

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em
Minas Gerais, Brasil

por

Jeronimo Marteleto Nunes Rugani

Belo Horizonte
Fevereiro/2015

DISSERTAÇÃO

MBCM-CPqRR

J.M.N.RUGANI

2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em
Minas Gerais, Brasil

por

Jeronimo Marteleto Nunes Rugani

Dissertação apresentada com vistas
à obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Célia Maria Ferreira
Gontijo.

Co-orientação: Dra. Patrícia Flávia
Quaresma.

Belo Horizonte
Fevereiro/2015

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R928e Rugani, Jeronimo Marteleto Nunes.
2015

Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* em Minas Gerais, Brasil / Jeronimo Marteleto Nunes Rugani. – Belo Horizonte, 2015.

XVII, 90 f. il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 83 - 107

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose cutânea/genética 2. *Leishmania braziliensis*/genética 3. Reação em Cadeia da Polimerase/uitilização. Título. II. Gontijo, Célia Maria Ferreira (Orientação). III. Quaresma, Patrícia Flávia

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em
Minas Gerais, Brasil

por

Jeronimo Marteleto Nunes Rugani

Foi avaliado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Célia Maria Ferreira Gontijo (Presidente)

Prof. Dr. Gabriel Eduardo Melin Ferreira

Prof. Dr. Silvane Maria Fonseca Murta

Suplente: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2015

*“When we hit our lowest point, we are open to the greatest changes” –
Avatar Aang.*

Dedico este trabalho aos amigos que foram de grande ajuda para o desenvolvimento do mesmo. Também dedico à minha mãe e a meu irmão por serem os pilares que me sustentam sempre.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de recomeçar todos os dias em teus caminhos, por toda a fé e força necessários durante toda essa caminhada, e por toda a luz que me proporcionou para que eu conseguisse atingir meus objetivos, profissionais e pessoais.

À minha família, obrigado por serem os pilares que me sustentam sempre. À minha mãe, Marilene Nunes, obrigado pelo carinho, amor e apoio incondicionais. Sua fé e seu carinho me fizeram conquistar mais esta vitória. Oro todos os dias por sua vida e, com toda a certeza, escolho estar ao seu lado nessa e em todas as vidas, para sempre. Ao meu irmão, Carlos Rugani, obrigado pela amizade e compreensão por todos esses anos, você é o ideal que almejo ser no futuro. Obrigado ao meu pai, Jeronimo, que mesmo ausente em corpo, continua presente em espírito me guiando através dos caminhos e me amparando quando caio. Sei que está feliz!

Obrigado João Batista, pelo companheirismo por toda essa caminhada, ajudando a fazê-la mais leve por dividir e aguentar o peso comigo. Você deixou o mundo físico ao longo dos trâmites desta dissertação, e todos os experimentos aqui contidos tem um pouco do seu amor e carinho. A dor de sua ausência ainda fere minha alma, mas espero um dia poder transformá-la em saudades, afinal o show da vida tem que continuar. Saiba que o que tens de mais precioso, seu amor, está guardado no meu coração, agora e para sempre. Que Deus o tenha no reino da glória e em breve, nos encontraremos. Te amo.

Agradeço imensamente à minha avó Carmem Rugani e à minha tia Jurema Rugani, por me acolherem em sua casa quando mais precisei e por me apoiar nesta jornada. Muito obrigado por me aturarem em seu lar, pelo carinho, amizade e risadas ao longo desse caminho. Agora posso afirmar mais que nunca, casa de vovó é tudo de bom!

À minha orientadora, Dra. Célia Gontijo, por ter me dado a oportunidade de começar a trilhar os caminhos científicos, por todo apoio, amizade e ensinamentos ao longo desse tempo, instigando o pensamento crítico. Obrigado por me compreender e me aceitar do jeito que sou, ajudando a superar minhas limitações. Os momentos descontraídos e os ensinamentos ficarão comigo para sempre!

À Dra. Patrícia Quaresma, por toda a paciência que teve ao me ensinar praticamente tudo que sei até hoje, inclusive lições que vão além do âmbito profissional, palavras que levarei para toda a vida! Obrigado pela sua paciência, perseverança e amizade, principalmente nos momentos de raiva, angústia e tensão. Tem sido uma dádiva conviver contigo por todo este tempo, e que Deus me permita continuar caminhando ao seu lado.

Agradeço aos amigos do Grupo de Estudos em Leishmanioses, Aline Tanure, Gabriel Tonelli, Ana Cristina Vianna (tina), Thaís Dias, Gustavo Mayr (estorvo), Gustavo Paz, Paloma Shimabukuro e José Dilermando (Leco), por fazerem nosso ambiente de trabalho mais descontraído e leve, além de auxiliarem ao longo do desenvolvimento deste e de outros trabalhos. Especialmente ao Felipe Dutra, obrigado pelos ensinamentos, grande parte do que aprendi foi graças a você.

Especialmente à Lara Saraiva, Gabriela Lemos, Tamara Vieira e Agnes Sampaio, por toda a amizade, risadas e apoio ao longo deste período. Juntos, aprendemos a superar algumas de nossas limitações e a nos re-erguer. A amizade de vocês vale ouro!

Agradeço aos amigos do Grupo de Pesquisas de Taxonomia de Flebotomíneos: Edelberto Santos-Dias, Erika Michalsky, Fabiana Lara, Fabiana Paixão (preta), Josiane Valadão, Mayara Madeira, Lisiane Gomes, Ailton Costa, Jeiza, Lívia, Nathália, Thaís Paiva, Andreza, Rosana Lana, pelo carinho e amizade ao longo de todos esses anos. Sem vocês, o cotidiano do laboratório não seria o mesmo. Independente de sermos de grupos diferentes, seremos amigos por muito tempo. Rupa mi grelo!

Especialmente às amigas Vera Ribeiro e Elisa Vianna, por estarem comigo na melhor viagem que fiz na minha vida! Obrigado pelos momentos inesquecíveis e pela grande amizade que descobri em vocês!

À todos os amigos, cujos nomes não caberiam aqui, e onde acima também se encaixam. Obrigado por fazerem essa caminhada mais leve e tranquila. Especialmente ao Weverton Coelho, Lílian Durães, Guilherme Maciel e Jéssica Lugon, obrigado por estarem comigo desde muito tempo atrás, nesses laços que jamais se desfazerão. Amo vocês!

Ao Dr. Rolando Oddone, pelo auxílio no entendimento da parte filogenética.

Ao Juliano Leal, do Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do depto de Bioquímica da UFMG, que ao longo dos trâmites desta dissertação nos deixou e foi fazer morada ao lado do Pai Celestial. Obrigado pela ajuda no sequenciamento, ensinamentos acerca das análises e amizade. Você se tornou um amigo muito querido, independente de estar no plano físico ou espiritual. E será lembrado para sempre.

Ao Dr. Rodrigo Baptista e Dr. Tiago Mendes, grandes profissionais da UFMG, muito obrigado pela ajuda nas partes de filogenética e estatística, respectivamente. O auxílio de vocês foi fundamental para atingirmos os objetivos propostos.

Ao Dr. Gabriel Melin, à Dra. Silvane Murta e à Dra. Taís Nóbrega, pelos grandes ensinamentos que me proporcionaram ao fazerem parte da banca avaliadora desta dissertação. Obrigado por aceitarem de bom grado a avaliação desta. Nossa discussão foi muito enriquecedora e agregadora.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento de todos os aspectos deste presente trabalho.

Agradeço às instituições que financiaram os experimentos aqui contidos: FAPEMIG (processo N°: CBB - APQ-00289-10), CNPq (processo N°: 479408/2010-6), FIOCRUZ (processo N°: 403562/2008-2), Comunidade Européia (Control Strategies for visceral leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis in South America: applications of molecular epidemiology).

SUMÁRIO

Lista de Figuras	XIII
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 As leishmanioses	18
1.1.2 <i>Leishmaniose Tegumentar Americana</i>	20
1.2 Agentes etiológicos	22
1.2.1 <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	23
1.3 Epidemiologia Molecular e Diversidade Genética de Parasitos do Gênero Leishmania	25
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 Desenho Experimental	33
4.2 Área de estudo	34
4.3 Amostras	35
4.4 Procedimentos Éticos	37
4.5 Procedimentos Moleculares	38
4.5.1 <i>Extração de DNA de promastigotas de Leishmania em meio de cultura</i>	38
4.5.2 <i>PCR do g6pd</i>	39
4.5.3 <i>PCR-RFLP do hsp70</i>	39
4.5.4 <i>PCR-RFLP do ITS1</i>	40
4.5.5 <i>PCR-RFLP do Cpb</i>	
4.5.6 <i>PCR do 6pgd</i>	42
4.5.7 <i>Sequenciamento dos alvos moleculares</i>	42

4.6 Procedimentos Estatísticos	43
4.6.1 <i>Preparação dos dados para os métodos de agrupamento</i>	43
4.6.2 <i>Agrupamento por partição e hierárquico</i>	43
4.6.3 <i>Cálculo de razão de possibilidades (Odds ratio)</i>	44
4.7 Procedimentos Filogenéticos	44
4.7.1 Recuperação das Sequências	45
4.7.2 Análises filogenéticas	45
5 Resultados	47
5.1 Identificação específica das amostras estudadas	47
5.2 PCR RFLP da proteína de choque térmico de 70 kilodaltons (hsp70)	48
5.3 PCR RFLP da Cisteína Protease B (cpb)	50
5.4 PCR RFLP do Espaçador Transcrito Interno 1 (ITS1)	53
5.5 PCR dirigida ao gene da 6-fosfoglicose desidrogenase (6pgd)	54
5.6 Polimorfismo genético das amostras estudadas baseado no perfil de restrição	55
5.7 Associação de Variáveis Genéticas, Clínicas e Geográficas	56
5.8 Análises filogenéticas	59
6 Discussão	62
6.1 Identificação específica de <i>Leishmania braziliensis</i>	63
6.2 Características genéticas dos isolados	65
6.3 Variabilidade Genética, Origem Geográfica e Manifestações Clínicas ...	73
6.4 Análise Filogenética dos Isolados de <i>L. braziliensis</i> de Minas Gerais ...	79
7 Conclusões	82
8 REFERÊNCIAS	83

Lista de Figuras

Figura 1: Desenho experimental para as abordagens utilizadas no estudo da variabilidade genética das diferentes amostras deste trabalho	33
Figura 2: Delimitação do estado de Minas Gerais em macrorregiões	35
Figura 3: Distribuição das amostras de <i>Leishmania braziliensis</i> por município e macrorregiões no estado de Minas Gerais	36
Figura 4: Resultado da PCR dirigida ao fragmento do gene <i>g6pd</i>	47
Figura 5: Resultado representativo do perfil de digestão utilizando a enzima <i>HaeIII</i> dos fragmento do gene <i>hsp70</i> amplificados a partir de amostras isoladas em cultura	48
Figura 6: Alinhamento representativo das sequências do <i>hsp70</i> dos grupos amostrais no software MEGA 6.06	49
Figura 7: Resultado representativo do perfil da digestão utilizando a enzima <i>TaqA1</i> da PCR-RFLP do gene <i>Cpb</i> amplificado a partir de DNA extraído das promastigotas	50
Figura 8: Alinhamento representativo das sequências do <i>Cpb</i> dos grupos amostrais no software MEGA 6.06	51
Figura 9: Resultado representativo do perfil de digestão utilizando a enzima <i>HaeIII</i> dos fragmento da região intergênica ITS1 amplificados a partir de amostras isoladas em cultura	53
Figura 10: Resultado representativo da PCR-6pgd a partir de amostras isoladas em cultura	54
Figura 11: Alinhamento representativo das sequências do <i>g6pd</i> dos grupos amostrais no software MEGA 6.06	55
Figura 12: Nível de similaridade de amostras de <i>L. braziliensis</i> isoladas em Minas Gerais baseado na integração de perfil RFLP dos alvos <i>hsp70</i> , ITS1 e <i>cpb</i> e sequenciamento parcial dos alvos <i>hsp70</i> , <i>cpb</i> , ITS1 e <i>g6pd</i>	58
Figura 13: Árvore concatenada utilizando sequências dos marcadores <i>6pgd</i> , <i>hsp70</i> , <i>g6pd</i> e <i>Cpb</i> , em conjunto de sequências de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> referência e sequências de <i>L. panamensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. amazonensis</i> recuperadas do banco de dados GenBank	60
Figura 14: Árvore concatenada utilizando sequências dos marcadores <i>6pgd</i> , <i>hsp70</i> , <i>g6pd</i> e <i>Cpb</i> , em conjunto de sequências de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> referência	61

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características das amostras de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> estudadas	36
Tabela 2: Cepas de referência da OMS utilizadas no estudo	37
Tabela 3: Posições dos SNP's encontrados na sequência do <i>hsp70</i>	50
Tabela 4: Trechos do sequenciamento do gene <i>Cpb</i> das amostras estudadas mostrando SNPs encontrados em diferentes posições do fragmento amplificado	52
Tabela 5: Posições dos SNP's encontrados na sequência do <i>6pgd</i>	54
Tabela 6: Índice de polimorfismo genético dos marcadores <i>hsp70</i> , <i>ITS1</i> e <i>Cpb</i> das amostras estudadas	56
Tabela 7: Razão de possibilidades (<i>Odds ratio</i>) da distribuição geográfica entre as amostras do grupo azul e vermelho identificados pelo método de agrupamento por partição e hierárquico	59

Lista de Abreviaturas e Símbolos

μL: microlitro

3'UTR: região não-codificadora 3'

6pgd: 6-fosfo-glico-desidrogenase

aLRT: Likelihood Ratio Test

Cpb: cisteína proteinase B

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

g6pd: glicose-6-fosfato-desidrogenase

hsp70: proteína de choque térmico de 70 kilodáltons

ITS1: Espaçador transcrito interno 1

kDNA: DNA do cinetoplasto

LSSP: primer específico de baixa estringência

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

mg: miligramas

MLEE: Eletroforese de isoenzimas multilocus

MLMT: Tipagem por Microsatélites Multilocus

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro

ng: nanogramas

nm: nanomoles

°C: graus Celcius

OR: Odds Ratio (razão de possibilidades)

pb: pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PM: peso molecular

RAPD: Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico

RFLP: Polimorfismo de Tamanho no Fragmento de Restrição

rpm: rotações por minuto

SNP: polimorfismo de base única

RESUMO

No Brasil, de todas as espécies do gênero *Leishmania*, a mais frequentemente encontrada parasitando o homem é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Esta espécie pode causar um amplo espectro de manifestações, desde lesões únicas ao envolvimento mucoso, sendo esta última a complicação mais séria. Análises que visam acessar a variabilidade genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* são essenciais para o estudo de possíveis correlações entre manifestações clínicas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) com parasitos geneticamente variantes e sua origem geográfica. O objetivo do estudo é analisar a variabilidade genética de isolados de *L. braziliensis* provenientes de diversas regiões de Minas Gerais. Foi realizado o diagnóstico clínico e molecular de indivíduos portadores de manifestações típicas e atípicas de várias regiões endêmicas do estado e os isolados separados em dois grupos amostrais: o grupo 1 contendo amostras de variadas macrorregiões do estado; e grupo 2 composto por amostras isoladas na terra indígena Xakriabá, em São João das Missões. A identificação específica de todas as amostras como *L. braziliensis* foi confirmada utilizando a técnica de PCR-g6pd. A análise da variabilidade genética foi realizada para os marcadores genéticos *hsp70*, *Cpb*, ITS1, *g6pd* e *6pgd*. Na PCR-RFLP do *hsp70* foram observados dois perfis de restrição: todas as amostras do grupo 1 e as cepas MG15 e MG16 do grupo 2 tiveram perfil de restrição indistinguível ao da cepa *L. braziliensis* referência, enquanto a maioria das amostras do grupo 2 exibiram perfil de restrição variante. O fragmento obtido pela PCR do *hsp70* foi sequenciado e foram observados polimorfismos inclusive no sítio de restrição da enzima *HaeIII*. Na PCR-RFLP do *Cpb*, as amostras do grupo 1 e as cepas MG15 e MG16 do grupo 2 tiveram perfil de restrição indistinguível ao da cepa referência, enquanto a maioria das amostras do grupo 2 apresentaram perfil de restrição correspondente à demais espécies do subgênero *Viannia*. O sequenciamento do fragmento revelou polimorfismos inclusive no sítio de restrição da enzima *TaqI*. Na PCR-RFLP do ITS1 foi observado que as amostras do grupo 1 e as cepas MG15 e MG16 exibiram perfil de restrição semelhante a *L. guyanensis*, enquanto as amostras do grupo 2 perfil de *L. braziliensis*. As cepas MG19 e MG27 (grupo 2) exibiram perfis de restrição diferentes das cepas referência utilizadas. O sequenciamento do fragmento da PCR-6pgd exibiu polimorfismos que diferenciam entre as espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* nas amostras estudadas. Os perfis de restrição e as sequências foram utilizadas em análises estatísticas de classificação por similaridade por partição e hierárquico. A análise de partição corroborou a divisão das amostras em dois grupos, sugerindo uma maior variabilidade genética entre as amostras do grupo 2. As análises aglomerativas suportaram a de partição onde foi observada associação do grupo 2 com a origem geográfica e presença de manifestações atípicas de LTA não sendo observada associação com número de lesões. As sequências foram utilizadas em análises filogenéticas onde foi observado que tanto utilizando somente *L. guyanensis* quanto outras espécies filogeneticamente mais distantes de *L. braziliensis* como *outgroup*, a divisão em grupos proposta foi suportada. A partir do painel de amostras de *L. braziliensis* estudado conclui-se que em Minas Gerais observamos a presença de um grupo de amostras geneticamente variantes, associadas ao perfil atípico de lesões e provenientes da região norte do estado.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the most common species of *Leishmania* genus which parasites humans in Brazil. This species may present a huge spectrum of clinical symptoms, from single wounds to serious mucosal involvement, which is the most severe complication. Analyzes that assess the genetic variability of *L. braziliensis* are essential to clarify a possible correlation between atypical clinical manifestations of LTA with parasites genetically variants and their geographical distribution, and contribute to population structure studies of this species in Minas Gerais state. The aim of this study was to analyze the genetic variability of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates from different regions of Minas Gerais State. Clinical and molecular diagnosis of patients with typical and atypical lesions from various endemic areas of Minas Gerais were carried out and the isolates were separated into two sample groups: group 1 containing samples from various geographical regions of the state; and group 2 composed by isolates from Xakriabá Indigenous Reserve localized in São João das Missões district. The specific identification of samples was performed with PCR-G6PD method and *L. braziliensis* was confirmed in all of them. The analysis of genetic variability was carried out using genetic markers hsp70, Cpb, ITS1, G6PD and 6PGD. In PCR-RFLP of hsp70 two restriction patterns were observed: all samples from group 1 and MG15 and MG16 isolates of group 2 showed indistinguishable restriction profile to *L. braziliensis* reference strain, while most of the Group 2 samples exhibited a variant restriction profile. The hsp70 amplicon was sequenced and polymorphisms were observed even at the *HaeIII* restriction enzyme's site. In PCR-RFLP of Cpb, samples of group 1 and MG15 and MG16 strains of group 2 restriction profile were indistinguishable to the reference strain *L. braziliensis*, while most of the group 2 samples showed restriction profiles identical to other species of the subgenus *L. (Viannia)*. The sequenced fragment showed polymorphisms including one at restriction site of *TaqI* enzyme. Results of ITS1 PCR-RFLP from group 1 and MG15 and MG16 strains were a restriction profile similar to *L. guyanensis* specie, while Group 2 samples presented *L. braziliensis* profile. The MG19 and MG27 strains (group 2) exhibited different patterns of those reference strains. The sequencing of the PCR-6pgd showed inter-species polymorphisms. Restriction profiles and sequences were used in hierarchical, partition and similarity statistical analyzes. The partition analysis confirmed the division of samples into two groups, suggesting greater genetic variability between samples of group 2. The clustering analysis supported the partition where was observed an association of group to the geographical origin and presence of atypical manifestations of LTA, but no association was observed with number of wounds. The sequences were used in phylogenetic analyzes and was observed that both using only *L. guyanensis* as other more phylogenetically distant species *L. braziliensis* as *outgroup*, the division into two groups proposal was supported. Considering the *L. braziliensis* samples panel studied in this project it is possible to conclud that there is a group of samples genetically variants associated with atypical profile of wounds from the northern region of Minas Gerais state.

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são caracterizadas como um grupo de doenças infecto-parasitárias, podendo acometer o homem e outros hospedeiros mamíferos. A infecção acontece quando insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), do gênero *Phlebotomus* (na Europa, África e Ásia – Velho Mundo) e *Lutzomyia* (do sudeste dos EUA ao norte da Argentina – Novo Mundo) (Young & Duncan, 1994; Killick-Kendrick, 1999), infectados por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 realizam o repasto sanguíneo.

As leishmanioses formam um complexo de doenças de caráter crônico e fazem parte do grupo das doenças negligenciadas endêmicas em todo o mundo¹. Elas estão presentes em 98 países distribuídos em quatro continentes, apesar de não ser caracterizada como endemia em todos estes (WHO, 2010; Alvar et al., 2012). Estima-se que por volta de 350 milhões de pessoas em todo o mundo estejam sob o risco de contrair a doença, com um número de pessoas infectadas ao redor de 12 milhões e aproximadamente 59 mil óbitos anuais pela forma visceral (Buitrago et al., 2011), sendo, dentre as doenças parasitárias, a segunda em número de óbitos, superada apenas pela malária (Alvar; Yactayo; Bern, 2006).

Contrastando com essa estimativa, cerca de 600.000 casos são registrados mundialmente. Portanto, os dados de prevalência ficam subestimados, pois, além da subnotificação, a doença pode ser assintomática. Apesar de ser uma doença de notificação compulsória no nosso país, sua declaração é obrigatória apenas em 32 dos 88 países em que é endêmica (WHO, 2007). As leishmanioses apresentam altas e crescentes taxas de morbidade e mortalidade a nível mundial. Atualmente a falta de uma terapia segura, potente e efetiva associada a baixos custos e efeitos tóxicos e

¹ Endemias caracterizam-se pela presença constante de uma doença em uma determinada população de uma área geográfica (Brasil, 2004). As seis endemias consideradas negligenciadas em todo o mundo são a malária, as tripanossomíases, as leishmaníases, as esquistossomoses, as ascaríases, e as ancilostomíases. (Hotez et al, 2004; Silva et al, 2010).

adversos reduzidos, compromete o tratamento e contribui para tais números alarmantes (den Boer *et al.*, 2011; WHO, 2011).

As leishmanioses estão amplamente distribuídas pelo mundo, principalmente pelo movimento forçado e/ou voluntário de populações que expõe pessoas não imunes à infecção (Seaman *et al.*, 1995). A maioria dos casos humanos de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, Índia, Etiópia, Nepal, Bangladesh e Sudão. A maior parte dos casos de leishmaniose tegumentar Americana (LTA) tem sua ocorrência concentrada no Brasil, Peru e Bolívia (WHO, 2011).

Nas Américas, são pelo menos 21 países atingidos pelas leishmanioses, com expansão geográfica e numérica preocupantes. Essa expansão tem ocorrido devido à extensa modificação de ambientes florestais primários, onde intervenções como desmatamento, abertura de estradas e urbanização de áreas primitivas propiciam a antropização dos ciclos evolutivos da *Leishmania* e de outros parasitos, favorecendo a transmissão peridomiciliar deste agravo (Araújo *et al.*, 2013; Belo *et al.*, 2013 WHO, 2011).

A doença pode se manifestar clinicamente através de lesões únicas ou múltiplas ao longo da epiderme, afetando ou não as mucosas (dependendo da espécie de protozoário em questão). A forma visceral compromete principalmente órgãos específicos como o fígado e o baço, de acordo com o tropismo dos parasitos a tais tecidos. Além disso, as manifestações clínicas e o curso da infecção dependem tanto de fatores relacionados ao protozoário, por exemplo, a espécie de *Leishmania* envolvida, suas características genotípicas e sua patogenicidade, quanto a fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro, como seu perfil e estado imunológico, genético e nutricional (Bañuls *et al.*, 2007; Quaresma, 2011).

As leishmanioses são doenças negligenciadas inclusive pela indústria farmacêutica, uma vez que não existem muitas alternativas terapêuticas disponíveis. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde a droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina -Glucantime), e como segunda escolha a anfotericina B e derivados em casos complicados, como pacientes cardiopatas, hepatopatas, crianças e idosos (Brasil, 2010). O tratamento é complexo, uma vez que requer atendimento ambulatorial/hospitalar pela

necessidade de administração intravenosa ou intramuscular, além do desconhecimento de parte dos médicos acerca da doença e abandono por parte dos pacientes, por ser uma droga altamente citotóxica (Goto & Lindoso, 2010).

1.1.2 *Leishmaniose Tegumentar Americana*

A LTA acompanha o homem desde tempos antigos, com relatos e descrições de lesões cutâneas datando o século I d.C. (Lainson, 1997). Existem relatos de cerâmicas pré-colombianas de 400 a 900 anos d.C., no Peru, mostrando lesões em lábio e nariz, cujas características correspondem a uma das formas da doença (Lainson & Shaw, 1998). Também existem relatos paleomédicos de múmias com lesões de pele e mucosas. No Brasil, a primeira referência encontrada acerca das formas cutâneas de leishmaniose data de 1827, em um livro sobre a viagem de um Frei brasileiro do Amazonas ao Peru (Lainson & Shaw 1998; Basano & Camargo, 2004)

É uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil. Apresenta ampla distribuição pelo território nacional com ocorrência de formas clínicas graves, podendo causar reflexos no campo social e econômico. A LTA pode apresentar dificuldades em seu diagnóstico, devido a possibilidade de ocorrência de lesões atípicas (Freire, 2011, Freire *et al.*, 2012), que podem ser confundidas em alguns casos com manifestações clínicas de outras doenças como tuberculose cutânea ou esporotricose. Além disso, o tratamento é outra dificuldade, devido a alta toxicidade dos medicamentos utilizados e necessidade de longo acompanhamento médico (Dorval *et al.*, 2006).

A doença ocorre em ambos os sexos e todas as faixas etárias, porém pela maior exposição ao inseto vetor, homens são geralmente mais acometidos que mulheres, sendo considerada uma doença ocupacional ou de população economicamente ativa (Oliveira *et al.*, 1995; Ministério da Saúde, 2007). Entretanto, pode ocorrer a subnotificação dos casos em mulheres pelo acesso geralmente limitado das mesmas aos serviços de saúde (WHO, 2011).

O curso da infecção é influenciado por fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro, como também fatores relacionados aos vetores. Assim, a

capacidade da *Leishmania* de causar diferentes formas clínicas depende da natureza do agente etiológico (sua espécie e virulência), da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (Quaresma *et al.*, 2011), e também por fatores presentes na saliva do vetor, que auxiliam o processo de infecção e invasão celular por parte do parasito (Valenzuela *et al.*, 2004).

A LTA é uma doença com um amplo espectro de manifestações clínicas que podem variar desde lesões que se curam espontaneamente até formas crônicas e desfigurantes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, são três os tipos principais da doença: i) forma cutânea: úlceras de pele usualmente em áreas expostas, como face, braços e pernas e que, geralmente, se curam dentro de alguns meses, deixando cicatrizes; ii) forma cutânea difusa e crônica disseminada: produzem lesões na pele semelhantes às causadas na lepra lepromatosa, são formas de difícil tratamento; iii) forma mucocutânea: as lesões podem destruir parcial ou totalmente as mucosas do nariz, boca e garganta, cavidades e tecidos circundantes (WHO, 2010)

No Brasil, a LTA é considerada uma zoonose, mantida na natureza pelos animais silvestres e sinantrópicos, com a participação secundária de animais domésticos e acidentalmente seres humanos. Nas últimas décadas, os estudos epidemiológicos da LTA observaram mudanças no comportamento epidemiológico da doença de modo que esta também ocorre em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas e urbanas de grandes centros urbanos (Passos *et al.*, 1993; Quaresma *et al.*, 2011; Avila-García *et al.*, 2014; Rangel *et al.*, 2014).

No estado de Minas Gerais, os relatos mais antigos de LTA relacionam a mesma com atividades de agricultura e desmatamento para a construção de vias (Orsini, 1940; Martins *et al.*, 1956). A doença apresentou, entre 1985 e 1995, um total de 16.280 casos reportados (Ministério da Saúde, Brasil), sendo relatada pela primeira vez a ocorrência de surtos relacionados a ações de desmatamento. Em Minas Gerais a LTA vem ocorrendo, assim como em outras regiões, em áreas peri-urbanas e urbanas de vários municípios do estado e casos autóctones de transmissão domiciliar vem sendo documentados desde 1987 na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) (Passos *et al.*, 1993). A espécie *L. braziliensis* é encontrada de forma predominante no estado (Passos *et al.*, 1999).

Inúmeros estudos epidemiológicos realizados em diferentes regiões das Américas têm contribuído para um melhor esclarecimento de diversos aspectos dos ciclos de transmissão (Quaresma et al., 2011; Dutari & Loaiza, 2014; Rodríguez et al., 2013; Krolewiecki et al., 2013, Fonseca et al., 2014). Entretanto, existem aspectos epidemiológicos específicos para cada foco de transmissão e estudos que abordam estas características particulares (espécies circulantes na área, espécies de vetores e reservatórios presentes) são importantes para a investigação dos ciclos de transmissão e consequente conhecimento da epidemiologia da doença.

1.2 Agentes etiológicos

O gênero *Leishmania* é notável pelo grande número de parasitas descritos, com uma elevada variabilidade em relação à outras espécies da mesma família. Estes protozoários podem desencadear diversos tipos de manifestações clínicas, desde formas viscerais a lesões cutâneas, que podem em alguns casos apresentar cura espontânea, com possível acometimento mucoso, uma vez que algumas espécies possuem tropismo por tecidos tegumentares, enquanto outras possuem por tecidos viscerais. Esses organismos pertencem à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e foram divididos nos subgêneros *Leishmania* Lainson & Shaw 1987 e *Viannia* Safjanova 1982 considerando a distribuição dos parasitos no trato digestivo do vetor dentre outras características (Lainson, 1997). As espécies do subgênero *Viannia* apresentam desenvolvimento inicial na porção do intestino posterior do flebotomíneo, aderidos à mucosa na região do piloro, e seus representantes são encontrados unicamente no Novo Mundo; as espécies do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se no intestino médio e anterior dos flebotomíneos, e seus exemplares são encontrados tanto no Novo quanto no Velho Mundo.

Esses parasitos são digenéticos, habitando hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo as fêmeas de flebotomíneos responsáveis pela transmissão de um mamífero/reservatório para outro suscetível. Durante seu ciclo de vida, as leishmânias alternam entre formas flageladas móveis e formas sem flagelo aparente e sem motilidade. As formas flageladas móveis

(promastigotas) sobrevivem extracelularmente no trato digestório dos insetos vetores, se reproduzindo neste local, e se desenvolvendo nas formas infectivas (promastigotas metacíclicas). A reprodução destes parasitos parece ser predominantemente assexuada mas estudos recentes tem mostrado a ocorrência de recombinação genética. Em estudo experimental utilizando-se cepas transgênicas resistentes a drogas seletivas foi possível a recuperação de cepa resistente a duas drogas após a infecção natural no inseto vetor (Akopyants et al, 2009)., No momento do repasto sanguíneo, o inseto vetor inocula as promastigotas, que em seguida são fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear, especificamente macrófagos teciduais. Esses parasitos são estimulados pelo ambiente ácido e hostil dos fagolisossomos a se transformarem em formas não-móveis, intracelulares obrigatórias e divisíveis, as amastigotas (Bañuls et al., 2007).

As leishmanioses podem ser desencadeadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. No Brasil, a forma tegumentar pode ser causada por protozoários tanto do subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis*, complexo *L. mexicana*) quanto do subgênero *Viannia* (*L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. lindenbergi* e *L. braziliensis*) com possibilidade de ocorrência de metástases e acometimento mucoso. A LV por sua vez, é causada apenas por espécies do subgênero *Leishmania* (complexo *L. donovani* e *L. infantum*, sinonímia de *L. chagasi*) (Martinez et al., 2003; Brasil, 2007)

1.2.1 *Leishmania (Viannia) braziliensis*

No Brasil, dentre os protozoários do gênero *Leishmania* que parasitam o homem, a espécie mais frequentemente encontrada é *L. braziliensis*. O protozoário em questão é classificado ocupando uma posição taxonômica dentro do complexo *Leishmania braziliensis*, em conjunto com a espécie *L. peruviana* Velez, 1913. O protozoário pode causar um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões únicas e típicas, com fundo granuloso e bordas elevadas, até o envolvimento de mucosas nasais e orais, também conhecida como forma cutâneo-mucosa ou mucosa. Além disso, pode ocorrer a disseminação do parasito pelo sistema linfático, sendo estas metástases responsáveis pelos casos de leishmaniose disseminada (Lainson & Shaw,

1998). Dentre as variadas manifestações clínicas, o envolvimento das mucosas é a complicação mais séria, podendo ocorrer lesões desfigurantes que, dependendo da gravidade e da área afetada, comprometem o trato digesto-respiratório severamente. Estas manifestações podem acarretar problemas no âmbito social e psicológico em seus portadores devido a atitudes preconceituosas em relação as lesões. Na maioria das áreas endêmicas, de 1 a 10% de infecções cutâneas localizadas resultam na forma mucosa dentro de um a cinco anos após a cura da lesão primária (Marsden, 1986).

Além do espectro de lesões que podem ser causadas pela espécie *L. braziliensis*, existem relatos de manifestações atípicas da LTA, com características distintas das apresentadas pelas lesões típicas (Baptista *et al.*, 2009, Quaresma, 2011; Shirian *et al.*, 2014). Estas manifestações atípicas são geralmente confundidas com outras doenças, principalmente com esporotricose, hanseníase, tuberculose cutânea ou lúpus eritematoso (Marques *et al.*, 2007; UI & Ber, 2008). Podem apresentar-se sob forma de pápulas, placas, nódulos, ou lesões lupóides, verrucosas ou vegetativas moduladas por diferentes respostas imunes do hospedeiro (Guimarães *et al.*, 2009). Essa diversidade de manifestações clínicas pode estar associada a uma alta variabilidade genética intra-específica deste patógeno, e também aos ciclos de transmissão (Cupolillo *et al.*, 2003).

O parasito *L. braziliensis* possui uma ampla distribuição nas Américas, desde a América Central até o norte da Argentina, e é observada em todas as áreas endêmicas para LT no Brasil (MS, 2007). Devido à sobreposição de variadas espécies em algumas regiões endêmicas, o controle da transmissão e o tratamento se tornam pouco efetivos, complicados pelo fato de cada espécie apresentar um perfil epidemiológico distinto e diferentes formas de resposta ao tratamento (Buitrago *et al.*, 2011).

Cabe ressaltar que a transmissão deste parasito ocorre principalmente em áreas de vegetação oriundas das florestas tropicais que são substituídas por áreas de ocupação humana desordenada (Rêgo, 2013). Desta forma, a adaptação do seu vetor primário *Lu. intermedia* tem sido observada, concomitante ao aparecimento de infecções em pequenos mamíferos, cães e humanos (Aguillar *et al.*, 1987; Marzochi, 1992; Marzochi & Marzochi, 1994).

O protozoário *L. braziliensis* possui a maior parte de seu genoma conservado entre espécies do mesmo gênero, onde aproximadamente 47 de seus genes são espécie-específicos, corroborando o fato de que *L. braziliensis* é uma espécie bastante divergente quando comparada a outras do mesmo gênero (Peacock et al., 2009). Apesar dessa similaridade, as espécies do subgênero *Viannia* possuem diferentes meios de regulação gênica. Além disso, apenas em *L. braziliensis* foram observadas evidências da existência de maquinaria de RNA de interferência (RNAi) e elementos de DNA transponíveis (Smith et al., 2008).

1.3 Epidemiologia Molecular e Diversidade Genética de Parasitos do Gênero *Leishmania*

Devido ao modo de transmissão e a grande variedade de ambientes colonizados, o parasito necessita se adaptar rapidamente a tais ambientes drasticamente diferenciados. Assim, seu genoma é extremamente organizado e funcional, com a expressão constitutiva de genes relacionados à diferenciação, virulência, sobrevivência e patogênese e expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo, tradução de proteínas, anexos de membrana e genes hipotéticos entre suas formas de vida (Leifso et al., 2006; Sterkers et al., 2012).

O genoma destes protozoários é organizado em 36 cromossomos, nas espécies do Velho Mundo (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*) (Wincker et al 1996) e 34 e 35 cromossomos nas espécies *L. mexicana* e *L. braziliensis* do Novo Mundo, respectivamente (Britto et al., 1998), dos quais 31 são conservados e os outros originários de eventos de fusão ou fissão. Essa diferença de cromossomos entre espécies do mesmo gênero pode ser devido a vários eventos, como por exemplo, a ocorrência de aneuploidia em mosaico durante a replicação celular. Isso tem como consequência uma extrema diversidade genotípica e cariotípica, além de heterogeneidade intra-espécies devido ao fato de que a população compreende quase exclusivamente células homozigóticas (Sterkers et al., 2012). Por ser uma importante fonte de diversidade fenotípica, esses parasitos

podem utilizar desse mecanismos de reorganização gênica para se adaptar a diferentes ambientes durante seu ciclo de vida, conseqüentemente ampliando o espectro de manifestações clínicas (Sterkers *et al.*, 2012).

Uma característica marcante em relação ao genoma dos protozoários do gênero *Leishmania* é o alto grau de similaridade entre espécies diferentes, mesmo entre espécies separadas há milhões de anos, como *L. tarentolae* (Raymond *et al.*, 2012). e essa similaridade também é observada em relação a outras espécies de tripanossomatídeos, como *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005; Sterkers *et al.*, 2012). Existem por volta de 6500 genes da família Trypanosomatidae, e mais de 1000 específicos para o gênero *Leishmania*.

Mesmo que os protozoários do gênero *Leishmania* sejam organismos eucariotos, os mesmos preservam uma série de características similares aos seus ancestrais bacterianos, como o baixo número de *introns*, genes agrupados de forma policistrônica, maquinaria de transcrição simplificada onde há processamento de mRNA acoplado a poliadenilação (Ivens *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2008). Os tripanossomatídeos mantém a regulação de sua expressão gênica a nível pós-transcricional, além da importante função de regiões não traduzidas na posição 3' (3' UTR) com função regulatória (Aly *et al.*, 2005; Boucher *et al.*, 2002; Haile & Papadopoulou, 2007). Também apresentam modificações pós-traducionais de proteínas de superfície e de excreção, onde utilizam mecanismos de duplicação e amplificação gênica como uma alternativa, auxiliando no aumento da expressão gênica (Aly *et al.*, 2005).

Além dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no perfil de distribuição da doença, o sistema reprodutivo dos protozoários do gênero *Leishmania* pode ser uma das chaves de sua biologia e disseminação. Sua estrutura populacional e perfil de reprodução fornecem informações importantes em vários aspectos, como na epidemiologia, diagnóstico, tratamento e controle da doença. De acordo com diversos autores, existem duas hipóteses que tentam elucidar os mecanismos de reprodução desses protozoários: clonalidade e sexualidade. A primeira hipótese é baseada na reprodução assexuada onde as células-filhas são geneticamente idênticas à célula de origem (Tibayrenc *et al.*, 1990; Tibayrenc, 1993; Rougeron *et al.*, 2010) e é a mais aceita pela

comunidade científica. Já a segunda hipótese foi proposta por Bastien *et al.*, (1992), baseada em revisões teóricas e achados de análises de marcadores microssatélites ao longo do genoma de tais protozoários (Kuhls *et al.*, 2007; Rougeron *et al.*, 2010, Kuhls *et al.*, 2013). Essa hipótese elucidou prováveis eventos de fluxo e recombinação genética nesses parasitos, ocasionando ocorrência de organismos híbridos entre cepas.

Atualmente na comunidade científica, tem se intensificado a discussão sobre o real mecanismo de reprodução em *Leishmania*, principalmente pela observação de parasitos híbridos em populações naturais, graças ao avanço de técnicas moleculares, que são capazes de distinguir os mesmos em relação a hipótese de infecção mista (Belli *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1991; Banuls *et al.*, 1997; Ravel *et al.*, 2006; Nolder *et al.*, 2007; Hamad *et al.*, 2011; Odiwuor *et al.*, 2011 Gelanew *et al.*, 2014).

Além disso, experimentos utilizando duas cepas distintas e com diferentes marcadores, como fluorescência e genes de resistência a drogas, observaram a origem de uma terceira linhagem híbrida contendo genes provenientes de ambas as cepas parentais (Akopyants *et al.*, 2009; Sadlova *et al.*, 2011; Inbar *et al.*, 2013).

Estes híbridos não foram descritos no organismo do hospedeiro e nem são encontrados em cultura, e só ocorrem no tubo digestivo de flebotomíneos, uma vez que provavelmente há a co-existência de fatores propícios à reprodução dos organismos e também suas formas reprodutivas (Rioux *et al.*, 1990; Romano *et al.*, 2014). Também são observados eventos de trissomia ou perda de heterozigotidade em alguns *loci*. Apesar disso, a herança do DNA do cinetoplasto é uniparental, e não se sabe por qual motivo ou que circunstâncias levam ao desaparecimento de uma determinada cópia do kDNA. Cruzamentos intraclonais são mais difíceis de serem observados, uma vez que o parasito reconhece *self* e *non-self* (Lin *et al.*, 2005). Entretanto, as formas reprodutivas de *Leishmania* ainda não foram encontradas, necessitando mais estudos.

Assim, tem sido aceito que protozoários da espécie *L. braziliensis* tem a capacidade de transitar entre diferentes meios de reprodução: clonal, quando no inseto vetor e hospedeiro mamífero, e endogamia, somente no interior do inseto vetor, com a ocorrência de alguns eventos de recombinação entre

indivíduos geneticamente divergentes (Akopyants *et al.*, 2009; Peacock *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2010; Rogers *et al.*, 2014). O mesmo também é observado em outras espécies de tripanossomatídeos, como *Trypanosoma brucei* (Gibson *et al.*, 2008).

Ainda que não exista um senso comum sobre os mecanismos pelos quais os protozoários do gênero *Leishmania* realizam eventos de recombinação e fluxo gênico, muitos parasitos híbridos interespecies têm sido reportados na comunidade científica (Belli *et al.*, 1994; Dujardin *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 1997; Bañuls *et al.*, 1999; Romano *et al.*, 2014; Rougeron *et al.*, 2015). Tais achados, aliados aos perfis genéticos desses parasitos e manifestações clínicas atípicas, podem confundir posteriores análises e também gerar investigações enviesadas e equivocadas. Assim, técnicas moleculares com alta sensibilidade podem auxiliar no esclarecimento da distribuição e das relações filogenéticas e de ancestralidade entre cepas e entre espécies, auxiliando no entendimento da distribuição espacial dos parasitos, e também na epidemiologia das Leishmanioses.

Uma característica importante observada nos organismos da ordem Kinetoplastida é a presença do cinetoplasto, um DNA mitocondrial localizado próximo ao corpo basal do flagelo (Simpson, 1987), porém como em outros organismos unicelulares, os caracteres morfológicos são pouco úteis e geram informações superficiais acerca da diversidade populacional e relações evolucionárias para o gênero *Leishmania* e também para a família Trypanosomatidae (Fraga *et al.*, 2010).

A definição de espécies é um tema controverso dentro do gênero *Leishmania*. O conceito atualmente em consenso, de que espécie é um agrupamento de populações naturais intercruzantes, reprodutivamente isolados de outros grupos com as mesmas características (Mayr, 1970), é arbitrário e baseado tanto em características extrínsecas como intrínsecas diversas, acarretando controvérsias nas definições deste gênero. Este pode ser um dos motivos da existência de grande quantidade de espécies, auxiliada pela falta de critério de alguns taxonomistas. Portanto, um conjunto de parâmetros, como geográficos, vetores e hospedeiros, genéticos, moleculares e bioquímicos devem ser usados para estudar e classificar corretamente os protozoários do gênero *Leishmania*, principalmente frente à extensa variabilidade genética que

estes organismos apresentam. O sistema atual de classificação de *Leishmania* aborda dados obtidos por técnicas enzimáticas e análises de marcadores moleculares, associadas aos conceitos de descrição de cada espécie (Bañuls et al., 2002).

A variabilidade genética de organismos do gênero *Leishmania* também pode estar em associação com determinados ecótopos, que podem possuir diferentes endemicidades (Gomes et al., 2002; Schriefer et al., 2004; Brito et al., 2009; Ferreira et al., 2012). O desenvolvimento de técnicas moleculares auxilia na pesquisa por características genéticas que possam auxiliar na localização geográfica de cepas relacionadas ou distantes entre si, principalmente em áreas onde existam espécies em simpatria, ou já exista a ocorrência de híbridos naturais (Motoie et al., 2013).

O conceito de epidemiologia molecular vem sendo amplamente difundido e utilizado na comunidade científica, e consiste no uso de técnicas moleculares aplicadas ao estudo da distribuição e determinantes de doença em populações humanas (Foxman & Riley, 2001). Em outros termos, é a aplicação epidemiológica de técnicas moleculares com o intuito de identificar fatores que determinem a distribuição de uma doença no tempo e espaço, assim como fatores que determinam sua transmissão, manifestação e progressão. As abordagens de epidemiologia molecular podem auxiliar no controle da distribuição de uma determinada doença; no estudo da prevalência da infecção numa população; auxílio no diagnóstico clínico; determinação da estrutura da população e a extensão da migração dos patógenos e vetores envolvidos; e estudo da emergência e propagação de resistência a drogas.

O estudo de epidemiologia molecular de organismos do gênero *Leishmania* apresenta algumas dificuldades devido à sua extensa diversidade clínica e epidemiológica. O padrão-ouro para a caracterização molecular das espécies do gênero *Leishmania* é a Eletroforese de Enzimas Multilocus (MLEE) (WHO, 2010), utilizando combinações de diversos sistemas enzimáticos (Cupolillo et al., 1994), também pode ser utilizada nos estudos epidemiológicos e de variabilidade genética (Baptista et al., 2009). Porém atualmente essa técnica vem deixando de ser utilizada em tais estudos, exceto em identificação de parasitos, devido à limitação intrínseca em seus marcadores, à necessidade de isolamento em meio de cultura e ao fato de ser laborioso e consumidor de

tempo (Baptista *et al.*, 2009). Assim, a técnica MLEE vem sendo gradualmente substituída ou utilizada em associação com outras técnicas moleculares, a partir do desenvolvimento de metodologias padronizadas e reprodutíveis. Neste contexto, algumas técnicas vêm sendo mais frequentemente utilizadas, dirigidas à regiões codificantes ou não-codificantes provenientes do DNA do cinetoplasto ou do núcleo (Lukes *et al.*, 2007), e análises por microsatélites em regiões variáveis (MLMT) (Baptista *et al.*, 2009, Oddone *et al.*, 2009; Aluru *et al.*, 2015). Essas técnicas, associadas a informações epidemiológicas, podem auxiliar no entendimento da epidemiologia molecular dos protozoários do gênero *Leishmania*, uma vez que ambos os campos de conhecimento podem preencher as lacunas ainda existentes acerca das leishmanioses.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo genético de populações de parasitos que infectam diferentes hospedeiros em regiões geográficas distintas é de grande importância para o entendimento da epidemiologia das doenças por eles causadas. Além disso, contribui para esclarecer o papel biológico de variantes genéticas com relação à virulência, patogenicidade, resistência à drogas, dentre outras características.

Por se tratar da principal espécie causadora de LTA em Minas Gerais, a caracterização genotípica de *L. braziliensis* é essencial para um melhor conhecimento sobre os focos de transmissão nesta região. Neste estudo foram utilizadas amostras de *L. braziliensis* isoladas de casos humanos de LTA provenientes de vários municípios de Minas Gerais e que já haviam sido utilizadas em estudos moleculares. Nos estudos prévios foram obtidos resultados interessantes acerca da possível associação entre as características genéticas destes isolados e aspectos clínico-epidemiológicos.

Sendo assim, nos propusemos analisar a variabilidade genética de um painel de amostras de *L. braziliensis* empregando outras metodologias moleculares visando fornecer subsídios para o melhor conhecimento destes parasitos. Adicionalmente, análises de agrupamento hierárquico e filogenética foram utilizadas para a investigação da possível correlação de manifestações clínicas da LTA com parasitos geneticamente variantes e sua distribuição geográfica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a variabilidade genética de isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* provenientes de pacientes com diferentes perfis clínicos de regiões de Minas Gerais.

3.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a identificação das amostras de *L. braziliensis* isoladas de casos humanos provenientes de diferentes regiões de Minas Gerais.
- Comparar os isolados de *L. braziliensis* da Terra Indígena Xakriabá com os isolados de outras regiões de Minas Gerais em relação às características genéticas.
- Avaliar a correlação entre a variabilidade genética de *L. braziliensis* com os aspectos clínicos dos pacientes e origem geográfica das amostras.
- Analisar filogeneticamente os isolados de *L. braziliensis* utilizando sequências de diferentes marcadores moleculares.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho Experimental

A figura 1 mostra o fluxograma do desenho experimental seguido para a análise do perfil de variabilidade genética das amostras de *L. braziliensis*.

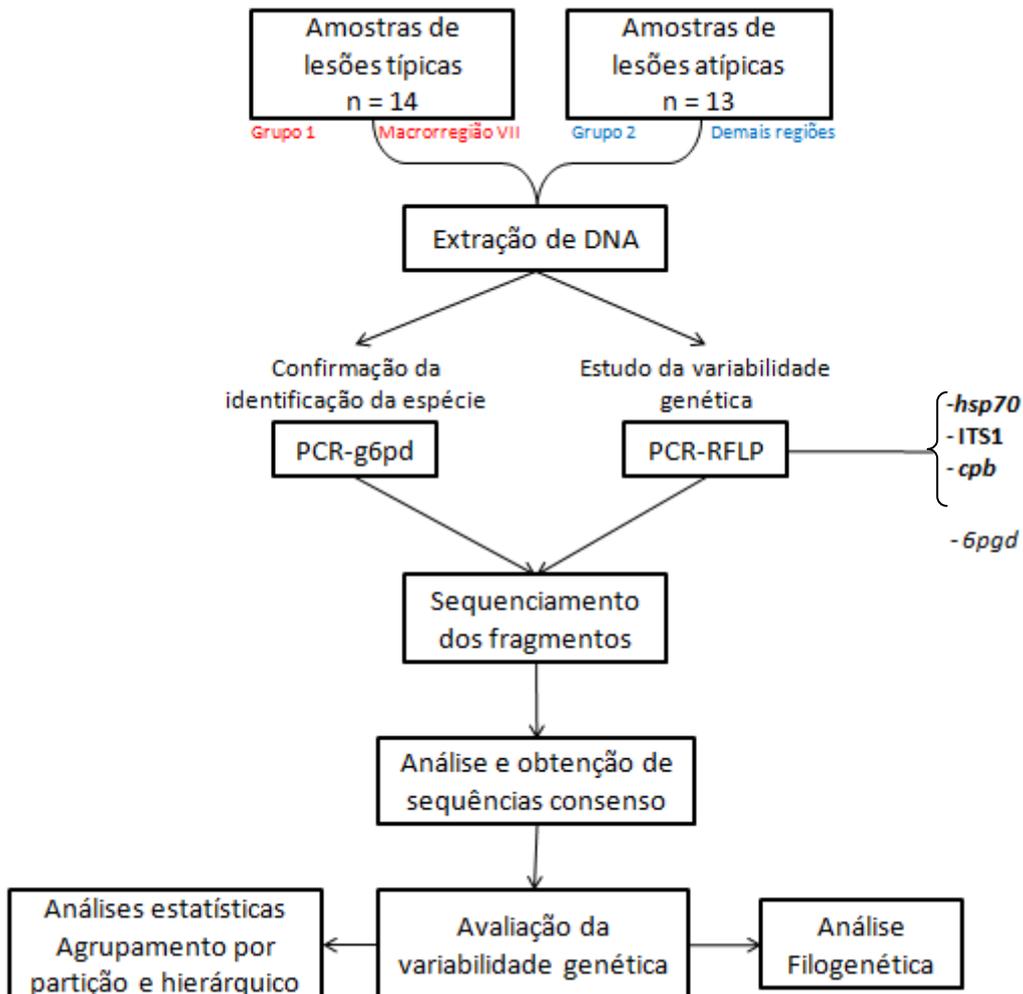


Figura 1: Desenho experimental para as abordagens utilizadas no estudo da variabilidade genética das diferentes amostras deste trabalho.

4.2 Área de estudo

As amostras utilizadas são provenientes do estado de Minas Gerais, localizado na região sudeste do Brasil. O estado, cuja capital é o município de Belo Horizonte, possui 853 municípios delimitados em uma área de 586.522,122 km² (IBGE, 2013), população estimada de 19.597.330 habitantes, e densidade demográfica de 33,41 habitantes/km² (IBGE, 2013). Os municípios estão inseridos em 8 macrorregiões, conforme mostra a figura 2. Minas Gerais possui grande extensão territorial, havendo disparidades socioeconômicas entre as diferentes regiões do estado. O sul, mais industrializado e desenvolvido economicamente, possui maior riqueza e apresenta bons indicadores sociais. A porção norte, por sua vez, sofre com a seca e a ausência de políticas públicas eficazes, sendo uma das áreas mais pobres do país, apresentando déficit nos serviços de saneamento ambiental, elevada taxa de mortalidade infantil e alto índice de analfabetismo (IBGE, 2013).

O estado apresenta clima tropical, com subdivisões regionais sobretudo em função da altitude, apresentando variações entre tropical de altitude e tropical úmido. O clima semiárido ocorre no extremo norte mineiro devido a baixa pluviosidade. A cobertura vegetal de Minas Gerais pode ser resumida em quatro tipos (biomas) principais: Cerrado, mais abundante especialmente nas bacias dos rios São Francisco e Jequitinhonha; Mata Atlântica, segundo mais abundante; Campos de Altitude ou Rupestres, encontrados nos pontos mais altos do estado; e Mata Seca, no norte do estado (IBGE, 2013).

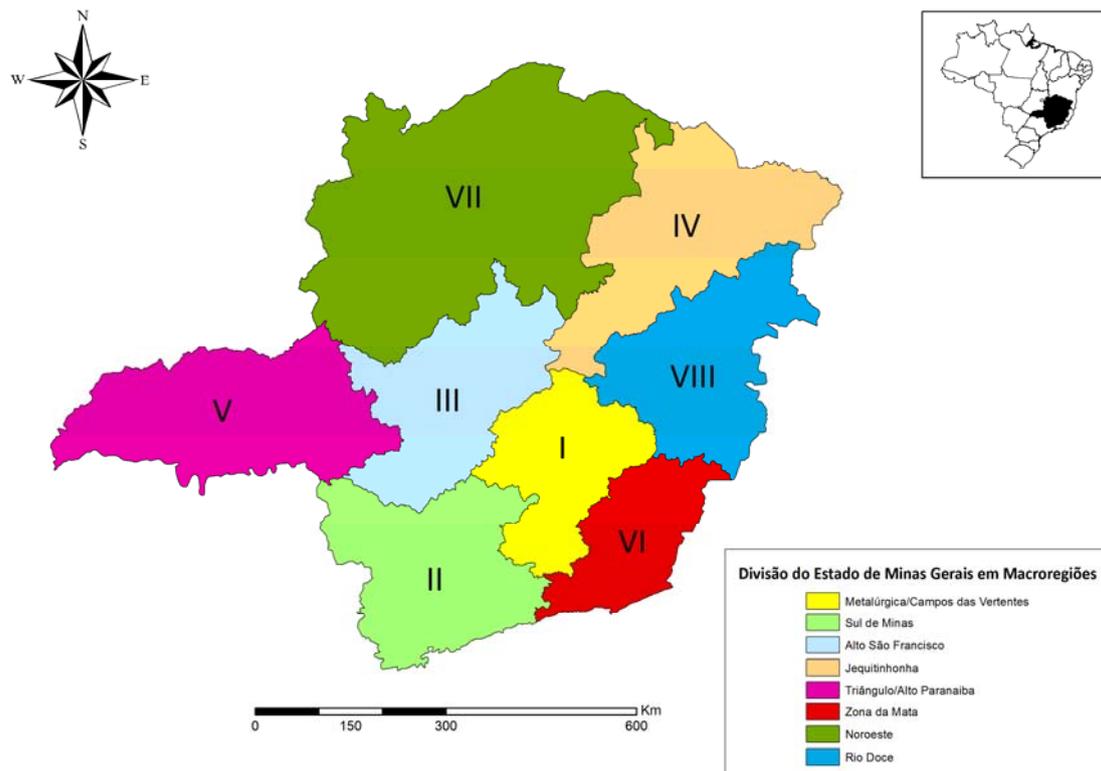


Figura 2: Delimitação do estado de Minas Gerais em macrorregiões. Fonte: IBGE, 2013.

4.3 Amostras

Foram utilizadas 27 cepas isoladas de casos humanos e identificadas por meio da eletroforese de isoenzimas (MLEE) como *L. braziliensis*. Tais amostras são provenientes de diferentes macrorregiões do estado (figura 2) e foram divididas em dois grupos hipotéticos: i) grupo 1: constituído por amostras de variadas regiões do estado de Minas Gerais, isoladas de pacientes com lesões típicas de LTA; em estudos anteriores essas amostras apresentaram alto índice de similaridade utilizando-se os marcadores de RAPD, SSR e isoenzimas (Gontijo, 2000); ii) grupo 2: amostras provenientes de área endêmica no norte do estado (São João das Missões – macrorregião VII), isoladas de pacientes com manifestações atípicas da doença, e que em estudo anterior apresentaram polimorfismos ao longo da sequência do marcador hsp70 (Quaresma, 2011). A tabela 1 resume as características das amostras utilizadas. Cepas de referência da OMS foram utilizadas como parâmetro de comparação interespecíes nas várias técnicas (tabela 2).

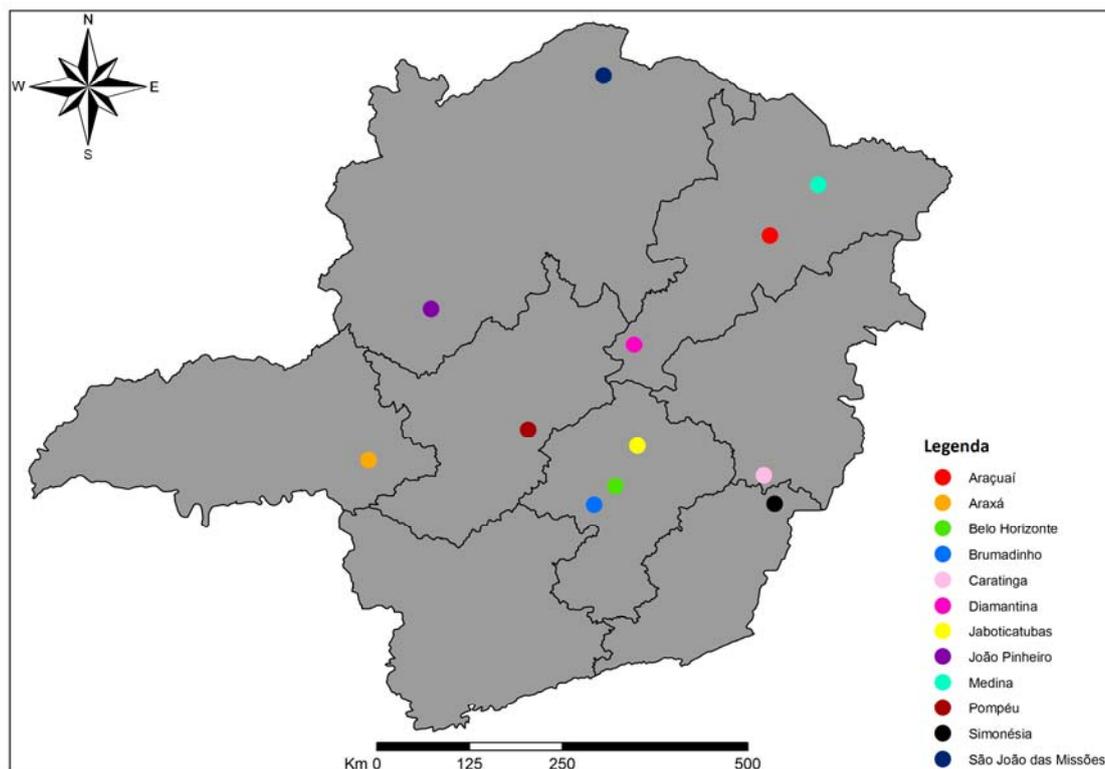


Figura 3: Distribuição das amostras de *Leishmania braziliensis* por município e macrorregiões no estado de Minas Gerais. Fonte: IBGE, 2013.

Tabela 1: Características das amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* estudadas

Código Internacional	Grupo	Classificação e tipo de lesão	Local de Infecção	Região do estado
MHOM/BR/93/MG1	1	Cutânea única, típica	Brumadinho	I
MHOM/BR/93/MG2	1	Cutânea única, típica	Jaboticatubas	I
MHOM/BR/95/MG3	1	Cutânea única, típica	Belo Horizonte	I
MHOM/BR/93/MG4	1	Cutânea múltipla, típica	Pompéu	III
MHOM/BR/94/MG5	1	Cutânea múltipla, típica	Pompéu	III
MHOM/BR/98/MG6	1	Cutânea única, típica	Pompéu	III
MHOM/BR/98/MG7	1	Cutânea única, típica	Medina	IV
MHOM/BR/96/MG8	1	Cutânea única, típica	Araçuaí	IV
MHOM/BR/98/MG9	1	Cutânea única, típica	Diamantina	IV
MHOM/BR/95/MG10	1	Cutânea única, típica	Araxá	V
MHOM/BR/93/MG11	1	Cutânea única, típica	João Pinheiro	VII
MHOM/BR/93/MG12	1	Cutânea única, típica	Simonésia	VIII

MHOM/BR/95/MG13	1	Cutânea única, típica	Caratinga	VIII
MHOM/BR/95/MG14	1	Cutânea única, típica	Caratinga	VIII
MHOM/BR/09/MG15	2	Cutânea múltipla, típica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG16	2	Cutânea única, típica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG17	2	Cutânea disseminada	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG18	2	Cutânea única, típica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG19	2	Cut. disseminada atípica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/09/MG20	2	Cutânea única, típica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/10/MG21	2	Cutânea única, atípica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG22	2	Cutânea recidiva, atípica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG23	2	Cutânea múltipla, atípica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG24	2	Cutânea única, atípica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG25	2	Cutânea única, típica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG26	2	Cutânea única, atípica	S. J. Missões	VII
MHOM/BR/08/MG27	2	Cutânea única, típica	S. J. Missões	VII

Tabela 2: Cepas de referência da OMS utilizadas no estudo.

Espécie	Código Internacional	Forma Clínica	Origem
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903	LC	Pará, Serra dos Carajás, Brasil
<i>L. (V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M4147	LC	Pará, Monte Dourado, Brasil
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/74/PP75	LV	Bahia, Ituaçu, Brasil
<i>L. (L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8	LC	Pará, Utinga, Brasil

4.4 Procedimentos Éticos

As amostras isoladas dos indivíduos provenientes da terra indígena Xakriabá, em São João das Missões/MG foram obtidas a partir do ano de 2008, ao longo do desenvolvimento de projeto aprovado no CONEP sob o registro nº 355/2008 e com autorização para entrada em terra indígena junto à FUNAI sob o registro nº 149/CGEP/08. As amostras oriundas das demais áreas endêmicas de Minas Gerais foram obtidas a partir de atendimento ambulatorial no Centro

de Referência em Leishmanioses – Fiocruz MG durante período compreendido entre 1993 e 1998.

4.5 Procedimentos Moleculares

4.5.1 Extração de DNA de promastigotas de *Leishmania* em meio de cultura

As amostras selecionadas foram submetidas à extração do DNA genômico utilizando o Kit de Extração de tecido e células Gentra Puregene® da QIAGEN, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com algumas modificações para otimização.

As formas promastigotas das diferentes cepas de *Leishmania*, na concentração de 10^9 parasitos, foram homogeneizadas ao vórtex por 20 segundos, adicionado 300 μ L de solução de lise e 1,5 μ L de proteinase K (concentração da proteinase), homogeneizadas por 20 segundos e incubadas a 55° C durante 12 horas. Após o período de incubação foram adicionados 100 μ L de solução de precipitação de proteínas à solução, que foi homogeneizada por 20 segundos e incubada por cinco minutos a 4°C. Posteriormente os tubos foram vortexados por 20 segundos seguido de centrifugação por cinco minutos a 12000 x g e a fase aquosa sobrenadante transferida para um tubo novo. Foram adicionados 300 μ L de isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente (fase aquosa), seguida de outra centrifugação por cinco minutos a 12000 x g. Após esse passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi seco em inversão contra papel absorvente. Foi adicionado 300 μ L de etanol 70% ao tubo já seco e invertido várias vezes seguido de outra centrifugação a 12000 x g por cinco minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo permaneceu invertido contra papel absorvente até secar completamente. Ao final, foram adicionados 200 μ L de água DNase e RNase free. As amostras foram incubadas a 65° C por uma hora e posteriormente deixadas a temperatura ambiente por 12h, sendo estocadas ao final à temperatura de -20°C.

Após a extração foi realizada a quantificação do DNA em todas as amostras, verificando a presença, concentração e qualidade do material

extraído. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000. As amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20ng/μL que foi utilizada em todas as reações. Conforme recomendações do fabricante o espectro de luz foi ajustado para 260 e 280 nanômetros, faixa em que os ácidos nucleicos são detectados. A razão da absorbância de 260nm/280nm foi utilizada para avaliar a pureza do material extraído, sendo considerados aceitáveis valores entre 1,4 de 1,8.

4.5.2 PCR do *g6pd*

Os iniciadores ISVB 5' TAC TCG CCA TGT CGG AGG 3' e ISVC 5' ATC ACA ATG ATG GTC AAC GCA C 3' (Castilho et al, 2002) específicos para a espécie *L. braziliensis* foram utilizados para amplificar o fragmento de 234 pb em reações contendo solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada nucleotídeo trifosfato (dNTPs) , 0,5 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 2 μL de DNA molde acrescidos de água mili-Q para se obter um volume final de 25 μL. A amplificação do DNA foi realizada alternando 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, seguido por um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5μg/mL).

4.5.3 PCR-RFLP do *hsp70*

Os genes codificadores de proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons (*hsp70*) de *Leishmania* são arrançados *in tandem*, compreendendo uma família de genes cujas sequências codificadoras em diferentes organismos são altamente conservadas (Folgueira & Requena, 2007). Alíquotas de 5,0 μL de DNA foram utilizadas na reação que gera um fragmento de 1300pb do *hsp70*. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 μL utilizando 1,5 mM

MgCl₂, 200 µM dNTP mix (New england), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 0,4 pmol de iniciador senso HSP70for - 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' e 0,4 pmol de iniciador anti-senso HSP70 rev 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (Garcia *et al.*, 2004). A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Eppendorf) alternando 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, anelamento a 61°C por 1 min e extensão a 72°C por 3 min, seguido por um passo de extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídeo (0,5µg/mL). As amostras foram submetidas à digestão utilizando a enzima *Hae*III para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 1µL de *Hae*III (New england) (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima 10x e 12,5 µL de produto de PCR. A mistura então foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147).

4.5.4 PCR-RFLP do ITS1

Vários níveis de variação inter e intra espécies tem sido observados nos protozoários do gênero *Leishmania* do novo e velho mundo, nos espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS1 e ITS2) presentes em multicópias do gene ribossomal não expresso. Os iniciadores LITSR 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' (Schönian *et al.*, 2003) que amplificam um fragmento de aproximadamente 300 a 350pb foram utilizados na seguinte reação: solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP mix, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 5 µL de DNA molde acrescidos de água mili-Q para se obter um volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada alternando 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 53 ° C por 1 minuto e extensão a 72 ° C por 1 minuto em equipamento termociclador automático de DNA (Eppendorf). A reação de RFLP subsequente, utilizando a enzima *HaeIII*, foi preparada como descrito no item anterior.

4.5.5 PCR-RFLP do *Cpb*

Os genes que codificam a proteinase cisteína b estão presentes como multicópias de repetições *in tandem* no genoma de *Leishmania*. A reação de amplificação gera um fragmento de 1050 pb utilizando o seguinte protocolo: 3,0 mM MgCl₂, 200 μM dNTP mix (New England Biolabs), 1,25 unidades de Taq Platinum® DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 pmol de cada iniciador *Cpb* FOR–5' TGTGCTATTCGAGGAGTTCAA 3' e *Cpb* REV–5' TTACCCTCAGGAA TCACTTTGT 3' (Garcia *et al*, 2005), 5 μL de DNA molde para um volume final de 25 μL. A amplificação foi processada em termociclador automático de DNA (Eppendorff) alternando 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido por um passo de extensão final a 72°C por 8 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corado pelo brometo de etídeo (0,5μg/mL). As amostras que apresentaram a banda específica de 1050 pb foram submetidas à digestão utilizando a enzima *TaqI* para análise via RFLP. O perfil gerado após a digestão do produto de PCR do *Cpb* distingue a espécie *L. braziliensis* de outras espécies do mesmo subgênero, sem fazer distinções entre as mesmas. A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 μL, contendo 1 μL de *TaqI* (New England Biolabs) (10 U/μL), 1,5 μL de tampão da enzima e 12,5 μL de produto de PCR. A mistura foi incubada a 65°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados ao padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *Leishmania* utilizadas neste estudo (tabela 2).

4.5.6 PCR do *6pgd*

A enzima 6-fosfogluconato desidrogenase é uma proteína expressa constitutivamente e participa do ramo oxidativo do ciclo das pentoses em *Leishmania*. Fragmentos de 836 pb podem ser obtidos a partir de amplificação utilizando 0,1 mM de cada um dos iniciadores 6PGD-F 5' CTCAAGGAACATGAGCA CGA 3' e 6PGD-R 5' TTGTCCTTGACTTGCTCACG 3' (Boité et al, 2012), solução buffer 1X (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 50 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP mix, 1U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 5 µL de DNA (20 ng/µL) e água Milli-Q para um volume final de 45 µL. As condições de amplificação foram 94 °C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto, seguido de um passo de extensão final a 68°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), e as amostras que apresentaram a banda esperada foram sequenciadas.

4.5.7 Sequenciamento dos alvos moleculares

Os fragmentos de 234 pb do *g6pd*, de 1300pb do *hsp70*, de 300-350pb do ITS1, 1050pb do *Cpb* e 836 pb do *6pgd* foram sequenciados através da metodologia empregada por Sanger (1975) a fim de identificar possíveis polimorfismos de base única (SNPs), para confirmação do diagnóstico específico e análise da diversidade genética de *L. braziliensis*. Os produtos de PCR obtidos a partir da amplificação com os iniciadores foram purificados com o kit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen) segundo instruções do fabricante. Em seguida foi preparada uma mistura contendo 1µL dos produtos purificados, 1µL de cada iniciador na concentração de 5,0 pmol/µL, senso e anti-senso, em tubos separados, 1µL de 5x Sequencing Buffer, 1µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing e água destilada em quantidade suficiente para um volume final de 10 µL. O programa utilizado foi temperatura inicial de 96° C por 1 minuto, alternando 35 ciclos de desnaturação a 96° C por 15 segundos,

anelamento em temperaturas crescentes a partir de 50° C aumentando 1° C por segundo, seguido por passo de extensão a 60° C por 4 minutos. As sequências foram determinadas pelo sequenciador automático de DNA ABI 3730xl DNA Analyzer no Departamento de Bioquímica da UFMG e analisadas por meio dos softwares FinchTV 1.4.0 (Geospiza) e MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Por fim, o algoritmo online BLAST, otimizado para sequências altamente similares (megablast) foi utilizado para comparação das sequências obtidas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

4.6 Procedimentos Estatísticos

4.6.1 Preparação dos dados para os métodos de agrupamento

Inicialmente, foi construída uma tabela onde as amostras foram dispostas em linhas e os parâmetros que caracterizam cada amostra foram apresentados em colunas. Foram considerados como parâmetros os perfis de fragmentos de DNA após a metodologia de RFLP para as sequências de *hsp70*, *cpb* e ITS1, sendo que cada amostra recebeu valor de 0 ou 1 de acordo com a presença ou ausência do fragmento. Devido às sequências não apresentarem qualidade suficiente para permitir a montagem de sequências consenso, cada região amplificada pelos iniciadores senso e antisenso dos marcadores genéticos foi analisada separadamente. As sequências para cada amostra foram, primeiramente, alinhadas utilizando o programa ClustalW versão 2.0 (Larkin *et al.*, 2008), seguida pela eliminação de regiões alinhadas de baixa qualidade pelo programa Gblocks 0.91b (Talavera e Castresana, 2007). Para normalização dos parâmetros, os dados de sequenciamento foram expressos como porcentagem de identidade com a sequência da amostra MG1, utilizada como referência.

4.6.2 Agrupamento por partição e hierárquico

A identificação de classes de amostras baseada na integração dos dados de RFLP e resultados de sequenciamento de DNA foi realizada por duas técnicas de agrupamento utilizando a plataforma R (RDC Team, 2011). Para a primeira técnica de agrupamento, o método de escalonamento multidimensional (Borg et al., 2005) foi primeiramente aplicado na tabela de amostras e parâmetros, para visualização gráfica dos dados em duas dimensões. Em seguida, foi realizado o agrupamento por partição pelo método de *K-means* (Hartigan et al., 1979) com 10000 interações, para identificação de dois grupos previamente validados pelo algoritmo *clValid* (Brock et al., 2008).

A tabela contendo amostras e parâmetros foi também utilizada para construção de uma matriz de distância utilizando o método de distância euclidiana entre cada par de amostras. Essa matriz de distância foi posteriormente utilizada para o agrupamento hierárquico aglomerativo pelo método do encadeamento completo (*complete linkage*) (Defays, 1977).

4.6.3 Cálculo de razão de possibilidades (*Odds ratio*)

Para identificar características clínicas e regionais associadas a diferentes classes de amostras foi utilizado o método da razão de possibilidades (*Odds ratio*). A razão de possibilidades foi calculada para as variáveis: 1- isolamento da amostra na macrorregião VII; 2- presença de lesões atípicas, e; 3- número de lesões dos pacientes entre os grupos amostrais 1 e 2 através da equação:

$$O. R. = \frac{p/(1-p)}{q/(1-q)}$$

Onde O.R. representa a razão das possibilidades (tabela 2), *p* a frequência de uma característica no grupo de amostras atípicas (grupo 2) e *q* a frequência de uma característica no grupo de amostras típicas (grupo 1).

4.7 Procedimentos Filogenéticos

4.7.1 Recuperação das Sequências

As sequências obtidas a partir da amplificação dos marcadores utilizados neste trabalho foram analisadas em relação à qualidade das mesmas. Foi observado o índice de similaridade frente a sequências depositadas no banco de dados GenBank, e foram selecionadas aquelas que apresentaram valores iguais ou superiores a 98%, com maior pontuação em relação aos parâmetros utilizados pelo algoritmo BLASTn, além de não possuírem *gaps* e valor de cobertura igual ou superior a 90%.

As sequências obtidas para cada gene foram alinhadas localmente par a par e depois submetidas a um alinhamento múltiplo utilizando o programa ClustalW (Larkin et al., 2007). Para a obtenção de uma sequência consenso por ambiguidade, esses alinhamentos foram submetidos a um programa "in house" na linguagem Perl.

Com as sequências, foram recuperadas via BLASTn as sequências equivalentes a cada gene em outros organismos do gênero *Leishmania* cujos genomas já foram sequenciados e possuem informações disponíveis publicamente, como o de *L. major*, *L. panamensis* e *L. amazonensis* para serem adicionadas em nossa análise filogenética.

4.7.2 Análises filogenéticas

Utilizando os dados das sequências consenso obtidas, a análise filogenética foi realizada seguindo o seguinte fluxo de análise: (i) alinhamento; (ii) trimagem; e (iii) reconstrução da árvore de máxima verossimilhança.

Os grupos de sequências de cada gene foram alinhados utilizando três programas diferentes: MUSCLE v3.8 (Edgar RC, 2004), MAFFT v7.0 (Kato K & Standley DM, 2013) e ClustalW v2.0 (Larkin et al., 2007). Os três alinhamentos obtidos foram então combinados em um alinhamento consenso usando o programa MCooffee (WALLACE et al., 2006). Essa abordagem, por utilizar diferentes métodos, minimiza o erro de alinhamento entre as amostras. O alinhamento combinado foi submetido a uma trimagem com o programa

trimAl v1.4 (Capella-Gutiérrez, Silla-Martínez & Gabaldón, 2009), com um corte de consistência de 0.1667 e uma nota de corte de gap de 0.1, para remover regiões de difícil alinhamento, que poderiam interferir na qualidade das análises.

Para as análises filogenéticas, primeiramente todos os alinhamentos tiveram seus melhores modelos de substituição de nucleotídeos selecionados através do programa JModelTest (Darriba et al. 2012), contido no pacote ModelTest, de acordo com os valores obtidos pelo Critério de Informação Akaike (AIC) e pelo Critério de Informação Bayesiano (BIC). Com essas informações, as árvores foram reconstruídas usando estimativas de máxima verossimilhança (ML) com o programa PhyML v3.0 (Guindon et al., 2010), por ser o melhor modelo para as análises destas sequências, de acordo com o algoritmo JModelTest.

Para a obtenção destas árvores, duas etapas foram realizadas. Na primeira, as árvores foram reconstruídas gene por gene para verificar as topologias individuais. Na segunda etapa, uma árvore com todos os genes alinhados trimados e concatenados na mesma ordem foi utilizado. Todas as árvores foram visualizadas com o programa Figtree (Morariu et al., 2008).

5 Resultados

5.1 Identificação específica das amostras estudadas

As amostras utilizadas neste estudo foram caracterizadas como *L. braziliensis* em estudos prévios através da técnica de eletroforese de isoenzimas (MLEE) (Gontijo, 2002; Quaresma, 2012). Foi realizada a confirmação da identificação específica para assegurar que se tratava da espécie *L. braziliensis*. Sendo assim foi utilizada a técnica de PCR dirigida ao alvo *g6pd*, com iniciadores específicos para a espécie *L. braziliensis* (Castilho et al, 2002). Os iniciadores amplificam um fragmento de 234 pb nas amostras positivas para a reação, que foi visualizada em todas as amostras de ambos os grupos confirmando a identificação específica das amostras como *L. braziliensis* (figura 4). A banda característica não foi observada nas demais cepas de referência utilizadas, inclusive na espécie do mesmo subgênero, *L. guyanensis*.

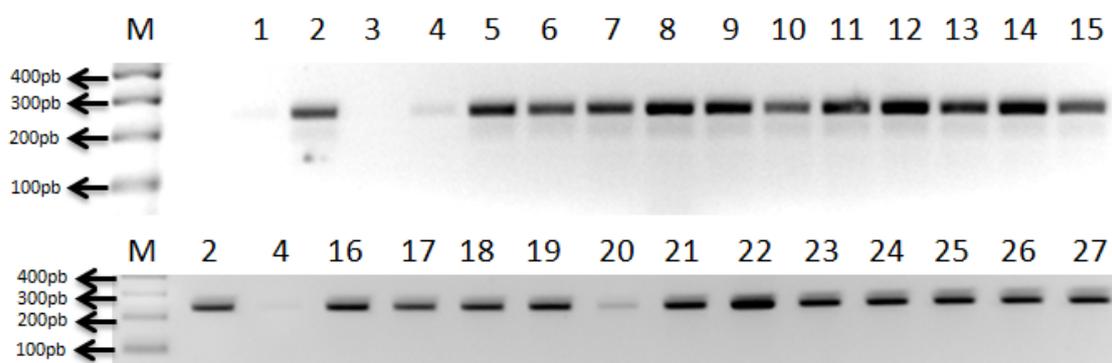


Figura 4: Resultado da PCR dirigida ao fragmento do gene *g6pd*. M – Marcador de peso molecular de 100 pb; 1 – cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8); 2 – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); 3 – cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); 4 – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 5 a 15 – cepas do grupo amostral 1; 16 a 27 – cepas do grupo amostral 2.

Os fragmentos foram sequenciados a fim de verificar a existência de possíveis SNP's ao longo da sequência. As sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados GenBank a partir do algoritmo BLASTn, sendo identificadas como *L. braziliensis*. Não foram observados polimorfismos

ao longo da sequência que sejam capazes de segregar as amostras deste estudo em grupos distintos.

5.2 PCR RFLP da proteína de choque térmico de 70 kilodaltons (*hsp70*)

Na reação de PCR-RFLP dirigida ao alvo *hsp70*, os perfis de restrição obtidos nas amostras do grupo 1, originárias de diferentes regiões de Minas Gerais, foram idênticos àquele observado para a cepa de referência da espécie *L. braziliensis* (figura 5). Em contrapartida, a maioria das amostras do grupo 2 (exceto as amostras MG15 e MG16), provenientes da Terra Indígena Xakriabá exibiram perfis diferentes daquele esperado para a espécie *L. braziliensis* como também para outras espécies de *Leishmania* testadas.

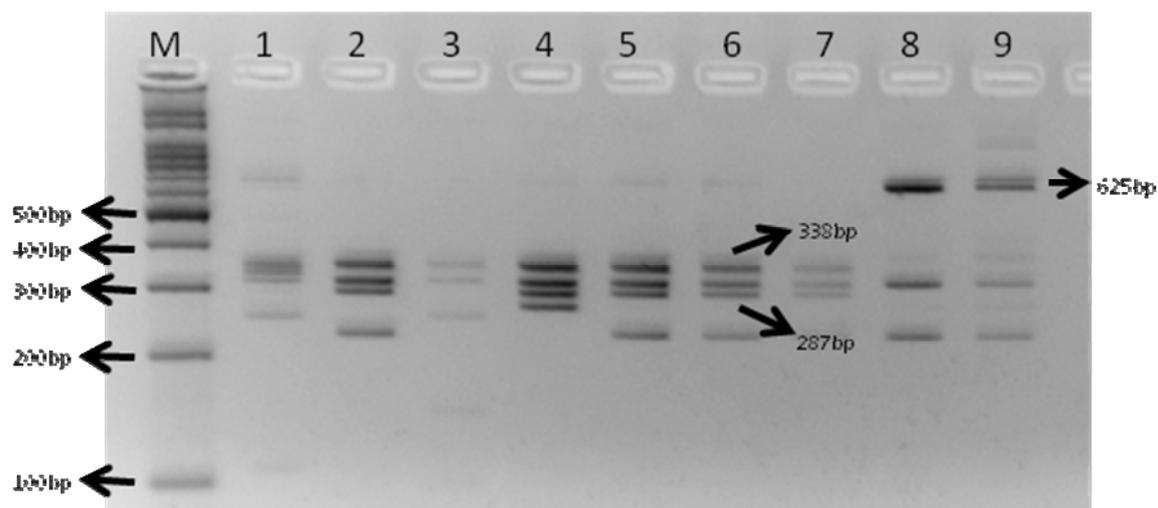


Figura 5: Resultado representativo do perfil de digestão utilizando a enzima *HaeIII* do fragmento do gene *hsp70* amplificado a partir de amostras isoladas em cultura. M – marcador de peso molecular de 100 bp; 1 – cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8); 2 – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); 3 – cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); 4 – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 5 e 6 – amostras provenientes do grupo amostral 1; 7 a 9 – amostras provenientes do grupo amostral 2.

O fragmento purificado de 1300pb do *hsp70* foi sequenciado a fim de verificar se existem SNP's ao longo do mesmo. As sequências obtidas tiveram identidade igual ou superior a 98% frente às sequências depositadas no GenBank para a espécie *L. braziliensis*. As mesmas foram alinhadas no software MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) (figura 6) para identificar possíveis

MG16 – Grupo 2	G	G	G	C	A	A	G
-----------------------	---	---	---	---	---	---	---

Em azul: nucleotídeos correspondentes à sequência de *L. braziliensis* referência; em vermelho: nucleotídeos correspondentes à sequência de *L. guyanensis* referência; em verde: nucleotídeos diferentes a ambas as cepas referência; *- posição do nucleotídeo que é reconhecido pela enzima de restrição *HaeIII*.

5.3 PCR RFLP da Cisteína Protease B (*cpb*)

O DNA purificado de formas promastigotas de *L. braziliensis* foi utilizado na técnica de PCR-RFLP dirigida ao alvo *cpb*. Foram observados dois perfis de restrição com a enzima *TaqI*: i) perfil indistinguível ao gerado pela espécie *L. braziliensis*, observado nas amostras do grupo 1, ii) perfil correspondente às demais espécies do subgênero *Viannia*, predominantemente observado no grupo 2 (figura 7). Vale ressaltar que nas amostras MG15 e MG16, pertencentes ao grupo 2, também foi observado o perfil esperado para *L. braziliensis*.

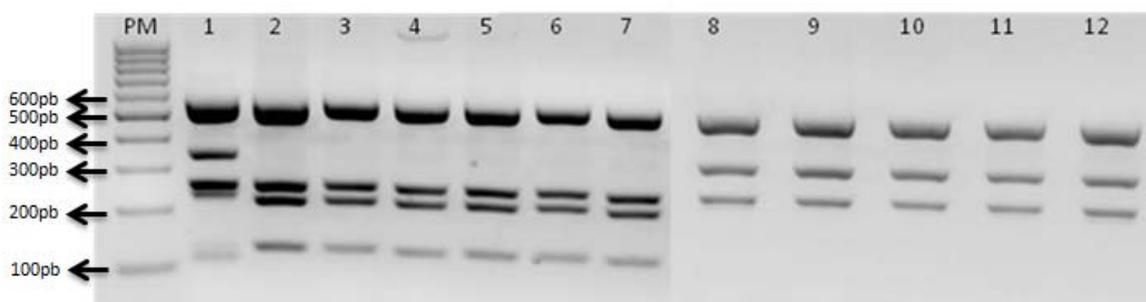


Figura 7: Resultado representativo do perfil da digestão utilizando a enzima *TaqA1* da PCR-RFLP do fragmento de 1050 pb do *cpb* amplificado a partir de DNA extraído das promastigotas. PM – marcador de peso molecular de 100 pares de bases; 1 – cepa padrão *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); 2 – cepa padrão *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 3 a 7 – amostras do grupo 2; 8 a 12- amostras do grupo 1.

O fragmento de 1050pb gerado na PCR do *cpb* foi sequenciado a fim de se investigar o polimorfismo genético observado nestas amostras. As sequências obtidas foram analisadas e identificadas como *L. braziliensis* a partir da ferramenta online BLAST com identidade igual ou superior a 98% em relação às sequências depositadas. A endonuclease de restrição *TaqI* utilizada nestes experimentos reconhece as bases TCGA e cliva entre T e C, gerando extremidades coesivas. Com a análise das sequências observa-se um

Tabela 4: Sequenciamento do fragmento de 1050 pb do gene *cpb* nas amostras estudadas mostrando SNPs encontrados em diferentes posições, em relação à sequência completa do gene (1326 pb).

Posição	345	402	406	438	439	495	498	515	516	582	583	593	613	656	665	695	702	758	772	827	831	854	897	917	1018	1048	1051
Lb padrão	T	G	A	A	T	C	G	C	T	G	G	T	G	C	C	C	A	T	C	G	G	A	T	G	A	C	G
Lg padrão	C	C	T	G	C	G	A	T	A	G	G	C	A	T	T	A	G	T	T	C	A	G	C	C	G	G	C
Grupo 1	C	G	A	A	T	C	G	C	T	C	T	T	G	C	C	C	A	T	C	C	G	A	T	C	G	C	G
Grupo 2	C	G	A	A	T	C	G	C	T	G	G	C	G	C	C	C	A	A	C	G	G	A	T	C	G	C	G
MG15 – Grupo 2*	C	G	A	A	T	C	G	C	T	C	T	T	G	C	C	C	A	T	C	C	G	A	T	C	G	C	G
MG16 – Grupo 2*	C	G	A	A	T	C	G	C	T	G	T	T	G	C	C	C	A	T	C	C	G	A	T	C	G	C	G

Em azul: nucleotídeos encontrados na sequência de *L. braziliensis*; em marrom: nucleotídeos encontrados na sequência de *L. guyanensis*; em verde: nucleotídeos diferentes dos encontrados nas sequências das cepas referência *L. braziliensis* e *L. guyanensis*; células divididas: nucleotídeos em comum para ambas as cepas referência; em cinza: posição da base reconhecida como sítio de restrição da enzima *TaqI* utilizada na técnica de PCR-RFLP deste alvo. *- Amostras provenientes da Reserva Indígena Xakriabá, que apresentam lesões típicas e perfil de restrição na técnica de RFLP indistinguível à cepa referência de *L. braziliensis*.

5.4 PCR RFLP do Espaçador Transcrito Interno 1 (ITS1)

A técnica de PCR-RFLP dirigida ao alvo da região não-codificante ITS1, utilizando a enzima *Hae*III, foi aplicada ao DNA extraído e purificado dos isolados estudados. Foi observado que as amostras do grupo 1 apresentaram perfil de restrição semelhante ao perfil de *L. guyanensis*, enquanto a maioria das amostras do grupo 2 apresentaram perfil semelhante ao de *L. braziliensis*. Duas amostras, MG19 e MG27 (pertencentes ao grupo 2), apresentaram um perfil de restrição variante ao das cepas referência utilizadas (figura 9).

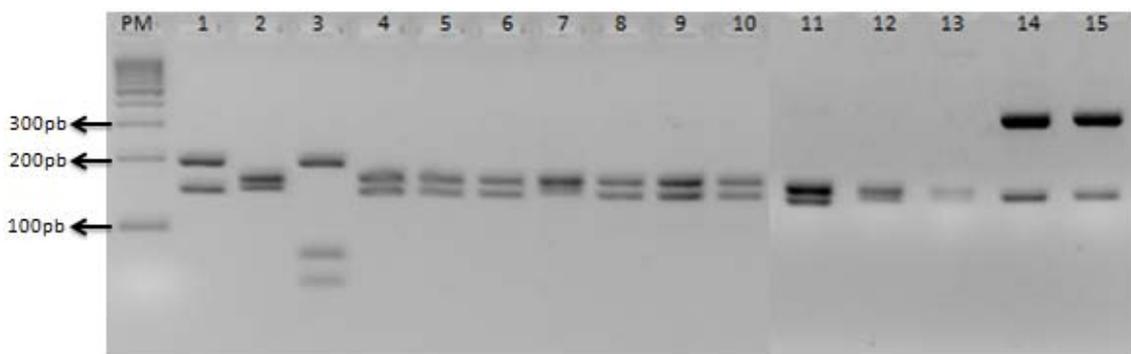


Figura 9: Resultado representativo do perfil de digestão utilizando a enzima *Hae*III dos fragmentos da região intergênica ITS1 amplificados a partir de amostras isoladas em cultura. PM – marcador de peso molecular de 100 pb; 1 – cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/75/PH8); 2 – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); 3 – cepa referência *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); 4 – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 5 a 10 – amostras provenientes do grupo amostral 1; 11 a 15 – amostras provenientes do grupo amostral 2; 14 – amostra MG19; 15: amostra MG27.

O fragmento gerado na PCR do ITS1 de 300-350pb foi sequenciado a fim de auxiliar na caracterização dos polimorfismos genéticos deste parasito. As sequências obtidas foram editadas, analisadas, e identificadas como *L. braziliensis* a partir da ferramenta online BLASTn. Entretanto, ao analisarmos os cromatogramas das sequências, as mesmas apresentaram baixo índice de qualidade, o que as tornaram inadequadas para serem utilizadas em passos posteriores, como pesquisa da presença de SNP's e análises filogenéticas.

5.5 PCR dirigida ao gene da 6-fosfoglico-desidrogenase (*6pgd*)

O DNA purificado obtido das promastigotas foi utilizado na metodologia de PCR dirigida ao alvo *6pgd*. O fragmento de 836 pb foi observado nas amostras utilizadas neste estudo (figura 10).

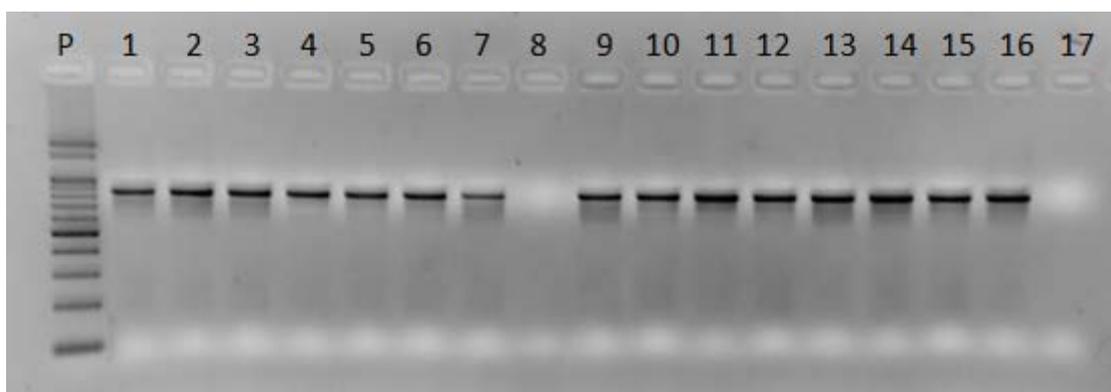


Figura 10: Resultado representativo da PCR-6pgd a partir de amostras isoladas em cultura. P – marcador de peso molecular de 100 pb; 1 – cepa referência *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); 2 – cepa referência *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 3 a 8 – amostras provenientes do grupo amostral 1; 9 a 16 – amostras provenientes do grupo amostral 2.

Os fragmentos de 836pb foram sequenciados a fim de investigar possíveis polimorfismos ao longo da sequência das amostras estudadas. Ao alinharmos as sequências, foram encontrados polimorfismos em 8 posições diferentes (tabela 6) que diferenciam entre as espécies referência *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Já as amostras deste estudo foram similares a *L. braziliensis* em três desses polimorfismos, entretanto nos outros três as amostras exibiram polimorfismos semelhantes a *L. guyanensis* (figura 11).

Tabela 5: posições dos SNP's encontrados na sequência do *6pgd*, em relação à sequência completa do gene (1440 pb)

Posição	250	291	331	436	581	656	685	935
Lb Padrão	G	G	C	T	G	T	G	T
Lg Padrão	A	A	T	G	C	C	A	C
Grupo 1	A	G	C	T	C	C	G	T
Grupo 2	A	G	C	T	C	C	G	C

Em azul: nucleotídeos correspondentes à sequência de *L. braziliensis* referência; em marrom: nucleotídeos correspondentes à sequência de *L. guyanensis* referência.

Tabela 6: Índice de polimorfismo genético dos marcadores *hsp70*, ITS1 e *Cpb* das amostras estudadas em relação a cepa referência de *L. braziliensis*.

Nome	Grupo Amostral	Macrorregião	<i>hsp70</i> -RFLP	<i>Cpb</i> -RFLP	ITS1-RFLP	Índice de polimorfismo
MHOM/BR/93/MG1	1	I	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/93/MG2	1	I	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/95/MG3	1	I	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/93/MG4	1	III	=Lb	=Lb	=Lb	0
MHOM/BR/94/MG5	1	III	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/98/MG6	1	III	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/98/MG7	1	IV	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/96/MG8	1	IV	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/98/MG9	1	IV	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/95/MG10	1	V	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/93/MG11	1	VII	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/93/MG12	1	VIII	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/95/MG13	1	VIII	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/95/MG14	1	VIII	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/09/MG15	2	VII	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/08/MG16	2	VII	=Lb	=Lb	≠Lb(=Lg)	0,3
MHOM/BR/08/MG17	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG18	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG19	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	*	1
MHOM/BR/09/MG20	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/10 /MG21	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG22	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG23	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG24	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG25	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG26	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	=Lb	0,7
MHOM/BR/08/MG27	2	VII	*	≠Lb(=Lg)	*	1

=Lb perfil de restrição indistinguível ao observado para a cepa referência *L. braziliensis*.

≠Lb(=Lg) perfil de restrição variante ao observado para a cepa referência e semelhante a *L. guyanensis*.

* perfil de restrição diferente de todas as cepas de referência utilizadas incluindo a *L. braziliensis*.

Índice de polimorfismo = número de perfis RFLP diferentes da cepa referência de *L. braziliensis*/número de alvos avaliados.

5.7 Associação de Variáveis Genéticas, Clínicas e Geográficas

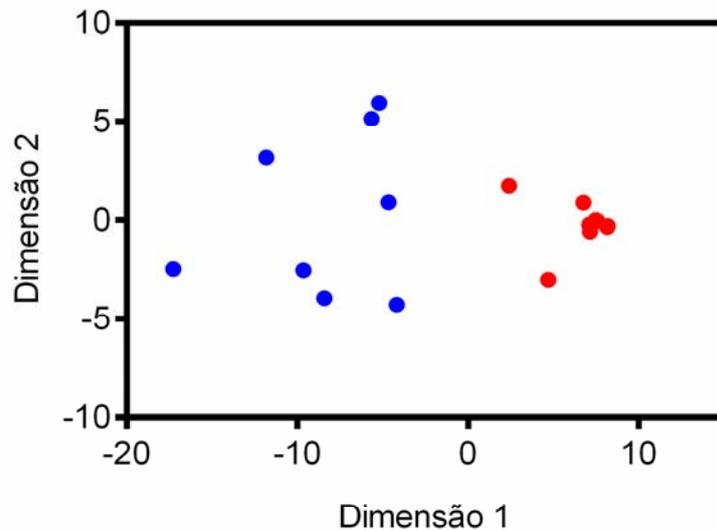
As sequências de *hsp70*, *cpb* e ITS1 foram utilizadas em análises de classificação por similaridade (figura 12). Nessas análises, foram utilizadas sequências senso e anti-senso, livres de espaçamento entre bases (gaps)

resultando em alinhamentos de alta qualidade e similaridade igual ou superior a 98% frente às sequências de *L. braziliensis* normalizadas a partir da sequência da amostra MG1. Além disso, não foram incluídas sequências dos outros alvos (g6pd e 6pgd) pela razão de o sequenciamento em algumas amostras ter sido insatisfatório para tais análises. Também foram utilizados dados de perfil de restrição por endonucleases para dois alvos gênicos, *hsp70* e *cpb*.

Na figura 12 A, está o agrupamento por partição (Hartigan et al., 1979) visualizado em um gráfico com duas dimensões, para 2 grupos pré-determinados pelo algoritmo cIValid (Brock et al., 2008). O grupo de cor azul (amostras do grupo 2 provenientes do município de São João das Missões e que possuem perfil de restrição variante à cepa referência *L. braziliensis*), apresentou maior divergência que o grupo de cor vermelha (amostras do grupo 1 provenientes de outras regiões do estado e apresentam perfil indistinguível à cepa referência), sugerindo uma maior variabilidade genética entre as amostras do grupo 2.

Na figura 12 B, apresenta-se o agrupamento hierárquico aglomerativo em relação às variáveis clínicas e geográficas. Foi observado que essa análise aglomerativa foi capaz de sustentar a análise particional (em A), onde os grupos representados pelas cores azul e vermelho foram concordantes com a divisão das amostras utilizada neste trabalho como grupo amostral 2 e 1, respectivamente. As classes identificadas são associadas a origem geográfica, onde os indicadores com maior variabilidade pertencem a uma única região (São João das Missões, na cor azul), enquanto os indicadores menos variáveis pertencem às demais macrorregiões do estado de Minas Gerais (representados pela cor vermelha). Além disso, foi observado que o grupo azul, que contém amostras do grupo amostral 2 possui uma boa associação com a presença de manifestações atípicas de LTA, enquanto o grupo vermelho que contém amostras do grupo 1 se associa a manifestações típicas da doença. Não foram observadas associações com o número de lesões.

A)



B)

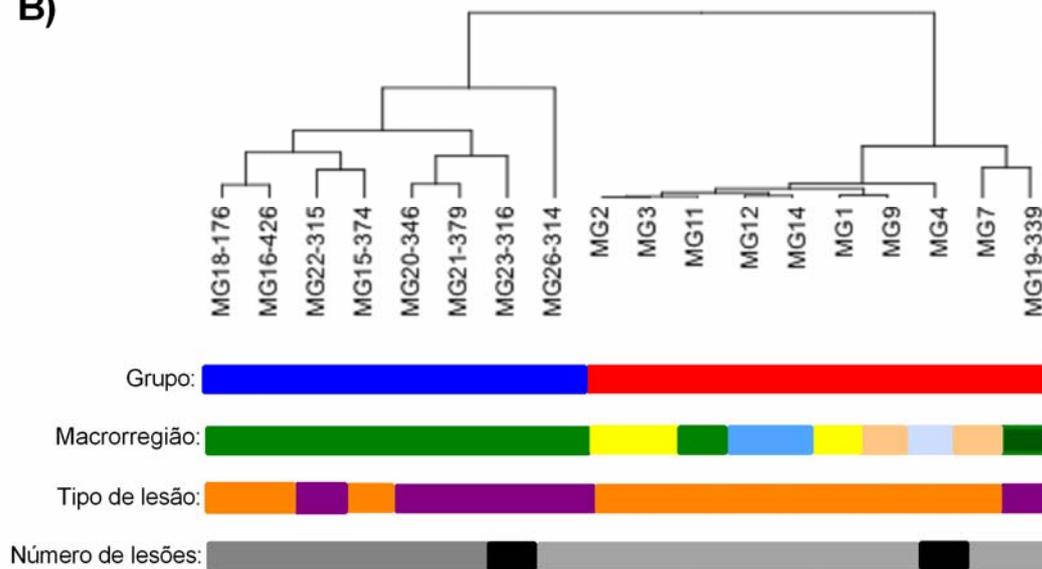


Figura 12: Nível de similaridade de amostras de *L. braziliensis* isoladas em Minas Gerais baseado na integração de perfil RFLP dos alvos *hsp70*, *ITS1* e *cpb* e sequenciamento parcial dos alvos *hsp70*, *cpb*, *ITS1* e *g6pd*. Item (A): Representação gráfica por escalonamento multidimensional (*multidimensional scaling* ou *MDS*) e agrupamento por partição utilizando o método de *k-means* para identificação de dois grupos (em vermelho, amostras do grupo 1 e em azul, amostras do grupo 2). Item (B): Agrupamento hierárquico aglomerativo pelo método de encadeamento completo (*complete linkage*). As amostras foram estratificadas conforme distribuição dos grupos pelo método de agrupamento por partição (azul e vermelho), distribuição geográfica (Macrorregião I: amarelo; III: azul claro; IV: marrom claro; VII: verde; VIII: azul), tipo de lesão (laranja: lesões típicas e púrpura: lesões atípicas) e número de lesões (cinza: 1 lesão e preto: 2 ou mais lesões).

Foi realizado o teste de razão de possibilidades (Odds Ratio - OR) (tabela 8) entre a probabilidade de associação entre os grupos amostrais 1 (em vermelho na figura 12 A) e 2 (em azul na figura 12 A) e as variáveis clínicas e epidemiológicas testadas no agrupamento hierárquico aglomerativo (figura 12 B). Observa-se que existe uma forte associação entre os grupos amostrais e a probabilidade de distribuição geográfica apenas na macrorregião VII (OR: >100). Ou seja, existe uma maior probabilidade de associação (>100) entre amostras do grupo 2 e a macrorregião VII. Também existe forte associação entre os grupos amostrais e a ocorrência de lesões atípicas (OR: 15). Isto quer dizer que há uma maior probabilidade de associação (=15) entre amostras do grupo 2 e a ocorrência de lesões atípicas. Não foi encontrada associação significativa entre os grupos amostrais e um maior número de lesões (OR: 1,28).

Tabela 7: Razão de possibilidades (*Odds ratio*) da distribuição geográfica entre as amostras do grupo azul e vermelho identificados pelo método de agrupamento por partição e hierárquico

Parâmetro	<i>Odds ratio</i>
Isolamento na macrorregião VII	>100
Ocorrência de lesões atípicas	15
Número de lesões maior que 1	1,28

5.8 Análises filogenéticas

Nas análises anteriores foi observado, no grupo 2, um baixo índice de similaridade em relação a cepa referência de *L. braziliensis* avaliando os perfis de restrição dos alvos *hsp70*, *cpb* e ITS1 (tabela 7). Com o objetivo de aprofundar a caracterização das amostras foram realizadas análises filogenéticas (máxima verossimilhança) utilizando sequências de outras espécies dos subgêneros *L.(Viannia)* e *L.(Leishmania)* recuperadas do banco de dados GenBank. Foram utilizadas as amostras que apresentaram sequências satisfatórias utilizando o HKY (Hasegawa, Kishino & Yano) como modelo de substituição no software PhyML.

A árvore concatenada gerada com estes dados está mostrada na figura 13. A análise da topologia confirma a separação das espécies nos dois subgêneros, sendo que as amostras dos grupos 1 e 2 formam um clado com a

referência de *L. braziliensis* suportado por 100% na estimativa de confiança (Likelihood Ratio Test - aLRT). Dentro do clado das *L. braziliensis* dois grupos foram formados (aLRt de 99.2%) que correspondem aos grupos amostrais 1 e 2. É interessante observar que as amostras do grupo 1 pertencem ao mesmo clado da cepa referência de *L. braziliensis*. O clado das amostras do grupo 2 apresentam mais ramificações, o que indica maior diversidade entre elas, também observado nas análises de similaridade.

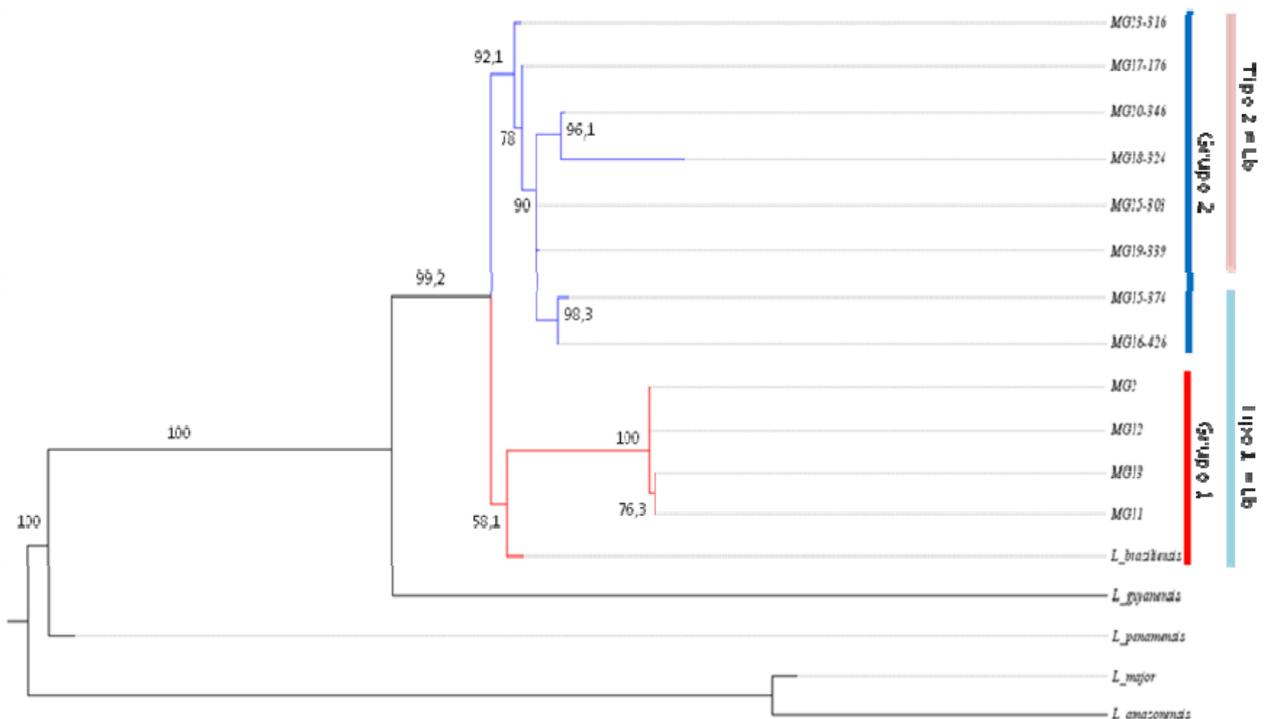


Figura 13: Árvore concatenada utilizando seqüências dos marcadores *6pgd*, *hsp70*, *g6pd* e *cpb*, em conjunto de seqüências de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* referência e seqüências de *L. panamensis*, *L. major* e *L. amazonensis* recuperadas do banco de dados GenBank.

Com o objetivo de focar a análise nos grupos amostrais compostos pelos isolados de *L. braziliensis*, foi realizada nova análise permanecendo apenas as cepas referência de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* como *outgroup* (figura 14). Pode-se observar que a formação dos clados distintos entre os grupos amostrais 1 e 2 se manteve de acordo com a árvore apresentada na figura 13.

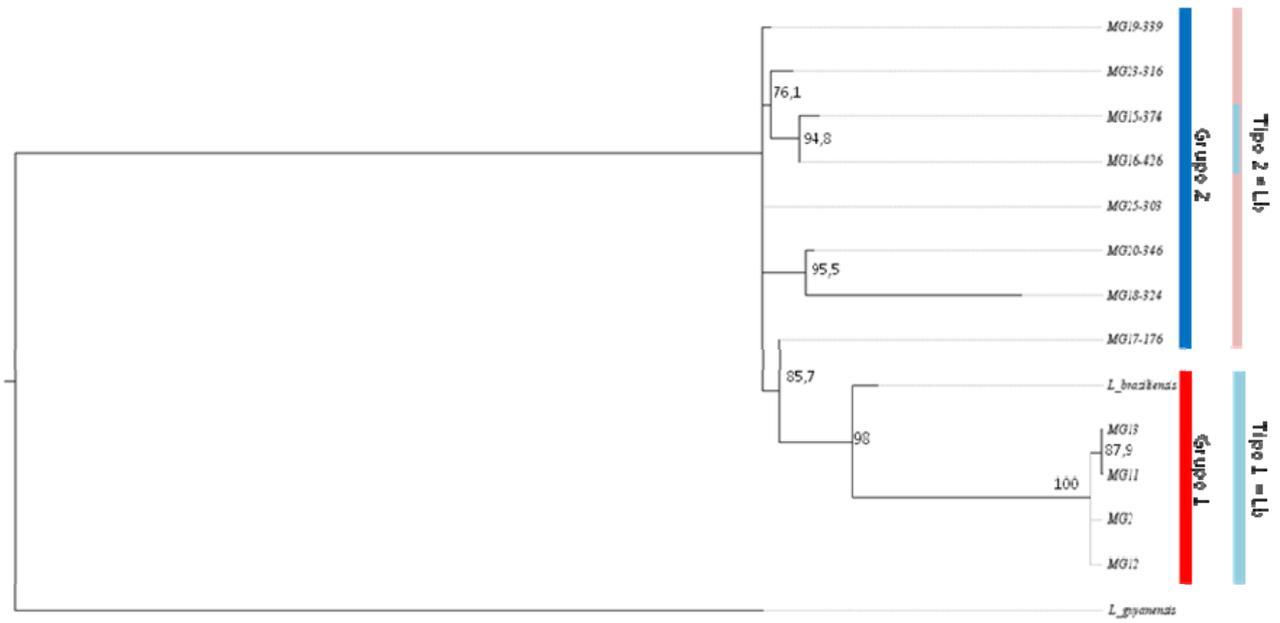


Figura 14: Árvore concatenada utilizando seqüências dos marcadores *6pgd*, *hsp70*, *g6pd* e *Cpb*, em conjunto de seqüências de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* referência.

6 Discussão

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que podem acometer o homem e outros hospedeiros mamíferos quando estes entram em contato com fêmeas de flebotomíneos infectadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Considerando os elevados níveis de heterogeneidade destes organismos (Restrepo et al, 2013), é necessária a correta identificação em regiões onde diferentes espécies podem ocorrer em simpatria, uma vez que os desfechos clínicos são delineados tendo em vista a sintomatologia e a espécie infectante (Oliveira et al., 2013). Além disso, a correta identificação do agente infeccioso é importante para distinguir as espécies de *Leishmania* de outros tripanossomatídeos inferiores dos gêneros *Leptomonas* e *Herpetomonas* que são parasitos monoxênicos de insetos, os quais já foram reportados associados a LV no sul da Europa e na Índia (Schonian et al., 2010; Tsokana et al., 2014). O conhecimento das espécies de *Leishmania* que acometem os seres humanos e outros hospedeiros contribui para estudos clínicos e epidemiológicos.

Minas Gerais é o estado da região sudeste do Brasil que apresenta o maior número de casos de LTA, causados em sua grande maioria por protozoários da espécie *L. braziliensis* (Passos et al, 1999; Gontijo et al, 2002). Este protozoário apresenta uma alta diversidade genética, sendo esta uma das principais vantagens para o sucesso da infecção nos hospedeiros (Marco et al., 2014). O estudo da diversidade genética de amostras de *L. braziliensis*, bem como estudos populacionais, tem despertado o interesse de vários pesquisadores com o intuito de investigar as possíveis associações entre as características genéticas deste parasito com a distribuição geográfica e manifestações clínicas da doença (Queiroz et al, 2012; Marco et al, 2014).

Em estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, foi investigada a variabilidade genética em amostras de *L. braziliensis* provenientes de diferentes focos de LTA de Minas Gerais bem como de outras regiões do Brasil utilizando as metodologias de RAPD e SSR-PCR (Gontijo, 2000; Rocha Lima, 2010). Recentemente, em estudo epidemiológico realizado na Terra Indígena Xakriabá, localizada no norte do estado de Minas Gerais,

foram observadas manifestações clínicas de LTA diferentes do classicamente descrito para infecções com esta espécie (Freire, 2011; Quaresma, 2011). Em contrapartida, nas outras áreas do estado, haviam sido observadas apresentações da úlcera típica da LTA (Passos et al, 1993; Gontijo et al, 2002).

Estas observações clínicas associadas ao encontro de perfil de restrição (PCR RFLP *hsp70*) variante para isolados de *L. braziliensis* (Quaresma, 2011) apontaram para a necessidade de se utilizar outras metodologias e alvos com o intuito de aprofundar o conhecimento acerca destes parasitos. Assim, neste estudo foram utilizadas metodologias moleculares capazes de investigar os polimorfismos genéticos e caracterizar amostras de *L. braziliensis* isoladas de casos humanos de diferentes regiões endêmicas do estado de Minas Gerais.

6.1 Identificação específica de *Leishmania braziliensis*

A distinção entre as espécies de *Leishmania* provenientes de áreas endêmicas onde ocorrem simultaneamente as diferentes manifestações clínicas da doença é crucial para se proceder ao diagnóstico correto. Além disso, essa identificação específica tem impacto na escolha do tratamento a ser instituído bem como na implementação das medidas de prevenção e controle da transmissão.

A técnica de PCR vem ganhando destaque dentre os métodos de diagnóstico molecular disponíveis para as leishmanioses, dirigida às regiões codificantes e não codificantes tanto no DNA genômico como no DNA do cinetoplasto (kDNA) (Bensoussan et al, 2006; Reithinger & Dujardin, 2007). Existem vários iniciadores disponíveis que podem ser específicos para o gênero, subgênero ou espécie. Os alvos utilizados para identificação da espécie de *Leishmania* infectante podem incluir os genes do citocromo B (Kato et al., 2005), sequências repetitivas no DNA nuclear (Piarroux et al., 1993), sequências do gene 7SL do RNA (Zelasny et al., 2005). Sequências gênicas específicas também podem identificar a espécie, como o gene que codifica a G6PD (Victoir et al., 1998; Castilho et al., 2003), proteínas de choque térmico (Garcia et al., 2004; Fraga et al., 2010, Graça et al., 2004), genes da gp63 (Victoir et al., 1998; Garcia et al., 2005; Hide et al., 2006; Oshaghi et al., 2009;

Quispe-Tintaya et al., 2005; Mauricio et al., 2001), espaçadores transcritos internos do rDNA ribossomal (ITS) (Cupolillo et al., 1995; Schonian et al., 2003; Nasereddin et al., 2008), o gene do mini-exon (Marfurt et al., 2003a, 2003b), minicírculos do cinetoplasto (Morales et al., 2001; Chicharro et al., 2002; Cortes et al., 2006; Laurent et al., 2007; Noyes et al., 1998), e também fragmentos de genes das vias glicolíticas, como *6pgd*, *mpi*, *icd* (Boité et al., 2012), que por sua vez também codificam enzimas analisadas pela técnica padrão de identificação de *Leishmania*, MLEE.

Sabe-se que para a descrição ou identificação de espécies dentro do subgênero *Viannia* é interessante a utilização de técnicas dirigidas às regiões codificantes do genoma, uma vez que existem altas taxas de divergência molecular nas regiões não-transcritas por não estarem sujeitas à pressão seletiva externa ao parasito (Castilho et al., 2003). Além disso, a sensibilidade dos métodos está relacionada com o número de cópias da região a ser amplificada no genoma do organismo de interesse (Bensoussan et al., 2006; Volpini et al., 2003). Assim, ensaios de PCR utilizando o kDNA como alvo são considerados os de maior sensibilidade para o diagnóstico das leishmanioses, uma vez que existem por volta de 10.000 minicírculos por parasito. Entretanto, esses ensaios perdem em especificidade, pois só conseguem identificar no nível de gênero ou subgênero, ou requerem iniciadores diversos para cada espécie de *Leishmania* (Anders et al., 2002; Desjeux, 2001; Bensoussan et al., 2006). Desta forma, neste estudo foram utilizados iniciadores específicos para *L. braziliensis* com o intuito de confirmar a identificação específica das amostras a serem estudadas que haviam sido previamente identificadas por MLEE.

A enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (*g6pdh*) é uma proteína presente em todos os tipos de células eucarióticas e bactérias, catalisando a primeira reação do ciclo bioquímico das pentoses produzindo NADPH, além de ser uma enzima usada na técnica de MLEE. Castilho et al (2003) desenvolveram ensaios de PCR dirigidos a esse alvo utilizando iniciadores variados, com a possibilidade de amplificar tanto fragmentos dos subgêneros *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)*, como também específicos para *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, além de *L. lainsoni*, *L. panamensis*, *L. naiffi* e *L. shawi*. Em nosso

estudo utilizamos os iniciadores que distinguem a espécie *L. braziliensis* das outras espécies do subgênero *L. (Viannia)*. Estes iniciadores foram eficientes na amplificação do fragmento diagnóstico de 234 pb nas amostras de ambos os grupos estudados confirmando a identificação das amostras como *L. braziliensis* (figura 4).

Esses iniciadores já vêm sendo utilizados para a identificação específica dessa espécie. Um estudo realizado na região amazônica do estado do Pará utilizou essa metodologia para identificar pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (Garcez et al., 2009). Outro estudo utilizou esse mesmo alvo aplicado em ensaios de qPCR (*Real Time-PCR*) quantificando a carga parasitária e diferenciando a *L. braziliensis* de outras espécies do mesmo gênero e subgênero (Castilho et al., 2008). Apesar de ser um gene de cópia única no DNA de *Leishmania*, o ensaio utilizado em nosso estudo (Castilho et al., 2003) apresentou elevada taxa de sensibilidade e especificidade para *L. braziliensis*, comparáveis aos ensaios para o kDNA (Jara et al., 2013).

6.2 Características genéticas dos isolados

As amostras utilizadas neste estudo são provenientes de pacientes apresentando tanto manifestações clínicas típicas quanto lesões atípicas de LC e foram divididas em dois grupos hipotéticos utilizando como critérios o tipo de lesão e o padrão de restrição observado na PCR RFLP *hsp70*.

Conhecer as relações evolucionárias entre os organismos pode contribuir para uma correta classificação dentro do gênero *Leishmania*, além de gerar informações biológicas de cepas estreitamente relacionadas. Essas características devem ser exploradas a partir da análise de genes independentes que estão expostos a diferentes pressões evolutivas, uma vez que a história de um gene pode ser diferente da história da espécie em que reside (Fraga et al., 2010), reduzindo assim análises equivocadas. Vários genes são candidatos para essas análises, como por exemplo, o *hsp70*, *cpb*, *g6pd*, *6gpd* e ITS1 utilizados neste estudo.

A metodologia considerada padrão-ouro para a identificação de espécies de *Leishmania* é a análise por MLEE (Rioux et al., 1990; Bañuls et al., 2007).

Porém este método apresenta uma série de desvantagens, principalmente a observação de um mesmo zimodema que pode incluir genótipos distintos (Mauricio et al., 2006; Alam et al., 2009) e diferenças na motilidade por heteroziguidade em apenas um aminoácido (Mauricio et al., 2006; Guerbouj et al., 2014). Além disso, existe a necessidade de se isolar e cultivar os parasitos. Em nosso estudo não foram observadas diferenças de motilidade nas isoenzimas nas amostras pertencentes aos dois grupos sendo todas incluídas no zimodema IOC Z-27 correspondente ao da cepa referência de *L. braziliensis* (M2903). Portanto, os dois grupos com genótipos diferentes observados em estudo anterior e relacionados aos perfis obtidos na PCR RFLP do *hsp70* não foram contemplados pela análise de isoenzimas.

Atualmente as técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vêm sendo utilizadas como métodos alternativos na identificação de espécies de *Leishmania*, uma vez que podem ser aplicadas diretamente em amostra clínica, otimizando tempo e custos, e com altos índices de sensibilidade e especificidade. Adicionalmente, a técnica de PCR é utilizada em vários laboratórios de pesquisa no mundo, o que facilita o emprego e o desenvolvimento de ensaios otimizados baseados nesta tecnologia.

Muitas ferramentas de identificação de *Leishmania* usam tanto a PCR dirigidas a alvos específicos (Hide & Bañuls, 2006; Marcussi et al., 2008; Berzunza-Cruz et al., 2009) quanto processos pós-amplificação baseados no polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), onde os fragmentos amplificados são submetidos ao tratamento com endonucleases de restrição. O perfil de digestão observado nas amostras pode distinguir as espécies de *Leishmania* (Graça et al, 2012; Cruz-Barrera et al, 2015).

Neste estudo foram empregadas várias metodologias utilizando diferentes marcadores genéticos. Uma das técnicas utilizadas foi a PCR-RFLP dirigida ao alvo *hsp70*. Esta abordagem, descrita por Garcia et al (2004), tem como alvo parte do gene que codifica a proteína de choque térmico de 70 kilodáltons. Essas proteínas são agrupadas em famílias de acordo com sua massa molecular (Sato et al., 1995), e são expressas como um mecanismo de defesa ao estresse físico e/ou químico, além do aumento de temperatura e pico febril, sendo assim caracterizadas como proteínas antigênicas importantes e

essenciais à sobrevivência do parasito (Folgueira et al, 2007). São também chamadas de chaperoninas, auxiliando no correto dobramento de proteínas produzidas e no redobramento e estabilização de proteínas desnaturadas em condições de estresse, além de auxiliar no seu direcionamento intracelular (Craig et al., 1991; Ellis et al., 1996; Young et al., 2004; Fraga et al., 2010). Em *L. braziliensis*, seus genes se localizam no cromossomo 28 e seu mRNA é preferencialmente expresso frente à estresse por elevação temperatura (Folgueira et al., 2007).

O ensaio de PCR-RFLP do *hsp70* vem sendo bastante utilizado, e polimorfismos na sua sequência permitem a distinção entre variadas espécies de *Leishmania* tanto do Novo Mundo (Garcia et al., 2007; Fraga et al., 2010; Montalvo Alvares et al., 2010; Quaresma, 2012) quanto do Velho Mundo (Fraga et al., 2010; Montalvo et al., 2010) ao se utilizar a enzima de restrição *HaeIII*. A técnica não tem a capacidade de diferenciar *L. braziliensis* de *L. peruviana* e *L. mexicana* de *L. amazonensis*, entretanto isso não inviabiliza sua utilização com amostras provenientes de focos brasileiros uma vez que as espécies *L. peruviana* e *L. mexicana*, até o momento, não circulam no Brasil. Observa-se que a espécie *L. braziliensis* apresenta, neste ensaio, um perfil único e distinguível de outras espécies que ocorrem no Brasil, sendo essa espécie o foco de nosso estudo.

Os resultados obtidos neste estudo com a técnica PCR-RFLP do *hsp70* mostraram que as amostras utilizadas apresentaram dois perfis de restrição distintos, apesar de terem sido identificadas por outras metodologias como pertencentes à espécie *L. braziliensis*. As amostras do grupo 1 exibiram perfil de restrição indistinguível ao da cepa referência de *L. braziliensis* enquanto as amostras do grupo 2 apresentaram predominantemente um perfil de restrição variante do esperado para a cepa referência (figura 5 e tabela 7). As exceções no grupo 2 foram as amostras MG15 e MG16 que mostraram um perfil de restrição indistinguível ao da cepa referência.

Apesar de existirem muitos trabalhos que identificam *L. braziliensis* por essa técnica, em nenhum foi observado o padrão de restrição que obtivemos. Garcia et al (2004), ao padronizarem a técnica de PCR-RFLP empregaram a eletroforese capilar em microchips tanto com as amostras de DNA provenientes

de cultura quanto de espécimes clínicos, observando o perfil de restrição característico para *L. braziliensis*. Garcia et al (2007) também utilizaram este ensaio diretamente em amostras clínicas de pacientes da Bolívia e Colômbia, observando somente perfis de restrição indistinguíveis às cepas referências de *L. braziliensis*. Montalvo et al (2010) realizaram análises *in silico* do perfil de restrição do *hsp70* com a enzima *HaeIII* para *L. braziliensis*, e observaram seu padrão de restrição semelhante ao de *L. peruviana*, indistinguível ao restante das espécies, confirmando por eletroforese em gel de agarose. Mais uma vez, não se observou perfis atípicos ou que se assemelhassem aos obtidos no presente trabalho. Os autores inclusive sugerem a PCR-RFLP do *hsp70* como uma ferramenta universal para discriminação das espécies de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo. Os achados que mais se aproximam dos resultados observados em nosso estudo mostram a associação entre genótipos distintos de RAPD com manifestações clínicas atípicas de LTA em Corte de Pedra, Bahia (Schriefer et al., 2004).

Os achados do nosso estudo mostram que, além de todas as vantagens supracitadas da metodologia PCR-RFLP do *hsp70*, ela também é capaz de identificar cepas geneticamente distintas a partir do seu perfil de restrição.

Para tentar compreender os perfis variantes de *L. braziliensis* com a PCR-RFLP *hsp70* que observamos em algumas amostras, os fragmentos gerados foram sequenciados e, quando comparados com as sequencias de *L. braziliensis* padrão (tabela 2), foram detectados SNP's ao longo do fragmento gênico. Nas amostras variantes foi identificado SNP no sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição *HaeIII*, que reconhece GGCC, com a substituição do nucleotídeo **G** da posição 408 por **A**. Este polimorfismo ocasionou o aparecimento de uma banda maior, de 625 pb, que é resultante da não-clivagem em duas bandas menores de 287 e 338 pb, observadas no perfil da cepa referência *L. braziliensis* (figura 5, figura 6 e tabela 4).

Outro alvo utilizado neste trabalho com o intuito de elucidar as características genéticas das amostras é a região gênica que codifica as cisteínas peptidases (CP), especificamente a *Cpb*. Essas proteínas são amplamente distribuídas em protozoários da família *Trypanosomatidae*, e estão envolvidas na nutrição, ciclo de vida e na diferenciação morfológica destes

parasitos (Van der Auwera & Dujardin, 2015). A maioria dos conhecimentos atuais sobre a família das CP está relacionada à espécie *L. major*, graças ao sequenciamento completo de seu genoma (ver <http://www.genedb.org/>). Sabe-se que existe um total de 65 CP agrupadas em 4 clans e 13 famílias (Mottram et al., 2004) e que são proteínas fortemente relacionadas à virulência de cepas de *Leishmania*. São cruciais nas interações parasito-hospedeiro, tendo funções de facilitar a entrada da forma promastigota nos macrófagos (Mottram et al., 1996; 1997), além de suprimir a resposta Th1 degradando os componentes de sinalização do sistema imune inato (Cameron et al., 2004; McKerrow et al., 2006). As formas maduras dessas proteases se localizam, nas formas amastigotas, em grandes lisossomos, chamados megassomos. Nas formas promastigotas acredita-se que se localizam em lisossomos associados a túbulos multi vesiculares, sendo direcionada por elementos sequenciais em seu pró-domínio (Mottram et al., 2004). A região gênica que codifica as CP vem ganhando destaque na comunidade científica, uma vez que os genes estão localizados *in tandem* e estão propensos a rearranjos frequentes, levando a polimorfismos que podem constituir uma vantagem seletiva frente às pressões externas dos hospedeiros (Gupta et al., 1999; Victoir et al., 2002; Tintaya et al., 2004). Apesar dos avanços em relação ao conhecimento das CPs, pouco se conhece sobre estas enzimas em *L. braziliensis*. Recentemente, um gene de *Cpb* foi clonado e expresso revelando diferenças na utilização de substratos entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Lanfranco et al, 2008).

A metodologia desenvolvida para o alvo *Cpb* tem a capacidade de distinguir a espécie *L. braziliensis* de outras do mesmo subgênero (Garcia et al, 2005; Montalvo et al, 2008) e é utilizada nos estudos clínicos e epidemiológicos das leishmanioses. Montalvo et al (2008) otimizaram a reação para as espécies neotropicais, desenvolvendo um passo pós-amplificação com digestão via enzimas de restrição. Assim, a técnica permite distinguir, com a endonuclease de restrição *TaqI*, a espécie *L. braziliensis* de outras espécies do mesmo subgênero, onde esta apresenta um perfil de restrição distinto daquele apresentado pelas outras espécies *L. peruviana*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* que apresentam um perfil distinto e único. Nesta reação, nenhuma amplificação é observada para as espécies *L. lainsoni*, *L. infantum*, *L. naiffi*, *L.*

garnhami, *L. mexicana* e *L. amazonensis* provavelmente pela variação dos sítios de anelamento dos iniciadores nessas espécies (Garcia et al., 2005).

Quando a técnica PCR-RFLP do *Cpb* foi aplicada nas amostras deste estudo, pudemos observar dois desfechos: 1) as amostras do grupo 1, isoladas de lesões típicas de LTA, apresentaram um perfil de restrição indistinguível ao da cepa referência de *L. braziliensis*; 2) a maioria das amostras do grupo 2, oriundas da macrorregião VII, região norte de Minas Gerais (Terra Indígena Xakriabá) e predominantemente isoladas de manifestações atípicas da doença, mostraram um perfil variante ao esperado para a espécie *L. braziliensis*, como observado na figura 7. Apenas as amostras MG15 e MG16 (grupo 2) exibiram perfil de restrição indistinguível ao observado na cepa referência.

Estudos observando variações nos padrões de restrição empregando o *Cpb* já foram descritos. Garcia e colaboradores (2005), ao utilizarem o *Cpb* em associação a outros alvos moleculares estabeleceram um link entre polimorfismos genéticos e clínicos em isolados de *L. braziliensis*. A técnica também foi utilizada na Argélia por Seridi et al (2008), permitindo encontrar genótipos variados de *L. infantum* em associação com a origem geográfica. Tintaya e colaboradores (2004) ao analisarem cepas do complexo *L. donovani* relataram diferenças, classificando-as de acordo com a origem geográfica, tipando os parasitos diretamente de amostras clínicas.

Entretanto, nossos resultados diferem do observado por Montalvo e colaboradores (2008). Os autores não encontraram diferenças ao estudarem cepas distintas de uma mesma espécie, onde *L. braziliensis* obteve um perfil distinguível das demais espécies, enquanto as demais espécies apresentaram um perfil comum. Entretanto, em nosso estudo as amostras de *L. braziliensis* apresentaram perfis distintos, de acordo com a distribuição por macrorregiões.

Nossos achados podem ser explicados pelo alinhamento das sequências de 1050 pb obtidas na PCR *cpb*. Foi detectado um SNP na posição 479 (figura 8 e tabela 5), que corresponde ao sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição *TaqI* (TCGA). A mutação substituiu C por T, não permitindo o reconhecimento do sítio pela enzima que foi incapaz de clivar e consequentemente gerando o perfil de restrição variante predominantemente encontrado nas amostras do grupo 2 (figura 7). Esse perfil variante para *L.*

braziliensis é observado em outras espécies do subgênero *L. (Viannia)* uma vez que o sítio de reconhecimento TCGA da enzima *TaqI* também está ausente nestas outras espécies.

A necessidade de iniciadores variados para cada espécie associada ao fato de ser um gene presente em multicópias, afetam a especificidade da técnica, uma vez que pode haver variações nas sequências subjacentes aos iniciadores (Guerbouj et al., 2014). Entretanto, por sua natureza polimórfica e presença em multicópias, os genes que codificam as CP são interessantes para as análises populacionais. Além disso são codificadores de proteínas antigênicas importantes à sobrevivência do parasito uma vez que fazem parte do processo de interação parasito-hospedeiro (Chaouch et al, 2013).

Além dos métodos moleculares dirigidos a regiões codificantes, também foi realizada a PCR-RFLP do ITS1, uma região intergênica não-codificante do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal. Desde o trabalho de Cupolillo et al (1995), os espaçadores transcritos internos dos genes ribossomais vem sendo aplicados tanto em cepas do Velho Mundo (Chicharro et al, 2002; El Tai et al., 2001; Nimri et al., 2003 Schonian et al., 2000; 2001a; 2001b; 2003), como em cepas de *L. braziliensis* do Novo Mundo (Berzunza-Cruz et al., 2002; Cupolillo et al., 2003). A região do ITS1 é conservada o bastante para ser utilizada como alvo para técnicas de PCR, e apresenta polimorfismos o suficiente para facilitar a tipagem de espécies.

Os resultados obtidos com a PCR-RFLP do ITS1 mostraram que as amostras do grupo 1 em conjunto com as amostras MG15 e MG16 (grupo 2) apresentaram perfil de restrição semelhante ao observado para *L. guyanensis*, enquanto a maioria das amostras do grupo 2 apresentaram perfil de restrição semelhante ao observado para a espécie *L. braziliensis*. Além disso, as amostras MG19 e MG27 (grupo 2) apresentaram um perfil de restrição totalmente variante ao observado nas cepas referência (figura 9 e tabela 7). A digestão dos amplicons empregando a enzima de restrição *HaeIII* tem demonstrado ser capaz de distinguir espécies de *Leishmania* próximas, mas no caso da *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, esta distinção somente é possível através de sequenciamento (Schonian et al, 2003). Entretanto, essa limitação da técnica não invalida os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez

que o sequenciamento desses fragmentos permitiu a diferenciação das espécies. Ao realizarmos o sequenciamento dos fragmentos provenientes da PCR ITS1, todas as amostras apresentaram índice de similaridade com *L. braziliensis* igual ou superior a 98%, confirmando a identificação específica. Este marcador não demonstrou ser eficiente em estudos filogenéticos possivelmente por ser intron passível de acumular mutações silenciosas, além das sequências obtidas apresentarem um valor baixo de qualidade. Devido a este fato, não foi possível avaliar possíveis polimorfismos na sequência analisada que pudessem esclarecer o motivo de observarmos perfis semelhantes a *L. guyanensis* além do aparecimento de perfis totalmente diferentes das cepas referência (tabela 7).

O perfil de restrição variante apresentado pelas cepas MG19 e MG27 pode ser devido a ocorrência de uma digestão parcial pela endonuclease *HaeIII* na técnica de PCR-RFLP, uma vez que os perfis apresentaram uma banda correspondente a 300pb (figura 9), semelhante à observada na amplificação. De acordo com Schonian et al (2003) o tamanho do fragmento amplificado pelos iniciadores utilizados pode variar de tamanho (300-350pb), uma vez que se trata de uma região não-codificante e passível de acumular mutações, inserções e deleções que não serão expressas pelo sistema de síntese de proteínas e, portanto, não serão prejudiciais ao parasito.

Em relação aos resultados obtidos para o fragmento do gene *6pgd*, observamos que este marcador é bastante conservado e pouco polimórfico nas cepas estudadas. O fragmento de 836pb foi detectado em todas as amostras estudadas (figura 10) e contendo poucos SNP's (figura 11 e tabela 6), sendo que em três sítios as mutações observadas correspondem à sequência da espécie *L. guyanensis*.

Uma das hipóteses de nosso estudo é que nossas amostras são geneticamente distintas, mas pertencentes à mesma espécie *L. braziliensis*. A classificação hipotética das amostras nos grupos 1 e 2 deste trabalho, se baseou nos resultados anteriores de PCR-RFLP *hsp70* com as amostras da Terra Indígena Xakriabá. Quaresma (2011) detectou polimorfismo de base única no perfil de restrição e que foi associado com a característica atípica das lesões. As análises dos perfis de restrição e das sequências dos diferentes

alvos utilizados confirmaram esta hipótese que foi reforçada com a análise filogenética das amostras bem como a avaliação conjunta dos dados moleculares e das características dos indivíduos utilizando análises de agrupamento. A discussão dos dados gerados com estas análises será apresentada no tópico a seguir.

6.3 Variabilidade Genética, Origem Geográfica e Manifestações Clínicas

As leishmanioses são doenças de ampla distribuição mundial e com maior prevalência nos países subtropicais e tropicais. A espécie *L. braziliensis* é a mais prevalente no Brasil, sendo agente causador da LTA e possui um grande espectro de manifestações clínicas, como a LC caracterizada por lesões de fundo granuloso e bordas elevadas; LM com envolvimento de mucosas, principalmente a mucosa nasal; e LD, com a presença de 10 ou mais pápulas acneiformes e lesões ulceradas, em duas ou mais partes do corpo (Marsden, 1985; Llanos-Cuentas et al., 1984; Turetz et al., 2002; Guimarães et al., 2009). O aparecimento desse espectro de manifestações clínicas envolve tanto características do hospedeiro, como seu estado imunológico e nutricional, quanto características do parasito, como sua variabilidade genotípica e virulência.

Entretanto, apesar dessas manifestações já estarem bem descritas e caracterizadas na literatura científica, existem relatos de manifestações atípicas da doença (Guimarães et al., 2009; Baptista et al., 2009; Bañuls et al., 2011; Quaresma, 2012; Nicola et al., 2014) e que podem se apresentar como pápulas, placas, nódulos verrucosos, lesões vegetativas e lesões lupóides. O aparecimento dessas manifestações atípicas pode estar associado tanto a variáveis genéticas do parasito, quanto a variáveis geográficas, como a distribuição de um parasito com determinado genótipo em uma região.

Algumas ferramentas da bioestatística foram desenvolvidas na tentativa de classificar dados em grupos distintos de acordo com diferentes classes, de modo que as associações possam ter algum sentido (Tryon, 1939). No presente estudo, foram utilizados algoritmos estatísticos de agrupamento por similaridade que integram dados de diferentes técnicas, como sequências

obtidas nas técnicas de PCR e os padrões de restrição obtidos pela RFLP, com o intuito de agrupar as amostras dos grupos amostrais em subgrupos com características comuns que as distinguem entre si. Essas análises hierárquicas e particionais são importantes por avaliarem a divergência entre as amostras baseado em vários marcadores diferentes, onde cada um possui o mesmo peso na classificação das amostras. Neste trabalho, dois tipos de agrupamento foram utilizados para garantir que o resultado fosse confirmado pelo emprego de mais de um método.

Nas análises de agrupamento por partição baseado no método *k-means*, foi possível identificar dois grupos conforme esperado considerando a origem geográfica das amostras e as características clínicas das lesões (figura 12, item A). As amostras MG15 e MG16, que possuem perfis de restrição indistinguíveis ao da cepa referência *L. braziliensis*, se agruparam com as amostras que apresentaram perfis variantes, em contrapartida a amostra MG19 possui perfis variantes de restrição e está agrupada com as amostras indistinguíveis a *L. braziliensis* referência.

Embora o padrão de restrição (*hsp70*, *Cpb* e *ITS1*) observado para as amostras MG15, MG16 e MG19 seja diferente do observado nas demais amostras com as quais se agruparam, para outros marcadores e sequências analisadas, as mesmas possuem maior similaridade às outras amostras dos agrupamentos em que foram incluídas. Essa análise de agrupamento é importante porque utiliza informações sobre vários marcadores gerando uma similaridade média entre as amostras, sem considerar aspectos relacionados à filogenia. Além disso, observa-se que as amostras do grupo 2 (representadas pela cor azul), oriundas de lesões atípicas de LTA apresentaram uma maior heterogeneidade na distribuição espacial, (figura 12, item A), sugerindo uma maior diversidade genotípica em relação às amostras do grupo 1 (representadas pela cor vermelha), que são oriundas de manifestações típicas da doença.

O agrupamento hierárquico aglomerativo é utilizado para agrupar os dados em classes ou subgrupos sucessivamente maiores pela análise de variáveis de similaridade entre os grupos amostrais. Pode ser observado que esta análise (figura 12, item B) suportou a divisão das amostras nas mesmas

classes identificadas pelo método de partição (figura 12, item A), uma vez que os grupos se mantiveram segregados de forma semelhante.

A metodologia de agrupamento hierárquico já vem sendo utilizada para agrupar dados em classes que apresentam similaridades, por exemplo, auxiliando no agrupamento de zimodemas de *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* circulantes na Colômbia (Saravia et al., 1998). Além disso, tais análises hierárquicas também foram utilizadas na classificação geral de cepas de *Leishmania* do Novo Mundo, ao considerar cada zimodema como um dado individual para agrupamento (Cupolillo et al., 1994).

O agrupamento hierárquico apontou associações interessantes entre as amostras do grupo 2, que na maioria apresentam perfis de restrição variantes à cepa referência *L. braziliensis*, se agrupam em relação a origem geográfica (macrorregião VII – cor verde). Em contrapartida, as amostras do grupo 1 que são oriundas de manifestações típicas de LTA estão associadas às outras macrorregiões do estado (representadas pelas cores amarelo, azul claro, marrom claro e azul). Vale ressaltar que a única amostra a não seguir este padrão foi a MG19, onde apesar de originalmente estar incluída no grupo 2 nessas análises, se agrupou com o grupo 1. É interessante observar que no fenograma (figura 12, item B) essa amostra apresentou maior distância em relação às outras, em um mesmo ramo da cepa MG7, que é proveniente do município de Medina, o mais próximo da Terra Indígena Xakriabá localizada em São João das Missões. Estes resultados sugerem que a ocorrência das cepas de *L. braziliensis* geneticamente variantes parece estar restrita a região norte do estado. Essa associação de variáveis é suportada pelo teste de razão de possibilidades, onde foi observado que existe uma chance de cerca de 100 vezes maior de se encontrar as amostras do grupo 2 na macrorregião VII (norte de MG) do que em outras regiões do estado (tabela 8).

A distribuição de distintas formas clínicas das leishmanioses associada a regiões geográficas diferentes já é bem reconhecida. Esse fenômeno é causado principalmente pela prevalência de diferentes espécies de *Leishmania* em ambientes variados. Nos países da América do Sul, por exemplo na região da Cordilheira dos Andes e no Equador, as terras altas albergam quase que exclusivamente casos de LT por variadas espécies de *Leishmania*, enquanto

LM associada principalmente à espécie *L. braziliensis* está mais restrita à região amazônica (Calpovina et al., 2004; Lucas et al., 1998). No Brasil, parasitos do subgênero *L. (Viannia)* estão relacionados a três diferentes populações, sendo uma restrita à região amazônica, outra localizada ao longo da costa atlântica do país, e a terceira numa faixa que abrange a região oeste e parte das regiões norte e nordeste (Kuhls et al., 2013). Nesse mesmo trabalho, os autores avaliaram por microssatélites 15 amostras derivadas de manifestações cutâneas localizadas provenientes de Minas Gerais e observaram que as mesmas não apresentaram variações entre si. Na Bahia, um estudo realizado na região sudeste do estado observou a associação do aparecimento de formas cutâneas disseminadas a esta região geográfica (Schriefer et al., 2009).

Não existem muitas informações na literatura acerca da correlação entre o polimorfismo de manifestações clínicas atípicas das leishmanioses e regiões geográficas. Associações de casos atípicos de LTA por *L. braziliensis* não foram encontradas no estudo de Guimarães et al. (2009), devido a utilização de um pequeno número de casos o que limitou a força das análises de agrupamento. Entretanto, formas atípicas de leishmaniose foram encontradas em associação a áreas geograficamente restritas, em um estudo retrospectivo entre os anos de 2002 e 2006 no Paquistão (Bari & Rahman, 2008).

Além da correlação entre os grupos geneticamente distintos e regiões geográficas, também foi encontrada a associação entre o perfil genético apresentado pelos grupos na classificação hierárquica e o tipo de lesão das quais as amostras provêm. Em nosso estudo observamos que as amostras do grupo 1, provenientes de variadas regiões do estado que apresentaram perfis de restrição indistinguíveis à *L. braziliensis* referência e alta identidade de sequências a essa mesma espécie, estão associadas ao aparecimento de manifestações típicas da LTA (cor laranja). Entretanto as amostras do grupo 2, oriundas do norte do estado e com perfis de restrição variantes ao de *L. braziliensis* estão associadas com as manifestações atípicas de LTA (cor púrpura). Essa associação foi corroborada pela análise de razão de possibilidades, onde existe uma chance de cerca de 15 vezes maior de encontrar o parasito geneticamente variante entre aqueles indivíduos que

apresentam lesão atípica de LTA (OR = 15) (tabela 8). Além disso, não foi encontrada associação entre a variabilidade genética dos grupos e o número de lesões apresentado pelos portadores de LTA (OR = 1,28) (tabela 8).

Até o momento, não existem dados na literatura que corroborem a associação entre variabilidade genética e manifestações clínicas atípicas da LTA por *L. braziliensis*. Entretanto os resultados obtidos neste trabalho são indicativos de que parasitos da espécie *L. braziliensis* que estão circulando na região norte do estado de Minas Gerais estão associados com a presença de manifestações clínicas atípicas de LTA, o que tem importantes implicações no diagnóstico, tratamento, profilaxia e epidemiologia da doença nessa região.

A investigação da associação entre manifestações clínicas distintas de LTA e variabilidade genética do parasito *L. braziliensis* é relevante inclusive sob o ponto de vista do controle da doença, apesar de não existirem muitos relatos acerca dessa correlação. Schriefer et al. (2009) encontraram uma associação entre genótipos distintos de parasitos da espécie *L. braziliensis* e diferentes formas clínicas da doença (cutânea e disseminada). No município de São João das Missões, de onde a totalidade das amostras do grupo 2 provém, existe alta prevalência das formas atípicas de LTA (Freire, 2011) e em contrapartida, no restante do estado prevalece a úlcera clássica. Os resultados obtidos neste trabalho apontam para a necessidade de se aprofundar o conhecimento em cada foco de transmissão de LTA, inclusive em todas as suas particularidades, pois uma vez que as equipes de saúde não estejam preparadas para o encontro dessas variações clínicas, muitos casos passarão despercebidos e sem o devido diagnóstico e tratamento.

A variabilidade genética dentro do gênero *Leishmania* é consideravelmente alta, inclusive no subgênero *Viannia*, onde no Brasil já foram encontrados parasitos geneticamente distintos dentro de clados distribuídos em determinadas áreas e estados (Kulhs et al., 2013; Marlow et al., 2014). Entretanto, deve-se levar em consideração também aspectos que vão além dos polimorfismos genéticos do parasito, como qual é a dinâmica de interação com os variados hospedeiros e vetores, aspectos da transmissão, instalação da infecção e desenvolvimento da doença e resposta ao tratamento disponível. Sobretudo, não se sabe qual é o desfecho da interação destas

cepas de *L. braziliensis* geneticamente variantes com o homem e outros vertebrados, se essa variação genotípica pode influenciar ou exacerbar de alguma forma a virulência dessas cepas circulantes no norte de Minas Gerais, e também se de alguma forma as tornam resistentes ou susceptíveis ao tratamento com os fármacos quimioterápicos disponíveis no sistema público de saúde do Brasil. Nossos resultados apontam para a associação de características clínicas atípicas das lesões com aspectos genéticos destas amostras de *L. braziliensis* que podem inclusive se disseminar para outras áreas.

Além da questão genética, existem também os aspectos da interação destes parasitos geneticamente variantes com o meio ambiente como um todo. Minas Gerais não se constitui de apenas um tipo de vegetação. Na porção centro-ocidental do estado, predomina a vegetação tipo cerrado, especialmente na bacia dos rios São Francisco e Jequitinhonha, enquanto na faixa a leste e sul do estado, encontramos a vegetação tipo mata atlântica. Estas áreas já apresentam estudos acerca da circulação de espécies do gênero *Leishmania* e seus hospedeiros e vetores (Mayrink et al., 1979; Gontijo et al., 2002). Em contrapartida, a região norte do estado é uma região de transição entre caatinga e cerrado. As amostras provenientes de São João das Missões (macrorregião VII, região norte do estado) são oriundas da terra indígena Xakriabá, constituída por aldeias em um espaço delimitado e cercado por barreiras naturais. O fato de ser uma região relativamente isolada pode ter auxiliado no aparecimento dessas cepas geneticamente variantes.

A terra indígena Xakriabá é uma região bastante peculiar no tocante as suas características ecológicas e culturais. É uma área com características rurais onde existe uma fauna rica, com diversidade de espécies de flebotomíneos (Rego et al., 2015) e grande variedade de espécies de hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* (Quaresma et al., 2011) em comparação com as outras áreas de Minas Gerais de onde as amostras do grupo 1 provém (Pereira, 2015, dados não publicados).

Adicionalmente, nessa área circulam várias espécies de *Leishmania* dermatrópicas e viscerotrópicas, como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum* tanto entre os pequenos mamíferos que habitam a

área, quanto nos fletobotomíneos (Quaresma et al., 2011; Rego, et al., 2015). Essa diversidade de espécies, tanto de hospedeiros como principalmente de flebotomíneos pode ajudar a compreender a presença dos polimorfismos genéticos observados, uma vez que existem evidências da ocorrência de algum tipo de fluxo gênico ou recombinação dentro dos fletotomíneos (Inbar et al., 2013). Além disso, em áreas onde espécies do subgênero *L. (Viannia)* são simpátricas, a possível emergência de híbridos infectivos para humanos com potencial de gerar doença severa deve ser considerada. Evidências de recombinação em *Leishmania* já foram encontradas in vitro e também ex vivo (Akopyants et al., 2009; Inbar et al., 2013; Romano et al., 2014). Parasitos híbridos entre espécies já foram relatados no novo mundo, inclusive entre as espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* em países da América do Sul (Dujardin et al., 1995; Delgado et al., 1997; Banuls et al., 1999). Entretanto não se pode afirmar que as cepas geneticamente variantes caracterizadas neste trabalho sejam híbridos, sendo necessárias investigações mais aprofundadas.

6.4 Análise Filogenética dos Isolados de *L. braziliensis* de Minas Gerais

As análises filogenéticas podem ser utilizadas para inferir sobre a estrutura de populações naturais e também elucidar alguns desfechos, como a distribuição de indivíduos na natureza, as estratégias utilizadas para propagação e recombinação, (Rougeron et al., 2015), principalmente auxiliando essas observações em organismos difíceis de se observar diretamente, como protozoários (De Meeûs et al., 2007).

Neste estudo as análises filogenéticas utilizando dados concatenados dos marcadores *hsp70*, *Cpb*, *g6pd* e *6pgd* foram realizadas com o modelo de distribuição MKY pelo software PhyML. Estas análises foram realizadas de duas maneiras, uma onde foram incluídas as sequências das cepas referência de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e de outras espécies filogeneticamente mais distantes de *L. braziliensis* recuperadas do banco de dados GenBank (figura 13), e outra onde permaneceu como *outgroup* nas análises apenas a cepa referência de *L. guyanensis* (figura 14). Foi observado que a topologia das duas árvores foi bastante semelhante e que foram formados dois clados onde a

característica principal que agrupou as amostras foi a origem geográfica.. Observa-se que as amostras MG15 e MG16, apesar de apresentarem os perfis de restrição indistinguíveis a cepa referência (tipo = Lb), estão agrupadas em conjunto com as cepas do grupo amostral 2 nas duas árvores. Essa distribuição pode ser explicada pelo fato dos polimorfismos nos perfis de restrição presentes nas cepas MG15 e MG16, que as fazem semelhantes à cepa referência, não foram suficientes para agrupá-las no mesmo clado das amostras do grupo 1, pois elas apresentaram características nas sequências analisadas que as aproximam mais das outras amostras isoladas na mesma região (Terra Indígena Xakriabá).

O modelo de estudos filogenéticos e populacionais empregando sequências de marcadores variados ao longo do genoma de *Leishmania* já vem sendo utilizado por vários autores. Marlow et al (2014) utilizaram, dentre outros, dois dos marcadores genéticos também empregados em nosso estudo, o *hsp70* e o *6pgd*, para investigar a estrutura populacional de um painel de amostras de *L. braziliensis* relacionando variações intraespecíficas observadas com características epidemiológicas de um surto recente de LTA em Santa Catarina, na região sul do Brasil. Esses achados mostraram o potencial discriminatório da técnica de MLSA quando utilizam estes alvos. Fraga et al (2010) analisaram sequências em várias cepas distintas de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo, confirmando *L. braziliensis* como um grupo monofilético, onde as cepas referência do Brasil permaneceram agrupadas. Kuhls et al (2013) analisaram a estrutura populacional de cepas do Novo Mundo, utilizando 15 cepas de *L. braziliensis* de Minas Gerais, e encontraram um grupamento único nas amostras da região Sudeste. Vale ressaltar que neste último estudo não foram incluídas nas análises amostras provenientes do norte do estado de Minas Gerais.

Sendo assim, nossos resultados indicam que as cepas provenientes da macrorregião VII, no norte do estado (grupo 2) apresentam polimorfismos ao longo dos marcadores utilizados e tendem a se agrupar separadamente em análises de grupamento e filogenia, além de estarem associados à ocorrência de manifestações atípicas da LTA. Em contrapartida, as amostras isoladas nas demais macrorregiões do estado de Minas Gerais apresentam uma maior

homogeneidade genética, além de serem mais similares à cepa *L. braziliensis* referência, estando associadas à presença de manifestações típicas da LTA.

Os dados obtidos neste estudo reforçam a ideia de que é necessário sempre aliar variadas técnicas e marcadores quando o objetivo é identificar e caracterizar a espécie circulante em determinado local. Além disso, para alguns alvos, apenas o uso da PCR-RFLP não é suficiente para identificar a espécie, podendo gerar resultados errôneos ou inconclusivos por eventuais polimorfismos existentes ou características próprias dos marcadores. Isso pode gerar consequências graves para as estratégias e desfechos clínico-epidemiológicos, como o diagnóstico e esquema terapêutico de indivíduos. Portanto, é necessário escolher corretamente as metodologias a fim de tornar segura a identificação dos parasitos, principalmente em áreas onde são encontradas várias espécies de *Leishmania* simultaneamente.

7 Conclusões

- A metodologia de PCR dirigida ao alvo *g6pd* foi capaz de identificar os isolados utilizados neste estudo como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, corroborando com os resultados da identificação realizada em trabalhos prévios (Gontijo, 2000; Quaresma, 2011);
- As amostras utilizadas neste estudo apresentaram variação genética em relação aos marcadores utilizados (*hsp70*, *ITS1*, *cpb*, *g6pd* e *6pgd*), tanto ao longo das sequências como nos sítios de restrição de endonucleases;
- Foi observada uma associação entre amostras com diferentes características genéticas e origem geográfica;
- Foi verificada uma associação entre amostras com diferentes características genéticas (cepas provenientes de São João das Missões - macrorregião VII) e a presença de manifestações clínicas atípicas de LTA;
- A divisão inicial hipotética das amostras em dois grupos foi suportada pelas análises hierárquicas, particionais e filogenéticas;
- O grupo 1, composto por amostras provenientes de várias regiões de Minas Gerais e isoladas de manifestações típicas de LTA, apresentou-se mais homogêneo e com menor índice de polimorfismo;
- O grupo 2, composto por cepas provenientes de São João das Missões (macrorregião VII) e isoladas de manifestações atípicas de LTA, apresentou-se mais heterogêneo e com maior índice de polimorfismos;

8 REFERÊNCIAS

Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 2009; 324: 265–268. doi: 10.1126/science.1169464

Alam MZ, Haralambous C, Kuhls K, Gouzelou E, Sgouras D, Soteriadou K, et al. The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. *Microbes Infect.* 2009 May-Jun;11(6-7):707-15.

Al-Jawabreh, A., Schnur, L.F., Nasereddin, A., Schwenkenbecher, J.M., Abdeen, Z., Barghuthy, F., Khanfar, H., Presber, W., Schönian, G. The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho and its environs, a classical focus of *L. major*. *Trop. Med. Int. Health* 2004; 9, 1–5.

Altamirano-Enciso, A. J. 2000 Comprometiendo la estructura osteo-facial de las poblaciones humanas del antiguo Perú por la Leishmaniasis Tegumentaria de forma mucosa. Tese de doutoramento em saúde pública, Rio de Janeiro, ENSP/Fiocruz, 213p.

Altamiro-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde, Manguinhos* 2003; vol. 10(3): 853-82.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006; 22 (12): 552–557.

Aly R, Argaman M, Halman S, Shapira M. A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic acids research*. 1994; 22(15): 2922-2929.

Anders G, Eisenberger CL, Jonas F, Greenblatt CL. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96(Suppl. 1):S87-S92.

Araújo VE, Pinheiro LC, Almeida MC, de Menezes FC, Morais MH, Reis IA, Assunção RM, Carneiro M. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(11):e2540.

Ashford RW, Seaman J, Schorscher J, Pratlong F. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: identity and systematic position of the parasites from patients and vectors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992;86:379–380.

Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007; 64:1-109.

Bañuls AL, Jonquieres R, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa? *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(5): 838-845.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology* 2009; 121:317-322.

Bari AU, Rahman SB. Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008; 74(1):23–7.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. bras. epidemiol.* [online]. 2004, vol.7, n.3, pp. 328-337.

Bastien P, Blaineau C, Pagès M. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol Today* 1992; 8: 174–177.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, 1996; Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Belli AA, Miles MA, Kelly JM. A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*. 1994; 109:435–442.

Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BW, da Silva ES, Struchiner CJ. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(4):e2182.

Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Perez-Montfort R, Becker I. . Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol. Res* 2002; 88:918-925.

Boité MC, Mauricio IL, Miles MA, Cupolillo E. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(11): e1888.

Borg, I., Groenen, P. Modern Multidimensional Scaling: theory and applications (2nd ed.). New York: Springer-Verlag. 2005; pp. 207–212. ISBN 0-387-94845-7.
Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou B: A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'- untranslated region element. *J Biol Chem.* 2002; 277(22): 19511-19520.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Relatório interno da

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria De Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: MS, 2010. 180 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Saúde Brasil, Brasília, Edição n. 95, abril 2004.

Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pages M, Dedet JP, Wincker P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* 1998; 222: 107–117.

Brock G, Pihur V, Datta S, Datta S. cValid, an R package for cluster validation. *J Stat Software* 2008; 25(4).

Buitrago R, Cupolillo E, Bastrenta B, Le Pont F, Martinez E, Barnabé C. PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infect Genet Evol* 2011; 11:557–563.

Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99:663–72.

Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania*

Mexicana amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J. Immunol.* 2004; 173:3297–304.

Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 2009; 19:172-173.

Carvalho GML, Andrade Filho JD, Falcão AL, Rocha ACVM, Gontijo CMF. Naturally infected *Lutzomyia* sandflies and the transmission of leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 407-414.

Castilho TM, Camargo LMA, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on the Basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Am J Trop Med Hyg* January 2008; vol. 78 no. 1 p122-132.

Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Gen.* 1967; 19: 233-257.

Chaouch M, Fathallah-Mili A, Driss M, Lahmadi R, Ayari C, Guizani I, Ben Said M, Benabderrazak S. Identification of Tunisian *Leishmania* spp. by PCR amplification of cysteine proteinase B (cpb) genes and phylogenetic analysis. *Acta Trop.* 2013;125(3):357-65.

Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A, Alvar J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002; 96(Suppl. 1):S93-S99.

Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodriguez N, Mazzedo MI, Blanco B. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized

Leishmania promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2004; 99, pp. 57–62.

Convit J, Ulrich M, Perez M, Hung J, Castillo J, Rojas H, Viquez A, Araya LN, de Lima H. Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. Trans R Soc Trop Med Hyg 2005; 99:13-17.

Cortes S, Mauricio I, Almeida A, Cristovão JM, Pratlong F, Dedet JP. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. Parasitology International 2006;55:277–83.

Craig EA, Gross CA. Is HSP70 the cellular thermometer? Trends Biochem Sci. 1991; 16(4):135-40.

Cruz-Barrera ML, Ovalle-Bracho C, Ortegon-Vergara V, Pérez-Franco JE, Echeverry MC. Improving *Leishmania* species identification in different types of samples from cutaneous lesions. J Clin Microbiol. 2015; pii: JCM.02955-14.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol. 2003; 41(7): 3126-32.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50(3):296-311.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H, Beverley SM. . Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 1995; 73:145-155.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Mar; 50(3):296-311.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012; 9: 772.

de Meeûs T, McCoy KD, Prugnolle F, Chevillon C, Durand P, Hurtrez-Boussès S, Renaud F. Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête” *Infection, Genetics and Evolution* 2007; Volume 7, Issue 2, Pages 308–332;

Dedet JP. *Leishmania* et leishmaniose du Continent américain. *Ann Inst Pasteur* 1993; 4: 3-26.

Defays D. An efficient algorithm for a complete link method. *The Computer Journal* 1977; 20: 364–366. doi: 10.1093/comjnl/20.4.364

Delgado O, Cupolillo E, Bonfante-Garrido R, Silva S, Belfort, Grimaldi Jr G. Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela Caused by Infection with a New Hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 581-582.

den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1471–1477.

Desjeux, P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* 2001; (Berlin) 190:77-79.

Dieringer D, Schlötterer C. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Res* 2003; 13: 2242–2251.

Dorval MEC, Oshiro ET, Cupollilo E, Camargo de Castro AC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 43-46.

Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, Dedoncker S, Jacquet D. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop* 1995; 59(4): 293-307.

Dutari LC, Loaiza JR. American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. *Parasit Vectors*. 2014; May 11;7:218.

Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(5):1792-1797

El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, Presber WH, Schonian G. . *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp. Parasitol*. 2001; 97:35-44.

Ellis RJ, Hartl FU. Protein folding in the cell: competing models for chaperonin function. *FASEB J*. 1996; 10(1):20-6.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005; 309: 404– 409.

Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31: 359–377.

Fonseca ES, D'Andrea LA, Taniguchi HH, Hiramoto RM, Tolezano JE, Guimarães RB. Spatial epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in a

municipality of west São Paulo State, Brazil. J Vector Borne Dis. 2014; 51(4):271-5.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. Infection, Genetics and Evolution 2010;10:238–45.

Garcez LM, Soares DC, Chagas AP, Souza GCR, Miranda JFC, Fraiha H, Flöeter-Winter LM, Nunes HM, Zampiere RA, Shaw JJ. Etiology of cutaneous leishmaniasis and anthropophilic vectors in Juruti, Pará State, Brazil. Cadernos de Saúde Pública, 2009; 25(10), 2291-2295

Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya, KW, Bermudez, H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-genepolymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. Infect Genet Evol 2005; 5: 109-116.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J. Culture-Independent Species Typing of Neotropical Leishmania for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42:2294–7.

Gelanew T, Hailu A, Schönian G, Lewis MD, Miles MA, Yeo M. Multilocus sequence and microsatellite identification of intra-specific hybrids and ancestor-like donors among natural Ethiopian isolates of *Leishmania donovani*. Int J Parasitol. 2014; 44(10): 751–757.

Gibson W, Peacock L, Ferris V, Williams K, Bailey M. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. Parasit Vectors 2008; 1: 4. doi: 10.1186/1756-3305-1-4.

Goldstein DB, Pollock DD. Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference *Journal of Heredity* 1997;88:335-342.

Gontijo CM, da Silva ES, de Fuccio MB, de Sousa MC, Pacheco RS, Dias ES, Andrade Filho JD, Brazil RP, Melo MN. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 2002; 81(2):143-50.

Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(5):664-74.

Guimarães AM, Rocha CM, Oliveira TM, Rosado IR, Morais LG, Santos RR. Factors associated the seropositivity for Babesia, Toxoplasma, Neospora and Leishmania in dogs attended at nine veterinary clinics in the municipality of Lavras, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2009; v.18, n.1, p.49-53.

Guindon SJF, Dufayard V, Lefort M, Anisimova W, Hordijk F, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010; 59:307-321.

Gupta S, Anderson RM. Population structure of pathogens: the role of immune selection. *Parasitol Today* 1999; 15:497–501

Haile S, Papadopoulou, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 2007, 10: 569-577.

Hamad SH, Musa AM, Khalil EAG, Abebe T, Younis BM. *Leishmania*: probable genetic hybrids between species in Sudanese isolates. *J. Microbiol. Antimicrob.* 2011; 3:142–145.

Hartigan JA, Wong MA. Algorithm AS 136: a k-means clustering algorithm. J Royal Stat Soc Series C (Appl Stats) 1979; 28: 100–108. doi: 10.2307/2346830

Hide M, Bañuls A-L. Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. Acta Tropica 2006; 100:241–5.

Hotez PJ, Remme H, Buss P, Alleyne G, Morel C, and Breman J. Combating tropical communicable diseases: workshop report of the disease control priorities project. Clinical Infectious Diseases 2004; **38**, 871–878.

Huson, Bryant D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, Mol. Biol. Evol. 2006; 23(2):254-267.

Ibrahim ME, Barker DC. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. Inf Gen Evol. 2001;1:61–68.

Inbar E, Akopyants NS, Charmoy M, Romano A, Lawyer P, Elnaiem DE, Kauffmann F, Barhoumi M, Grigg M, Owens K, Fay M, Dobson DE, Shaik J, Beverley SM, Sacks D. The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. PLoS Genet. 2013; 9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <www.ibge.gov.br>, acesso em 31 jan 2014.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson 128 DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S,

Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ: The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005; 309(5733): 436-442.

Jara M, Aduai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Arevalo J. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) Organisms in Skin and Mucosal Lesions: Exploratory Study of Parasite Load and Clinical Parameters. *J. Clin. Microbiol.* June 2013; vol. 51 no. 6 1826-1833.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of ecuador by a polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72:87–93.

Katoh K, Standley DM. MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods Mol Biol.* Forthcoming 2013.

Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJ, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 46:253–263.

Killick-Kendrick, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 1999; 17, 279–289.

Krolewiecki AJ, Gil JF, Quipildor M, Cajal SP, Pravia C, Juarez M, Villalpando C, Locatelli FM, Chanampa M, Castillo G, Oreste MF, Hoyos CL, Negri V,

Nasser JR. Restricted outbreak of American tegumentary leishmaniasis with high microfocal transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88(3):578-82.

Kuhls K, Cupolillo E, Silva SO, Schweynoch C, Boité M. Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (*Viannia*). *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(10): e2490.

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

Lainson R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina* 1997; 11(1): 29-40.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution In *The Leishmaniasis*. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *Biology and Medicine*, 1987, Vol. 1, Academic Press, London, p. 1-120.

Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis: The Neotropical *Leishmania* species. In L Collier, A Baeows, M Sussman (eds), *Microbiology and Microbial Infections* 1998; 5: 241-266.

Lanfranco MF, Loayza-Muro R, Clark D, Núñez R, Zavaleta AI, Jimenez M, Meldal M, Coombs GH, Mottram JC, Izidoro M, Juliano MA, Juliano L, Arévalo J. Expression and substrate specificity of a recombinant cysteine proteinase B of *Leishmania braziliensis*. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 161:91–100.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23 (21): 2947-2948 first published online September 10, 2007 doi:10.1093/bioinformatics/btm404

Laurent T, Rijal S, Yardley V, Croft S, De Doncker S, Decuypere S. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 2007; 7:206–12.

Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed *Mol. Biochem. Parasitol.* 2007; 152, pp. 35–46

Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984;78(6):845–6.

Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, et al. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59:312–7.

Marco JD, Barroso PA, Locatelli FM, Cajal SP, Hoyos CL, Nevot MC, Lauthier JJ, Tomasini N, Juarez M, Estévez JO, Korenaga M, Nasser JR, Hashiguchi Y, Ruybal P. Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: Describing parasitediversity in Argentina. *Infect Genet Evol.* 2014; 30C:308-317. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.031.

Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck H-P, Felger I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41:3147–53.

Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck H-P, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2003; 46:115–24.

Marlow MA, Boité MC, Ferreira GE, Steindel M, Cupolillo E. Multilocus sequence analysis for *Leishmania braziliensis* outbreak investigation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 13;8(2):e2695. doi: 10.1371/journal.pntd.0002695.

Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitol Today* 1985;1:5.

Marsden, PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 859-876.

Martinez E, Alonso V, Quispe A, Thomas MC, Alonso R, Piñero JE, Gonzalez AC, Ortega A, Valladares B. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. *Parasitol.*, 2003; v. 127, p. 513-517.

Martins AV, Barreto MP, Brener Z, Pellegrino J. Observações preliminares sobre um foco de leishmaniose tegumentar americana em Minas Gerais *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 1956; 8, pp. 577–581.

Marzochi MCA, *Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares.* *Jornal Brasileiro de Medicina* 1992; 63: 82-104.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1994; 27 (supl. 1): 91.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology* 2001;122:393–403.

Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* 2006 Jun;36(7):757-69.

Mayr E. *Populações, Espécies e Evolução.* Companhia Editora Nacional. Universidade de São Paulo. 1970. 485pp.

McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in Parasitic Diseases *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2006. 1:497–536.

Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar.* Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília, 2007.

Miroslava AG, Mancilla J, Segura-Cervantes E, Galindo-Sevilla N. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment.* Intech, 2014 534 p.

Montalvo AM, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marin M, de Doncker S, Velez I.D, Dujardin, JC. PCR-RFLP and RAPD for typing neotropical *Leishmania*. *Biomedica* 2008; 28, 597-606.

Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2001; 95:104–7.

Morariu V, Srinivasan B, Raykar V, Duraiswami R, Davis L. Automatic online tuning for fast Gaussian summation, in *Advances in Neural Information Processing Systems*, 2008.

Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current Opinion in Microbiology*, 2004; 7(4):375-381.

Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:14285–93

Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; USA 93:6008–13.

Musso O, Sommer P, Drouet E, Cotte L, Neyra M, et al. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR-derived methods. *J Virol Methods* 1996; 56: 125–137.

Nasereddin A, Bensoussan-Hermano E, Schönian G, Baneth G, Jaffe CL. Molecular diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46:2848–55.

Nicola L, Oría F, Arias M, Abeldaño A, Negroni R. Cutaneous leishmaniasis: unusual verrucous plaque presentation. *Dermatol Argent.* 2014; 20 (2): 123-125.

Nimri LF, Schallig HD. Application of riboprinting for the identification of isolates of cutaneous *Leishmania* spp. *Parasitology* 2003; 127:201-205.

Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania (viannia)* in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76:573–578.

Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from

clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:2877–81.

Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, de Sousa C, Cupolillo E, Espinosa D, Arevalo J, Noyes H, Mauricio I, Kuhls K. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2818-2825.

Odiwuor S, De Doncker S, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Natural *Leishmania donovani/Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia. *Infection, genetics and evolution. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2011; 11:2113–2118.

Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Pacheco SJ, Costa FA, Schubach AO, Pacheco RS. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasit Vectors.* 2013; 6:189.

Oliveira MRF, Macedo VO, Carvalho EM, Barral A, Marroti JG, Bittencout A, Abreu MVA, Orge MGO, Lessa HA, Marsden PD. Estudo evolutivo da leishmaniose mucosa (7 a 17anos) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Três Braços, Bahia *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1995; 28:325-332.

Orsini, O. Leishmaniose em Minas Gerais. *Brasil Médico*, 1940; pp. 762–765.

Oshaghi MA, Ravasan NM, Hide M, Javadian E-A, Rassi Y, Sedaghat MM. Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for *L.infantum/L.donovani* discrimination. *Experimental Parasitology* 2009;122:61–5.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban area of the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1993; 88:103-110.

Passos VMA, Falcão AL, Marzochi MCA, Gontijo CMF, Dias ES, Katz N. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1993; 88: 103-110.

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degrave W, Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica* 1999; 72:251-258.

Peacock L, Ferris V, Bailey M, Gibson W. Intraclonal mating occurs during tsetse transmission of *Trypanosoma brucei*. *Parasit Vectors* 2009; 2: 43.

Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1993; 49:364–9.

Ponce C, Ponce E, Morrison A, Cruz A, Kreutzer R, McMahon-Pratt D, Neva F. *Leishmania donovani* chagasi: New clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Lancet* 1991; 337: 67-70.

Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura Júnior AJ, Teixeira Neto RG, Madeira FM, Carvalho MB, Paglia AP, Melo MN, Gontijo CM. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil.

Quaresma, Patrícia Flávia. Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores. Célia Maria Ferreira Gontijo. Belo Horizonte: s.n., 2011. 149 p. Capa dura, 29 cm., il. Tese(Doutorado em Ciências na área de em Ciências na área de Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias)-Ministério da Saude. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou.

Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strain polymorphisms. J Clin Microbiol. 2012; Dec;50(12):4028-34

Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuypere S, Hide M, Bañuls A-L, De Doncker S. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. The Journal of Infectious Diseases 2005;192:685–92.

Rangel EF, Costa SM, Carvalho BM. Environmental Changes and the Geographic Spreading of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In Claborn, D.M. Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. Intech, 534 p.

Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. Int. J. Parasitol.2006; 36:1383–1388.

RDC Team. R: a language and environment for statistical computing, reference index version 2.13.0. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2011.

Restrepo CM, De La Guardia C, Sousa OE, Calzada JE, Fernández PL, Leonart R. AFLP polymorphisms allow high resolution genetic analysis of American Tegumentary Leishmaniasis agents circulating in Panama and other

members of the *Leishmania* genus. PLoS One. 2013; 8(9):e73177. doi: 10.1371/journal.pone.0073177.

Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzyme: suggestion for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp 1990; 65: 111-125.

Rodríguez EM, Díaz F, Pérez MV. Spatio-temporal clustering of American Cutaneous Leishmaniasis in a rural municipality of Venezuela. Epidemics. 2013; 5(1):11-9.

Rougeron V, De Meeûs T, Kako Ouraga S, Hide M, Bañuls 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 Pathog 2010; 68: e1001004.

Rougeron V, Meeûs TD, Hide M, Waleckx E, Bermudez H. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. Proc Natl Acad Sci 2009; 106: 10224–10229.

Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P, Miles MA. Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. PLoS One.2011; 6:e19851.

Salomón OD, Fernández MS, Santini MS, Saavedra S, Montiel N, Ramos MA, et al. Distribution de *Lutzomyia longipalpis* em la Mesopotamia Argentina 2010. Med (Buenos Aires) 2011; 71: 22-26.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol. 1975 May 25; 94 (3):441–448.

Saravia NG, I Segura I, Holguin AF, Santrich C, L Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct

populations of *Leishmania* (Viannia) in Colombia Am. J. Trop. Med. Hyg., 1998; 59(1), pp. 86–94.

Sato H, Yamaguchi M, Shibasaki T, Ishii T, Banna I. Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium thiomalate and auranofin. Biochem Pharm. 1995; 49(10):1453-7.

Schonian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylen S, Pratlong F, Eisenberger CL, Schnur LF, Presber W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. Mol. Biochem. Parasitol. 2000; 106:239-248.

Schonian G, El Fari M, Lewin S, Schweynoch C, Presber W. Molecular epidemiology and population genetics in *Leishmania*. Med. Microbiol. Immunol. 2001; (Berlin) 190:61-63.

Schonian G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Kohler W, Presber W. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2001; 95:217-224.

Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 47(1): 349-358.

Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitology 2010; 138:405–25.

Seaman J, Boer C, Wilkinson R, de Jong J, de Wilde E, Sondorp E. Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of complicated kala-azar under field conditions. Clin Infect Dis 1995; 21(1):188–193.

Seridi N, Belkaid M, Quispe-Tintaya W, Zidane C, Dujardin JC. Application of PCRRFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; Jun;102(6):556-63.

Shirian S, Oryan A, Hatam GH, PhD; Saed Panahi S, Daneshbod Y. Comparison of Conventional, Molecular, and Immunohistochemical Methods in Diagnosis of Typical and Atypical Cutaneous Leishmaniasis. *Arch Pathol Lab Med.* 2014; 138:235–240.

Simpson L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. *Ann Rev Microbiol.* 1987; 41: 363-380.

Smith M, Blanchette M, Papadopoulou B. Improving the prediction of mRNA extremities in the parasitic protozoan *Leishmania*. *BMC Bioinformatics.* 2008, 9: 158.

Sterkers Y, Lachaud L, Bourgeois N, Crobu L, Bastien P, Pagès M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. *Molecular Microbiology* 2012; 86, 15–23.

Talavera, G., and Castresana, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 2007; 56, 564-577.

Tamura KD, Peterson N, Peterson G, Stecher M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28: 2731-2739.

Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, Schönian G, Farajnia S, Alimohammadian MH. *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Trop* 2006; 98:52–58.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures Of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci 1990; U S A 87: 2414–2418.

Tibayrenc M. Clonality in *Leishmania*. Parasitol Today 1993; 9: 58. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1986; 80: 859-876.

Torres DC. Caracterização Molecular de Isolados Clínicos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* e sua Associação com a Resposta Terapêutica ao Antimoniato de Meglumina no Brasil. Dissertação (mestrado em biologia celular e molecular) IOC, FIOCRUZ, RJ.

Tryon, R. C., 1939, Cluster analysis. Ann Arbor: Edwards Brothers.

Tsokana CN, Athanasiou LV, Valiakos G, Spyrou V, Manolakou K, Billinis C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis, Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment, Dr. David Claborn (Ed.), 2014 ISBN: 978-953-51-1232-7, InTech.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. J Infect Dis 2002; 186 (12):1829–1834.

Victoir K, Bañuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noël S. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. Parasitology 1998; 117 (Pt 1):1–13.

Victoir K, Dujardin JC. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. Trends Parasitol 2002; 18:81–5.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet J, Bastien P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across

widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1688–1694.

World Health Organization. Control of the Leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. WHO Technical report series 949, Geneva, 1–201.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 1994; 54, 881p.

Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperonine-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5: 981-791.

Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fischer SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005; 72:415–20.