espécies, condizendo com o que é encontrado na filogenia de Kinetoplastea (Ocaña e Dávila, 2011).

São descritos três grandes clados em *Trypanosoma*, o clado de *T. cruzi*, o clado de *T. brucei* e o clado aquático (com espécies de peixes e anfíbios). No

entanto, a hipótese atual é a de que o gênero *Trypanosoma* seja de origem monofilética com um único ancestral comum para parasitas de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes (Hollar & Maslov, 1997; Wright *et al*, 1999; Haag *et al*, 1998; Stevens *et al*, 1999; Lukes *et al*, 2002). Dentre as espécies presentes nesse estudo, no clado de *T. cruzi*, estão presentes *T. cruzi*, *T. conorhini* e *T. dionisii*, no clado de *T. lewisi* (clado vizinho ao clado de *T. cruzi*) está presente somente o próprio *T. lewisi*, no clado de *T. brucei* estão presentes *T. brucei* e *T. evansi*, no clado aquático está presente somente *T. mega* (Hamilton *et al*, 2007).

Na árvore de *Trypanosoma* para o marcador LeuRS, se pode perceber um agrupamento semelhante aos grandes clados descritos na literatura (Hollar & Maslov, 1997; Wright *et al*, 1999; Haag *et al*, 1998; Stevens *et al*, 1999; Lukes *et al*, 2002). Embora *T. lewisi* pertença a um clado diferente de *T. cruzi* e *T. conorhini*, o fato de pertencer a um clado próximo acabou favorecendo o agrupamento observado neste trabalho, mas mesmo pertencendo ao clado, para este *locus* a sequência de *T. dionisii* acaba agrupando com o *Trypanosoma* do clado aquático *T. mega*.

A árvore do marcador TPI foi semelhante com a topologia das árvores de LeuRS e SerRS, não foi possível presumir a frequência de mutações que levaram a essa topologia, nem mesmo a sua ordem. A árvore para o *locus* TPI foi semelhante à topologia para a árvore de espécie tanto para as análises do gênero *Leishmania*, quanto para as análises do gênero *Trypanosoma*.

Observando o agrupamento do gênero *Trypanosoma* em U5 snRNP, pode-se perceber que a topologia das espécies se encontra um pouco diferente. As espécies *T. cruzi*, *T. lewisi*, *T. dionisii* e *T. conorhini* agrupam num só clado, sendo assim, com exceção de *T. lewisi*, houve o agrupamento do clado de *T. cruzi*. Como não houve amplificação para *T. mega* e *T. vivax*, os mesmos não estão inclusos nessa análise, bem como o da sequência de *T. cruzi* cepa Y que não possuía uma qualidade de acordo para ser introduzida à essa análise. A topologia das amostras do gênero *Leishmania*, exceto *L. mexicana*, que estava com uma qualidade muito ruim, foram condizentes com a literatura e com as outras amostras, onde *L. infantum* e *L. amazonensis* (subgênero *Leishmania* e do novo mundo) foram agrupadas, bem como *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (subgênero *Viannia*, e do novo mundo), e num clado mais distante encontrava-se *L. major*, subgênero *Viannia*, porém do velho mundo.

O par de iniciadores 20, para o *locus* MSH, não amplificam apenas um gene, mas sim são capazes de amplificar ao menos 4 diferentes genes pertencentes a família MSH, que são MSH2, MSH3 e MSH8. A árvore de MSH8 foi construída com base nas 5 sequências confirmadas do gene. As espécies que apresentaram sequências para este gene foram *T. cruzi* (cepas CL Brener e Y) e *T. lewisi*, o que é de condizente devido a semelhança destas espécies. Em *Leishmania* as duas espécies do subgênero *Viannia* contidas nesta análise, *L. braziliensis* e *L. Guyanensis* foram agrupadas em um clado. Através de buscas por similaridade utilizando o Blast com o produto do sequenciamento, onde foi possível identificar: MSH2 em *T. dionisii* e *T. mega* e MSH3 em *T. brucei* e *T. vivax*.

Na árvore de MetRS, as sequências de *L. mexicana* e de *L. amazonensis* não foram adicionadas por não terem ficado com qualidade. As sequências de *T. cruzi* (ambas as cepas), *T. lewisi* e *T. dionisii* agruparam separadas de *T. evansi* e *T. brucei* de acordo com a literatura, por pertencerem a clados diferentes (Hamilton *et al*, 2007), e as *Leishmania braziliensis* e *L. guyanensis* agruparam formando o clado do subgênero *Viannia*, aonde de forma mais externa estava presente *L. infantum*, e mais externa ainda *L. major*, a única espécie presente do velho mundo analisada.

O *locus* DRG1, apresentou árvores inconsistentes e desta forma não pode ser extrapolada para gerar árvore de espécie. Foi possível perceber a manutenção do clado formado por *T. cruzi*, *T. lewisi*, *T. conorhini* e *T. dionisii*, e o agrupamento mais externo de *T. vivax*. Porém, a topologia do gênero *Leishmania* apresentou grandes diferenças, onde *L. guyanensis* e *L. infantum* formam um clado com *L. braziliensis*, *Leishmania major* agrupou com *L. amazonensis*, *L. mexicana* se mostrou externa a esses dois clados menores formados, mas *T. evansi* aparece no clado de *Leishmania*, o que não seria esperado em uma árvore de espécie para estes grupos.

Nos resultados obtidos o parasita *T. lewisi* demonstrou muita proximidade com o parasita *T. cruzi*, e segundo estudos realizados por Johnson (1933) e Weinman (1970), *T. lewisi* foi registrado como sendo um parasita oportunista por compartilhar hospedeiros vertebrados em *T. cruzi* e *T. rangeli*, pertencente ao clado de *T. cruzi*, embora seja um parasita cosmopolita e não patogênico encontrado originalmente em *Rattus* spp. *T. rangeli* também pode infectar humanos, porém sendo o homem um hospedeiro intermediário ou reservatório (Ramirez *et al*, 1998; de Sousa MA, 2014). Devido a proximidade de *T. lewisi* de *T. cruzi* e *T. rangeli*, é importante estudos mais aprofundados sobre este parasita e os clados de *T. cruzi* e *T. lewisi*.

Introgressão entre espécies diferentes (Ravel *et al*, 2006; Goodhead *et al*, 2013) e reprodução clonal ou sexual (Tait, 1983; Bastein *et al*, 1992; Rougeron *et al*, 2010, 2011; Ramírez *et al*, 2012; Peacock *et al*, 2014) estão frequentemente presentes nesses dois gêneros. As árvores refletem a história evolutiva dos genes, e nem sempre pode ser útil para ser explorado e extrapolados como marcadores para árvore de espécies. Isso foi observado principalmente no gênero *Trypanosoma* e também para gênero *Leishmania* pelo uso do *locus* DRG1.

Os resultados deste estudo sugerem um polimorfismo muito maior no gene LeuRS quando comparado ao gene DRG1. Observando os alinhamentos (Apêndice 9.1), LeuRS apresentou 61% de sítios polimórficos, enquanto o gene DRG1 apresentou 33% de sítios polimórficos. Embora o gene LeuRS tenha se mostrado mais polimórfico, o mesmo se mostrou mais eficiente na diferenciação entre os dois grupos de Kinetoplastea (*Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp.). No entanto, apesar do *locus* para DRG1 ser mais conservado, não seria o *locus* mais adequado para extrapolar uma árvore de espécie.

5. 4. 2. Árvores das espécies de Apicomplexa

As árvores feitas para estas espécies *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*, foram reconstruídas a partir do sequenciamento das amostras amplificadas pelos iniciadores utilizados, bem como as árvores de Kinetoplastea. Os marcadores U5 snRNP e DRG1 foram capazes de separar as espécies de *Plasmodium*, porém, o marcador U5 snRNP conseguiu uma resolução a nível interespecífico, onde houve o agrupamento das cepas de *P. falciparum* FUP e PSS1, e mais externamente a cepa W2. Este perfil não foi observado para o marcador DRG1, que separou somente a nível de espécie *P. falciparum* e *P. vivax*.

6. CONCLUSÕES

- A reação de PCR *singleplex* padronizada foi eficiente para todas as amostras testadas para todos os *loci*. Nossos ensaios de *singleplex* foram sensíveis o suficiente para detectar com as diluições seriadas dos DNAs de *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium* até 10 pg/μL de DNA.
- A reação de PCR *multiplex* com o melhor resultado foi a reação número 5, em que foram utilizados em conjunto os iniciadores dos genes *GTP-binding protein* - DRG1, *U5 snRNP spliceosome subunit* - U5 snRNP e *Leucyl-tRNA synthetase*- LeuRS, que quando integrados permitiram a genotipagem *multi-locus* de tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, pertencentes a classe Kinetoplastea.
- Embora se tenha observado divergências na topologia da árvore para DRG1 do que seria esperado na árvore de espécies, o mesmo pode ser considerado um bom marcador, e inclusive pôde ser usado na separação de duas espécies do gênero *Plasmodium* com o par 28.
- A metodologia aplicada para a genotipagem destas espécies de parasitas foi bem-sucedida, e pode-se destacar após observação dos resultados que o melhor marcador, para o *singleplex* e para o *multiplex*, em termos de eficiência, sensibilidade e fidelidade com os dados encontrados na literatura, foi *Leucyl-tRNA synthetase*-LeuRS, que apresentou resultados satisfatórios em todas as análises.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrósio DL, Silva MTA, Cicarelli RMB. Cloning and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102:14801-14902.
- Aradaib IE and Majid AA. A simple and rapid method for detection of *Trypanosoma evansi* in the dromedary camel using a nested polymerase chain reaction. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2006;5:2.
- Arndt H, Dietrich D, Auer B, Cleven E, Grafenham T, Weitere M and Mylnikov AP. Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In: Leadbeater, B. S. C. & Green, J. C. (ed.), *The Flagellates*. Taylor & Francis, London. 2000:240–268.
- Baniecki ML, Faust AL, Schaffner SF, Park DJ, Galinsky K, Daniels RF, Hamilton E, Ferreira MU, Karunaweera ND, Serre D, Zimmerman PA, Sá JM, Wellems TE, Musset L, Legrand E, Melnikov A, Neafsey DE, Volkman SK, Wirth DF, Sabeti PC. Development of a single nucleotide polymorphism barcode to genotype *Plasmodium vivax* infections. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2015: 9(3):e0003539.
- Bastien P, Blaineau C and Pages M. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitology Today*. 1992;8:174-177.
- Baum, D. Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups. *Nature Education*. 2008;1(1):190.
- Baxevanis AD and Ouellette BFF. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Second Edition*, Inc. John Wiley & Sons. capítulo 14 Phylogenetic analysis. Brinkman FSL and Leipe DD. 2012.
- Bell JS, Harvey TI, Sims AM and McCulloch R. Characterization of components of the mismatch repair machinery in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*. 2004;51:159–173.

- Benaglio P, San-Jose PF, Avila-Fernandez A, Ascari G, Harper S, Manes G, Ayuso C, Hamel C, Berson EL and Rivolta C. Mutational screening of splicing factor genes in cases with autosomal dominant retinitis pigmentosa *Molecular Vision*. 2014;20:843–851.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily – conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 1991;349:117 - 127.
- Cavalier-Smith T. American Society for Microbiology Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *Microbiological Reviews*. 1993;57:953-994.
- Cavalier-Smith T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters* 2010;6:342–345.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN and Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy *locus* via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*. 1988;16:11141–11156.
- Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy *locus* via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*. 1988;16:11141–11156.
- Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, Añez N, and Ramírez JL. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* Infection by Duplex PCR Assay Based on Telomeric Sequences. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003;10(5):775–779.
- Cottontail VM, Kalko EKV, Cottontail I, Wellinghausen N, Tschapka M, Perkins SL, Miguel Pinto CM. High Local Diversity of *Trypanosoma* in a Common Bat Species, and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the *T. cruzi* Clade. *PLoS One*. 2014;9(9):e108603.
- Crisan D. Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1994;24:355–363.

- Cuadrat RRC, Cruz SMS, Tschoeke DA, Silva E, Tosta F, Jucá H, Jardim R, Campos MLM, Mattoso M and Dávila AMR. An Orthology-Based Analysis of Pathogenic Protozoa Impacting Global Health: An Improved Comparative Genomics Approach with Prokaryotes and Model Eukaryote Orthologs. *OMICS. A Journal of Integrative Biology* Volume. 2014;18.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Debrabant A, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, Calabuig E, Gimenez MJ, Ayala EV, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcán L, Machaca ESM, Viana KYA, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba CA, Gürtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL, Yadon ZE, Osuna A and Schijman AG. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(5):e0003765.
- de Sousa MA. On opportunist infections by *Trypanosoma lewisi* in humans and its differential diagnosis from *T. cruzi* and *T. rangeli*. *Parasitology Research*. 2014;113(12):4471-4475.
- Devera R, Fernandes O and Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98:1-12.
- Gelanew T, Hailu A, Schönián G, Lewis MD, Miles MA, Yeod M. *Multilocus* sequence and microsatellite identification of intra-specific hybrids and ancestor-like donors among natural Ethiopian isolates of *Leishmania donovani*. *International Journal of Parasitology*. 2014;44(10):751–757.
- Ghoneim NH, Abdel-Moein KA and Saeed H. Fish as a possible reservoir for zoonotic *Giardia duodenalis* assemblages. *Parasitology Research*. 2012;110(6):2193-2196.

- Gillespie JH. Variability of Evolutionary Rates of DNA. *Genetics*. 1986;113(4):1077–1091.
- Goodhead I, Capewell P, Bailey JW, Beament T, Chance M, Kay S, Forrester S, MacLeod A, Taylor M, Noyes H and Hall N. Whole-genome sequencing of *Trypanosoma brucei* reveals introgression between subspecies that is associated with virulence. *mBio*. 2013;4:e00197-13.
- Guhl F and Ramírez JD. *Trypanosoma cruzi* diversity: towards the need of genetic subdivision?. *Acta Tropica*. 2011;119:1-4.
- Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009;9: 81–86.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 2007;44(1):15-25.
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36:1989–1995.
- Hoare CA. *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph*. Blackwell, Oxford, UK, 1972;749p.
- Hu W, Wu S, Yu X, Abullahi AY, Song M, Tan L, Wang Z, Jiang B and Li G. A Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Three Zoonotic Parasites *Ancylostoma ceylanicum*, *A. caninum*, and *Giardia lamblia* Assemblage A. *BioMed Research International*. 2015;2015:406168.
- Joachim A and von Samson-Himmelstjerna G. Sequence variations in the introns of the triosephosphate isomerase genes of *Oesophagostomum dentatum* and *O. Quadrispinulatum*. *Parasitology Research*. 2001;87(9):764-7.

- Johnson PD. A case of infection by *Trypanosoma lewisi* in a child. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;26:467–468
- Julius L, Guilbride DL, Votypka J, Zíková A, Benne R and Englund PT. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Minireview American Society for Microbiology*. 2002;1:495–502.
- Keon J, Curtis R, Cabrera H and Hargreaves J. A genomics approach to crop pest and disease research. *Pest Management Science*. 2003;59:143–148.
- Kooning EV, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Krylov DM, Makarova KS, et al., A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes. *Genome biology*. 2004;5-R7.
- Koonin EV. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review Genetics*. 2005;39:310–338.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV and Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*. 2002;317:41-72.
- Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF and Pons JL. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(12):5710-5714.
- Litt M and Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics*. 1989;44(3): 397–401.
- Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EEC, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*. 2005;21:363–369.

- Lopes WR e Vasconcelos SD. Representação e distorções conceituais do conteúdo “filogenia” em livros didáticos de biologia do ensino médio.. Revista Ensaio. 2012;14:149-165.
- Mannaert A, Downing T, Imamura H and Dujardin JC. Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. Trends in Parasitology. 2012;28:370-376.
- Makiuchi T and Nozaki T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. Biochimie 100. 2014;3e17.
- Meissner M, Ferguson JP, Frischknecht F. Invasion factors of apicomplexan parasites: essential or redundant? Current Opinion in Microbiology. 2013;16(4):438-444.
- Miao J and Cui L. Rapid isolation of single malaria parasite-infected red blood cells by cell sorting. Nature Protocols. 2011;6(2):140–146.
- Minning TA, Weatherly DB, Flibotte S and Tarleton RL. Widespread, focal copy number variations (CNV) and whole chromosome aneuploidies in *Trypanosoma cruzi* strains revealed by array comparative genomic hybridization. BMC Genomics. 2011;12:139.
- Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J. PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2007;49(1-2):6-11.
- Moreira D, López-García P and Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004;54:1861–1875.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymology. 1987;155:335-50.

- Nobrega MA and Pennacchio LA. Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. *Journal of Physiology*. 2004 554, 31–39.
- O'Dwyer K, Spivak AT, Ingraham K, Min S, Holmes DJ, Jakielaszek C, Rittenhouse S, Kwan AL, Livi GP, Sathe G, Thomas E, Van Horn S, Miller LA, Twynholm M, Tomayko J, Dalessandro M, Caltabiano M, Scangarella Oman NE, Brown JR. Bacterial resistance to leucyl-tRNA synthetase inhibitor GSK2251052 develops during treatment of complicated urinary tract infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2015;59(1):289-98.
- Ocaña KA and Dávila AM. Phylogenomics-based reconstruction of protozoan species tree. *Evolutionary Bioinformatics* . 2011;Online 7:107-121.
- Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G J. *Multilocus* microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *Clinical Microbiology*. 2006;44(2):495-503.
- Orosz F and Olah J. Mitochondrial Disease Review Triosephosphate isomerase deficiency: New insights into an enigmatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* Volume 1792. 2009;12:1168–1174.
- Owen R. Palaeontology, p. 91-176. In T. S. Traill (ed.), *Encyclopedia Britannica*, 8th ed., vol. 17. Black, Edinburgh. 1858.
- Panunzi LG and Agüero FA. Genome-Wide Analysis of Genetic Diversity in *Trypanosoma cruzi* Intergenic Regions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8:e2839.
- Patel AA, Steitz JA. Splicing double: Insights from the second spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;4:960–970.
- Patterson DJ, Larsen J and Corliss JO. The ecology of heterotrophic flagellates and ciliates living in marine sediments. *Progress in Protistology*. 1989;3:185-277.

- Peacock L, Ferris V, Bailey . and Gibson W. Mating compatibility in the parasitic protist *Trypanosoma brucei*. *Parasites and Vectors*. 2014;7:78.
- Qi M, Cai J, Wang R, Li J, Jian F, Huang J, Zhou H, Zhang L. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from yaks in the central western region of China. *BMC Microbiology*. 2015;15:21.
- Ranade RM, Gillespie JR, Shibata S, Verlinde CLMJ, Fan, Hol WGJ, Buckner FS. Induced Resistance to Methionyl-tRNA Synthetase Inhibitors in *Trypanosoma brucei* Is Due to Overexpression of the Target Development of a Single Nucleotide Polymorphism Barcode to Genotype *Plasmodium vivax* Infections.
- Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP and Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology* 2006;36:1383-1388.
- Reid AJ. Large, rapidly evolving gene families are at the forefront of host – parasite interactions in Apicomplexa. *Parasitology*. 2015;142:S57 – S70.
- Rithidech KN, Dunn JJ, Gordon CR. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *BioTechniques*. 1997;23:36–45.
- Rock FL, Mao W, Yaremchuk A, Tukalo M, Crepin T, Zhou H, Zhang YK, Hernandez V, Akama T, Baker SJ, Plattner JJ, Shapiro L, Martinis SA, Benkovic SJ, Cusack S and Alley MR. An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. *Science*. 2007;316:1759 – 1761.
- Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(12):5636–43.

- Rougeron V, De Meeus T, Kako Ouraga S, Hide M and Banuls AL. “Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)” in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. PLoS Pathogens. 2010;6:e1001004.
- Rougeron V, Bañuls AL, Carme B, Simon S, Couppié P, Nacher M, Hide M and De Meeûs T. Reproductive strategies and population structure in *Leishmania*: substantial amount of sex in *Leishmania Viannia guyanensis*. Molecular Ecology 2011;20:3116-3127.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.
- Saribasak H, Rajagopal D, Maul RW, Gearhart PJ. Hijacked DNA repair proteins and unchained DNA polymerases. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 2009;12;364(1517):605-611.
- Shapiro TA, Klein VA, Englund PT. Isolation of kinetoplast DNA. Methods in molecular biology. 1999(94);61-67
- Scheffzek K, Ahmadian MR. GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005;62:3014-3038.
- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitology. 2011;138:405–25
- Shiba K, Suzuki N, Shigesada K, Namba Y, Schimmel P and Inoda T. Human cytoplasmic isoleucyl-tRNA synthetase: selective divergence of the anticodon-binding domain and acquisition of a new structural unit. National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91:7435-7439.

- Shigemori Y, Mikawa T, Shibata T and Oishi M. Multiplex PCR: use of heat-stable *Thermus thermophilus* RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic Acids Research*. 2005;33:e126.
- Shuber AP, Skoletsky J, Stern R, Handelin BL. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human Molecular Genetic*. 1993;2:153–158.
- Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunology Review*. 2011;240:72–91.
- Silva MTA, Ambrósio DL, Trevelin CC, Watanabe TF, Laure HJ, Greene LJ, Rosa JC, Valentini SR, Cicarelli RMB. New insights into trypanosomatid U5 small nuclear ribonucleoproteins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;(2):130-138.
- Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Current Opinion in Microbiology*. 1999;2(3):312-316.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA and Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. 1999;118:107-116.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ and Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*. 2001;48:1-56.
- Tait A. Sexual processes in the kinetoplastida. *Parasitology*. 1983;86:29-57.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013;30: 2725-2729.

- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 1997;25:4876-4882.
- Tschoeke DA, Nunes GL, Jardim R, Lima J, Dumaresq ASR, Gomes MR, Pereira LM, Loureiro DR, Stoco PH, Guedes HLM, Miranda AB, Ruiz J, Pitaluga A, Silva-Jr FP, Probst CM, Dickens NJ, Mottram JC, Grisard EC and Dávila AMR. The Comparative Genomics and Phylogenomics of *Leishmania amazonensis* Parasite. *Evolutionary Bioinformatics*. 2014;10:131–153.
- Tschoeke, DA. *Genômica comparativa de Protozoários* [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, pós-graduação em Biologia Computacional e Sistemas; 2013.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates in: *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. (Eds), Academic Press, London/New York/San Francisco. 1976:1-34.
- Vincent C, Tarbouriech N and Hartlein M. Genomic organization, cDNA sequence, bacterial expression, and purification of human seryl-tRNA synthase. *European Journal of Biochemistry*. 1997;250:77-84.
- Weinman D. Trypanosomiasis in macaques and in man in Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1970;1:11–18.
- Will CL and Luhrmann R. *Spliceosome Structure and Function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Department of Cellular Biochemistry, Germany 2011.
- Will CL and Luhrmann R. Spliceosome structure and function. In *The RNA world*, 3rd ed. (ed. R.F. Gesteland et al.), pp. 369 – 400. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2006.

- Winne KD, Büscher P, Luquetti AO, Tavares SBN, Oliveira RA, Solari A, Zulantay I, Apt W, Diosque P, Rumi MM, Gironès N, Fresno M, Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Monge-Maillo B, Garcia L, and Deborggraeve S. The *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA OligoC-Test and *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA OligoC-Test for Diagnosis of Chagas Disease: A Multi-cohort Comparative Evaluation Study. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2014 8(1):e2633.
- Zhang F, Du J, Wang Q, Hu Q, Zhang J, Ding D, Zhao Y, Yang F, Wang E and Zhou H. Discovery of N-(4-sulfamoylphenyl)thioureas as *Trypanosoma brucei* leucyl-tRNA synthetase inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2013;11,5310-5324.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis, Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. 1999;118: 107–116.
- Zhao Y, Meng Q, Bai L and Zhou H. In silico discovery of aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014 Jan 20;15(1):1358-73.
- Zheng G, Alsarakibi M, Liu Y, Hu W, Luo Q, Tan L, Li G. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from dogs in Guangdong, China based on *multi-locus* sequence. *Korean Journal of Parasitology*. 2014;52(3):299-304.
- Zhu B, Yao P, Tan M, Eriani G and Wang E. tRNA-independent pretransfer editing by class I leucyl-tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:3418 – 3424.
- Zimmermann KD, Schogl B, Plaimauer B, Manhalter JW. Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *BioTechniques* 1996;21:480–484.

8. ANEXO

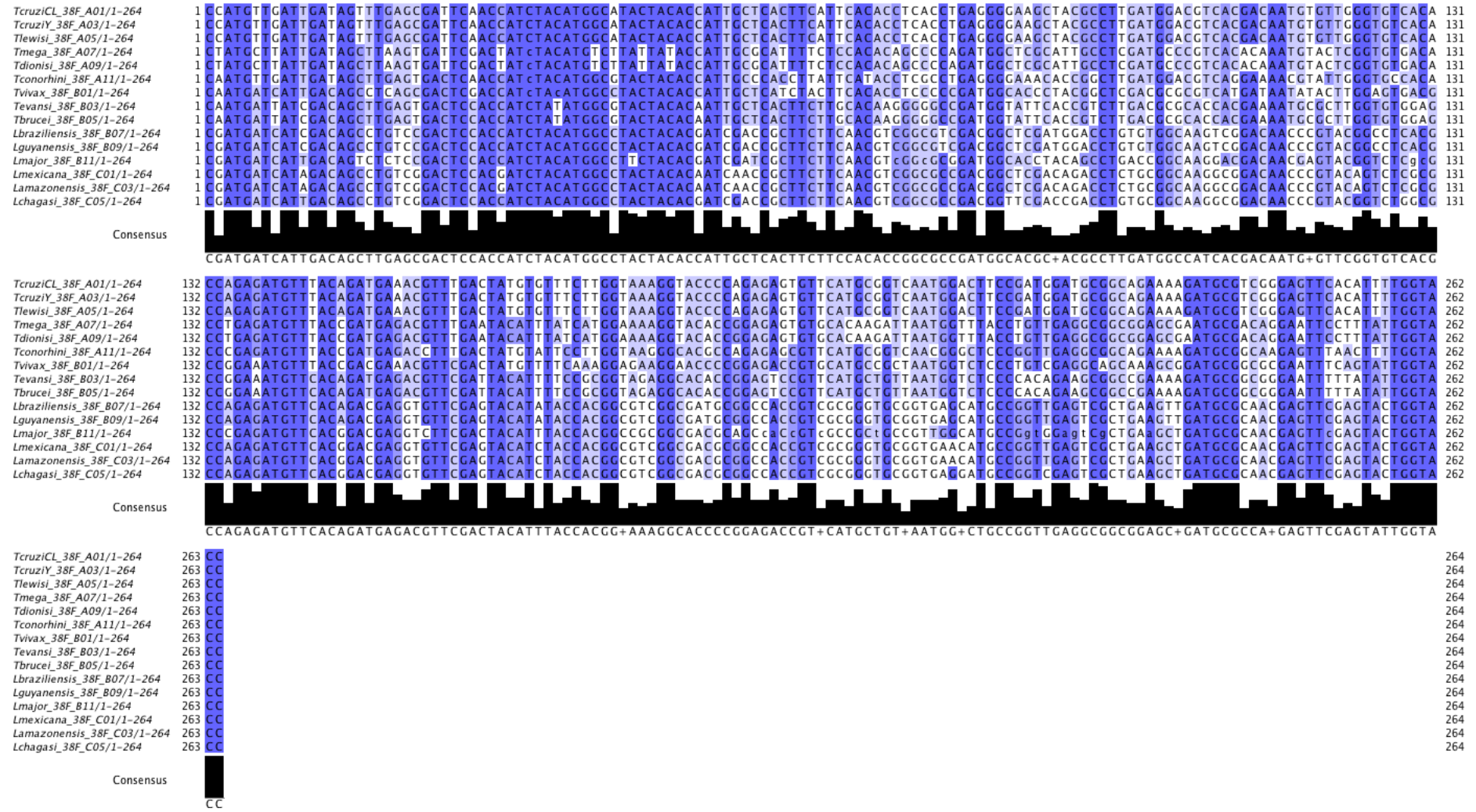
8. 1. Relação dos 39 pares de iniciadores desenhados incluídos os utilizados neste estudo

| Par nº | Nome do primer F | Sequência degenerada 5'- 3' | Nome do primer R | Sequência degenerada 5'- 3' | Tamanho |
|--------|-------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|---------|
| 01 | ORTHOMCL1871_F | YYTIACHHTITTTGTDGGHGG | ORTHOMCL1871_R | GCCARTCMTGKGADASAAAIA | 550 |
| 02 | ORTHOMCL1872_F | GCWCGHTAYTTTTAYAYVTHGG | ORTHOMCL1872_R | GGDATHTCWCCMAKIARYAAY | 200 |
| 03 | ORTHOMCL1875_F | GCHACDGADGGHSHWATTGTRGC | ORTHOMCL1875_R | MBRDATCATTAAADATVCCY | 470 |
| 04 | ORTHOMCL1878_F | GAYGCIATHGTGTTTGTIATGGGTAT | ORTHOMCL1878_R | CYTGHAIIAYHADAAARTGDGGATTGT | 300 |
| 05 | ORTHOMCL1892_F | TTYTTYRTVTTTCARDTKKTTTGT | ORTHOMCL1892_R | GTDAGDGTBCCIGTYTTRTCRAA | 300 |
| 06 | ORTHOMCL1893_F | ARCAYGCWKICIGAYGARAW | ORTHOMCL1893_R1 | IRGRYMRTKSSAHRKYWKWW | 400 |
| 07 | ORTHOMCL1893_F | ARCAYGCWKICIGAYGARAW | ORTHOMCL1893_R2 | AWMAGCCRTGGMAYTGYCCD | 400 |
| 08 | ORTHOMCL1899_F | TWYWSBRTIWSVYRYACRACR | ORTHOMCL1899_R | YICCHTKIABRTYMAYITCAA | 240 |
| 09 | ORTHOMCL1914_F | TITGACIGGDCCDAATATGG | ORTHOMCL1914_R | GAIGTVCCCHKICCIARYTCRTCBA | 260 |
| 10 | ORTHOMCL2343_F | AARRTRMARMKIRTVAAGA | ORTHOMCL2343_R | CACARAABGCKGMCCARTC | 340 |
| 11 | ORTHOMCL2344_F | ATGAACCTSAACTYGGCWGYGC | ORTHOMCL2344_R | CTTGTCTTGRCGTGYGG | 460 |
| 12 | ORTHOMCL2351_F | TGGGAHTGGAARDSWGAGRSMTA | ORTHOMCL2351_R | TCRWARSCBKHRCHGTRCCRTC | 260 |
| 13 | ORTHOMCL2355_F | CACGGHTTTGAYGGYAGYGGMGG | ORTHOMCL2355_R | CCRTCRAAKSMVYAAARCC | 150 |
| 14 | ORTHOMCL2356_F | GGWGMDSKRMHGTKTGGGA | ORTHOMCL2356_R | AGCCCTTGRTHGWGRAACATCA | 250 |
| 15 | ORTHOMCL 2360_F | TAYCAYCCVMDVWSHAAGCCVTT | ORTHOMCL 2360_R | GTRAAVYKKGICCDATYTCMAYCA | 100 |
| 16 | ORTHOMCL 2364_F | GAYYWYACIACVTCIAAYTTIAT | ORTHOMCL 2364_R | ARHCCRAARTCIADMAC | 100 |
| 17 | ORTHOMCL 2374_F | GBKCDAAAYRTHATGTG | ORTHOMCL 2374_R | ATYTCHTYIGAIGAYAT | 100 |
| 18 | ORTHOMCL 2376_F | WCRGSWGAYGAHRHBGG | ORTHOMCL 2376_R | CCRTCRSMBGYDCCRRWVARRAT | 400 |
| 19 | ORTHOMCL 2378_F | GARGGWGCHAAGGAYGGDAARGG | ORTHOMCL 2378_R | ACMAMYTGMACSACRTCCTC | 700 |
| 20 | ORTHOMCL 1914_F2 | TIYDACIGGDCCBAAYATGG | ORTHOMCL 1914_R | GAIGTVCCCHKICCIARYTCRTCBA | 220 |
| 21 | ORTHOMCL 2356_F2 | RTWGARGADRTYARTGGWG | ORTHOMCL 2356_R2 | TCIASISWBARRTCCCA | 350 |
| 22 | ORTHOMCL 2380_F | CAYCCVACIMRITGYIRHGARTT | ORTHOMCL 2380_R | GTRAACTRTGIAYDACBCCDCC | 500 |
| 23 | ORTHOMCL 2351_F2 | TGGGAI TGGGAARDSIGARRSITA | ORTHOMCL 2351_R2 | TCRWARSCBKHRCHGTRCCRTC | 300 |
| 24 | ORTHOMCL 2351_F3 | TKMTVVVTGGGAI TGGAA | ORTHOMCL 2351_R3 | TCDATVMIKYKHSCYGYTYGYAC | 500 |
| 25 | ORTHOMCL 2351_F2 | TGGGAI TGGGAARDSIGARRSITA | ORTHOMCL 2351_R3 | TCDATVMIKYKHSCYGYTYGYAC | 500 |
| 26 | ORTHOMCL 2351_F3 | TKMTVVVTGGGAI TGGAA | ORTHOMCL 2351_R2 | TCRWARSCBKHRCHGTRCCRTC | 300 |
| 27 | ORTHOMCL 2378F_K | CGSACGCARAAGAACAA | ORTHOMCL 2378R_K | ATDCCRCCVCGRTCCTT | 500 |
| 28 | ORTHOMCL 2378F_A | TCCAAAACRGGAGATGCRAGAAT | ORTHOMCL 2378R_A | TGTCATCTACWGTGCTTCACA | 500 |
| 29 | ORTHOMCL 1914F_A | CAAACAGCYATTTCKGTAAT | ORTHOMCL 1914R_A | AATWGCYGTCCRTCAAA | 200 |
| 30 | ORTHOMCL 0035F_KA | AACTGGAARTGYAAYGG | ORTHOMCL 0035R_K | CCAACVGGYTCGTAGGC | 500 |
| 31 | ORTHOMCL 0035F_KA | AACTGGAARTGYAAYGG | ORTHOMCL 0035R_A | ATYTGTTAGCWTKTTTTCTCC | 600 |
| 32 | ORTHOMCL 1921F_K | AGCAAYACVCAYCGCCA | ORTHOMCL 1921R_K | TCCTCICDCGKATRAACAT | 500 |
| 33 | ORTHOMCL 1921F_A | CAGATGTGATTAAC TCMGGWTTTGATA | ORTHOMCL 1921R_A | TCYCCYCTCATAAARAARTCATA | 600 |
| 34 | ORTHOMCL 1924F_K1 | GARGTRGARTACATGGA | ORTHOMCL 1924R_K1 | CGCACVTCRTCMGCYTC | 600 |
| 35 | ORTHOMCL 1924F_A1 | CTGTRTATGAAGTRGACCC | ORTHOMCL 1924R_A1 | TACTGAAATACAAKASGAAAAT | 400 |
| 36 | ORTHOMCL 1924F_K2 | CYTRAAGAAYTGGTGCT | ORTHOMCL 1924R_K2 | TTYTGBGGGTGYTGCTG | 500 |
| 37 | ORTHOMCL 1924F_A2 | GGTGGACYAATCARAGACA | ORTHOMCL 1924R_A2 | TCMGCACAKGARCTATTTCATTTT | 500 |
| 38 | ORTHOMCL 2223F_K | AAYTGGCTIGCIGACTGGC | ORTHOMCL 2223R_K | CGBAGRTCACRGGRTACCA | 500 |
| 39 | ORTHOMCL 2223F_A | ATTTTTGGYTRGAYGAYTGTC | ORTHOMCL 2223R_A | CTGGTCCCATCACTWGTATA | 800 |

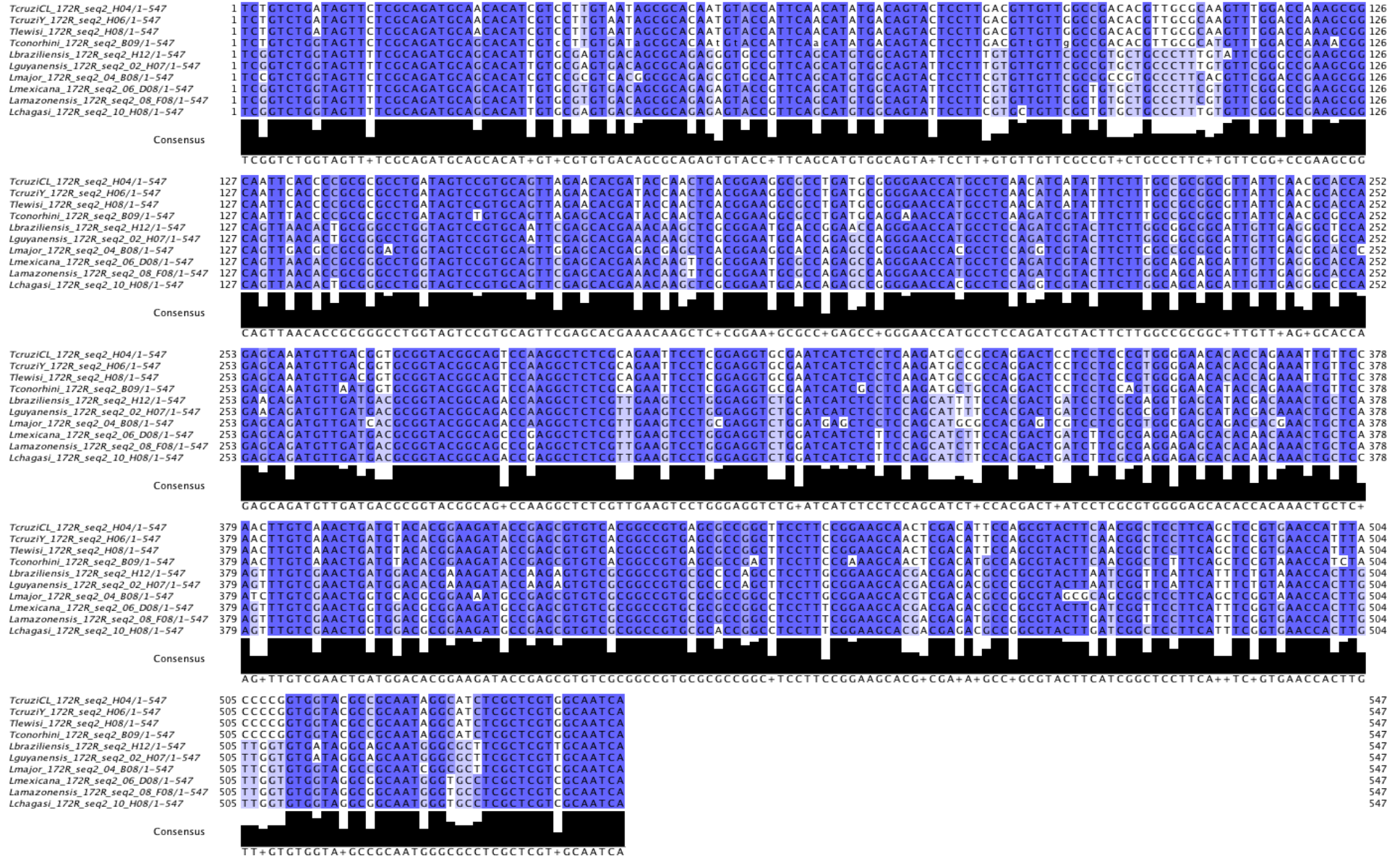
9. APÊNDICE

9. 1. Alinhamentos múltiplos dos amplicons gerados

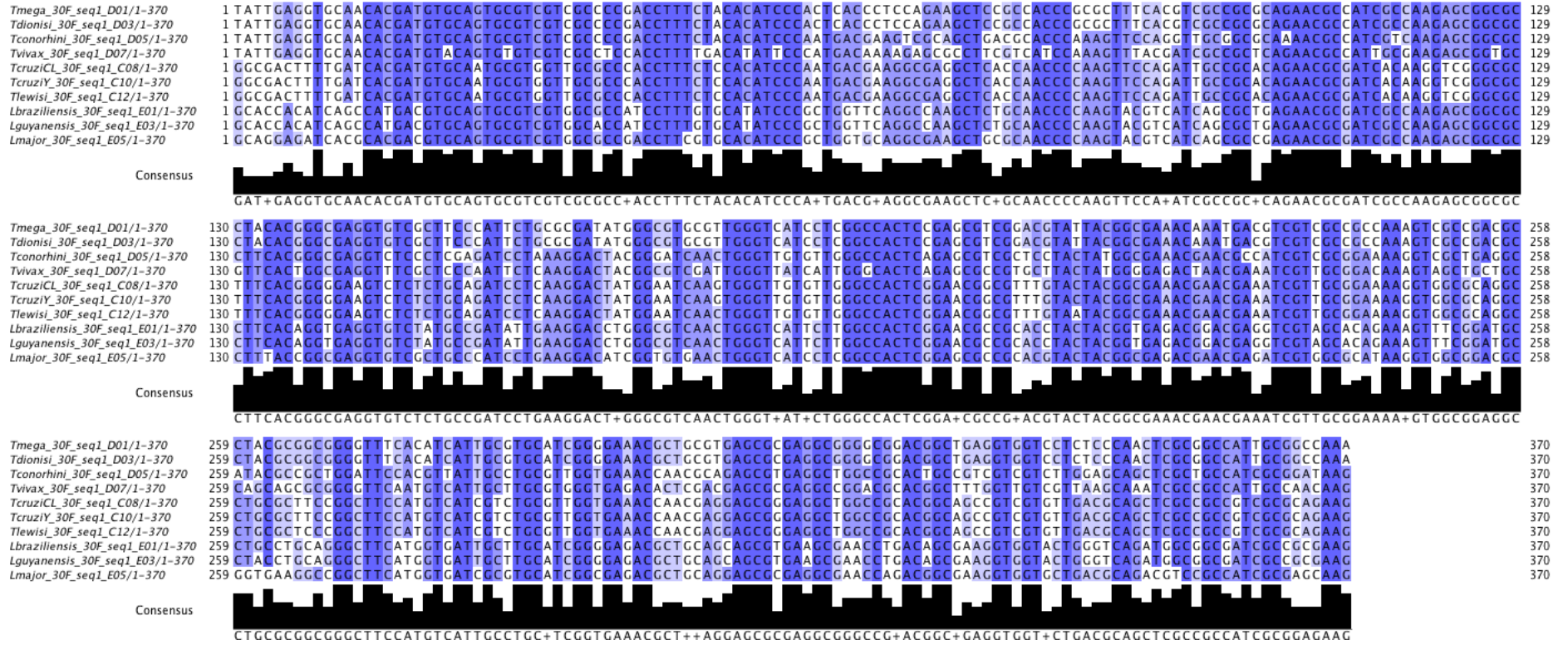
Alinhamento múltiplo para o gene *Leucyl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 38).



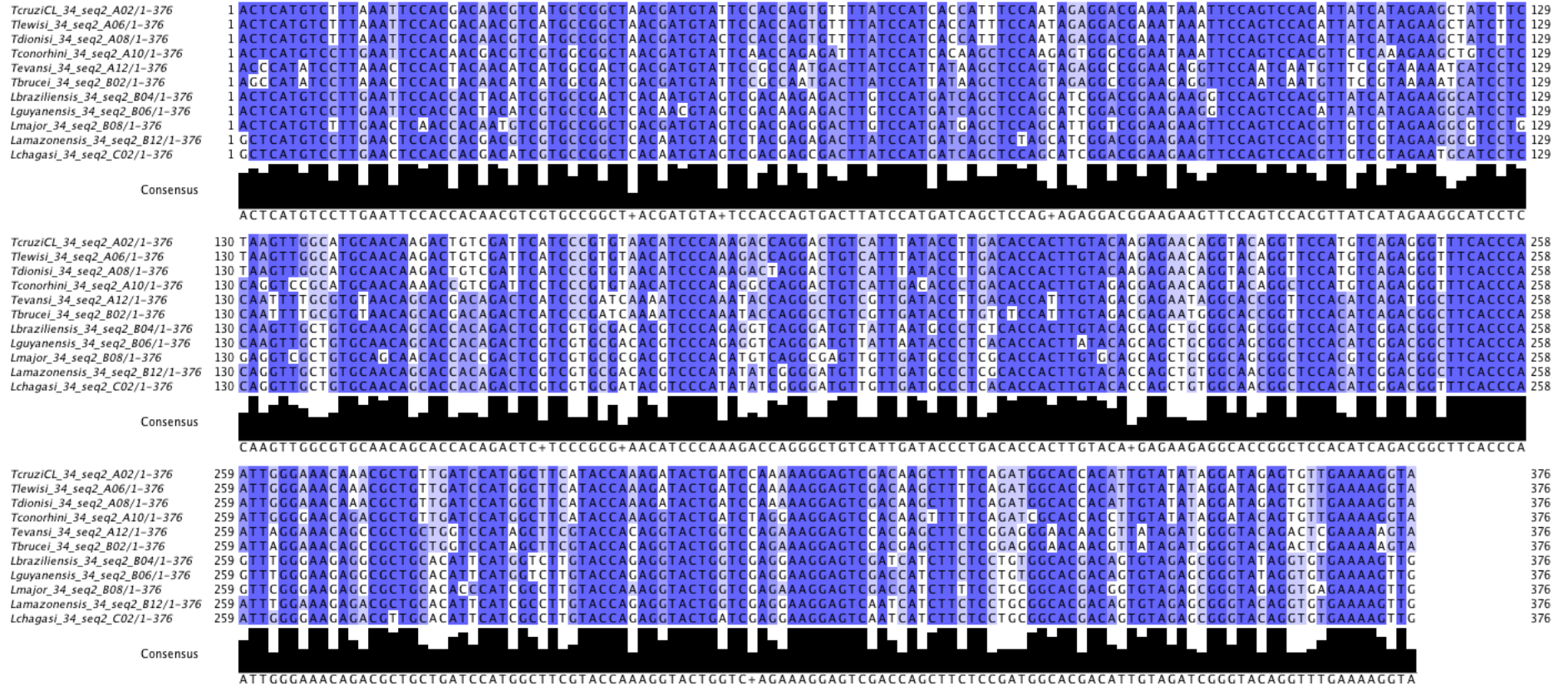
Alinhamento múltiplo para o gene *Seryl-tRNA synthetase* (par de iniciadores 172).



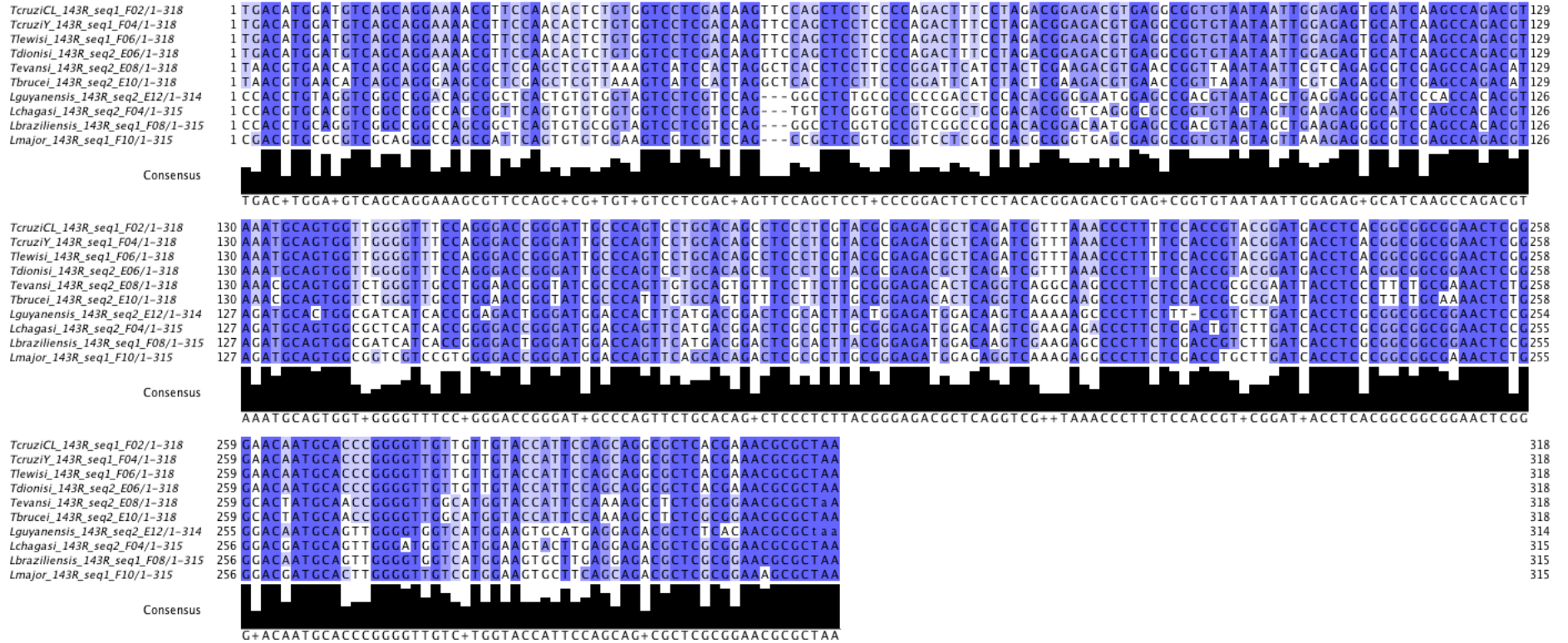
Alinhamento múltiplo para o gene *Triosephosphate isomerase* (par de iniciadores 30).



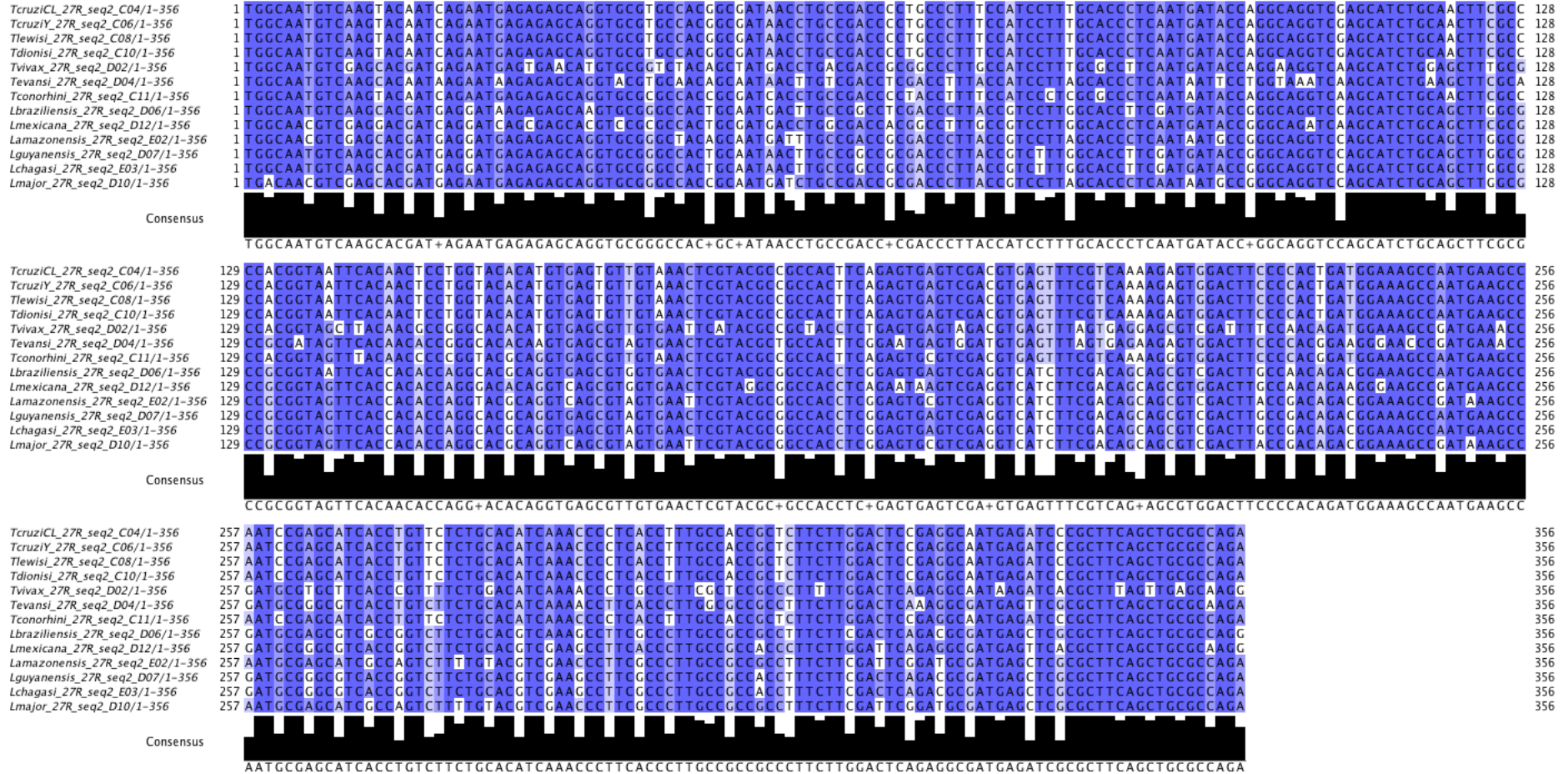
Alinhamento múltiplo para o gene *U5 snRNP spliceosome subunit* (iniciadores par 34) em Kinetoplastea.



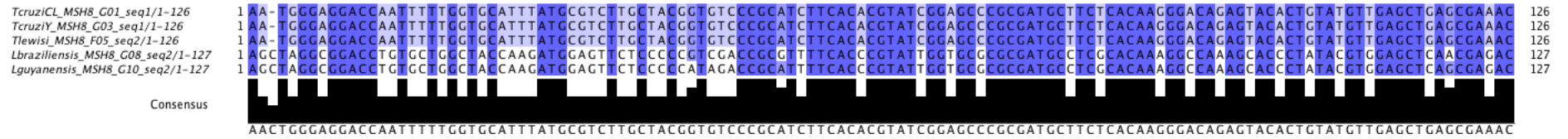
Alinhamento múltiplo para o gene *Methionyl-tRNA synthetase* (iniciadores par 143).



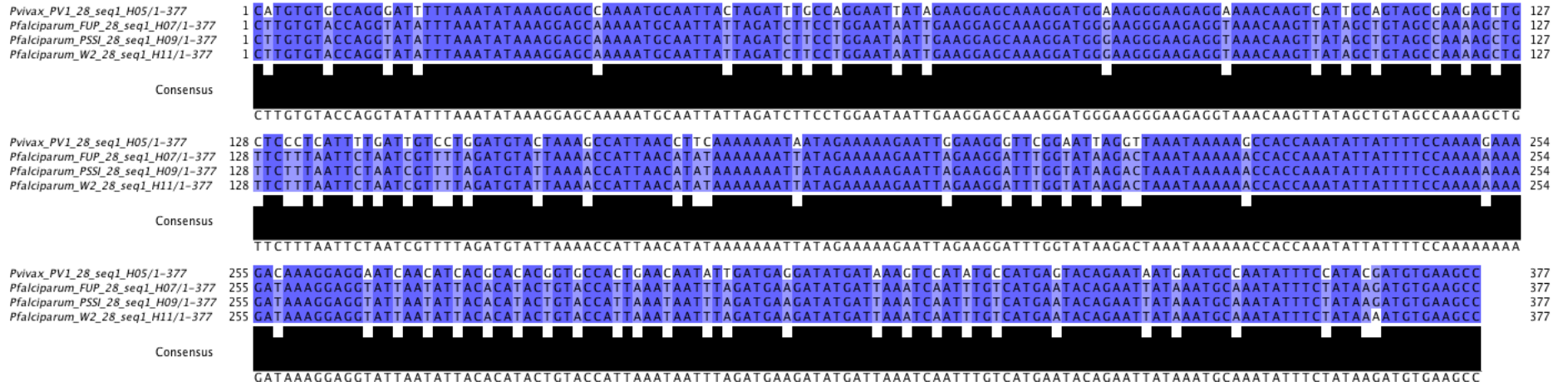
Alinhamento múltiplo para o gene *GTP-binding protein* (iniciador par 27) em Kinetoplastea.



Alinhamento múltiplo para o gene *Mismatch repair ATPase 8* (iniciadores par 20).



Alinhamento múltiplo para o gene *GTP-binding protein* (iniciador par 28) em Apicomplexa.



Alinhamento múltiplo para o gene *U5 snRNP spliceosome subunit* (iniciadores par 35) em Apicomplexa.

