

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

WALTER LINS BARBOSA JÚNIOR

ANÁLISE DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS DO GENE HASPB (K26) DE  
*LEISHMANIA INFANTUM* EM AMOSTRAS CLÍNICAS POSITIVAS PARA  
LEISHMANIOSE VISCERAL E COINFEÇÃO LV/HIV

RECIFE

2016

WALTER LINS BARBOSA JÚNIOR

**Análise das regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Orientadora:**

Dr.<sup>a</sup> Zulma Maria de Medeiros

**Coorientador:**

Dr. Fábio Lopes de Melo

Recife

2016

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

B238a Barbosa Júnior, Walter Lins.

Análise das regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV / Walter Lins Barbosa Júnior. - Recife: [s. n.], 2016.

62 p.: il., tab., graf.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Zulma Maria de Medeiros; coorientador: Fábio Lopes de Melo.

1. Leishmaniose Visceral - diagnóstico. 2. *Leishmania infantum* - genética. 3. Polimorfismo Genético. 4. Análise de Sequência de DNA. 5. Proteínas de Protozoários – genética. 6. Reação em Cadeia da Polimerase. 7. Leishmaniose Visceral - complicações. 8. Infecções por HIV - complicações. I. Medeiros, Zulma Maria de. II. Melo, Fábio Lopes de. III. Título.

---

CDU 616.993.161

WALTER LINS BARBOSA JÚNIOR

**Análise das regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Data da aprovação: 15/02/2016

**Banca Examinadora**

---

Dr.<sup>a</sup> Zulma Maria de Medeiros  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz  
Departamento de Parasitologia

---

Dr.<sup>a</sup> Milena de Paiva Cavalcanti  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz  
Departamento de Imunologia

---

Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz  
Departamento de Imunologia

À minha família, aos meus pais e aos amigos pela  
compreensão e apoio incondicional em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por iluminar meus caminhos e proporcionar a conclusão de mais uma etapa da vida.

À minha família, aos meus pais, Walter e Ivana, minha avó, meus tios e primos pelo conforto, apoio em todas as decisões e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora Zulma Medeiros, pela confiança, por acreditar em meu potencial e por proporcionar o meu desenvolvimento científico.

Ao meu orientador Fábio Melo, por todo o apoio e pelas nossas conversas, que tanto estimulam e desenvolvem o meu pensamento científico.

Aos meus colegas de laboratório: Luydson, Elis, Cynthia, Rhaíssa, Mariana, Leandro, Gabi, Suellen, Patrícia, Luiz, Paulo, Ana, Almerice, Mércia e André por toda ajuda, pelos momentos compartilhados durante todo esse processo e pela amizade.

Aos meus amigos da pós-graduação, pelos momentos compartilhados durante esses dois anos.

A todos os meus amigos de curso de Biologia, em especial à Raquel, Maria Helena, Karla, Lucas, e Ronaldo pelo convívio, pelo carinho e união. Por tornarem os quatro anos de graduação tão prazerosos.

Aos professores da pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde e do curso de Ciências Biológicas da UPE, por serem profissionais exemplares e por me proporcionarem o aprendizado.

À FACEPE – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco, instituição financiadora, e a FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, onde desenvolvi minhas atividades de pesquisa como bolsista.

Agradeço não só aqueles que me ajudaram diretamente no trabalho, mas também aqueles que, de alguma forma, entraram na minha vida e me deram forças, me fizeram seguir em frente e, portanto me engrandeceram de alguma forma.

"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... E a vida é muito para ser insignificante."

(Charles Chaplin)



BARBOSA JÚNIOR, Walter Lins. **Análise das regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV.** 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave que afeta a população de vários países, onde o Brasil apresenta a maior prevalência da infecção nas Américas. Com o estudo do gene codificante da proteína B de superfície (HASPB ou K26) de *Leishmania infantum* é possível identificar as variações polimórficas intraespecíficas e, assim, será possível consolidar a descrição de um perfil polimórfico presente no Estado de Pernambuco. O objetivo do trabalho foi analisar as regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV. O sistema K26 PCR foi otimizado utilizando concentrações variadas de DNA genômico de *L. infantum*. Foi realizado o *screening* de amostras clínicas de DNA através de dois sistemas de PCR simples, kDNA e ITS1/RFLP, para ensaios posteriores com a K26 PCR nas amostras positivas. A curva de dissociação de alta definição (qPCR-HRM) foi empregada na localização de temperaturas de *melting* específicas para *L. infantum*. Os amplicons do gene K26 foram sequenciados e alinhados as sequências selecionadas em base de dados. A K26 PCR apresentou limiar de detecção de 1 pg para amplicon de 700 pb. A especificidade dos *primers* foi avaliada experimentalmente e *in silico*, apresentando anelamento inespecífico com DNA humano. Em paralelo, foram selecionadas 78 amostras de DNA através dos dois sistemas *screening*, sendo 17 caracterizadas como *L. infantum*. Os ensaios com DNA das amostras clínicas para o sistema K26 PCR revelaram bandas espúrias. A análise através qPCR-HRM em DNA genômico do parasita resultou em amplificação com T<sub>m</sub> de 88,2 °C, já o ensaio com amostra clínica revelou duas ampliações com distintas temperaturas de *melting*, 84,6 e 88,2 °C. Três *amplicons* do gene K26 foram sequenciados e alinhados a cinco sequências da base de dados, indicando 38,2 % de similaridade. Pode-se concluir que o sistema K26 PCR é recomendável para análise dos polimorfismos genéticos, contanto que o DNA seja extraído diretamente de espécies isoladas em meio de cultura.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral. *Leishmania infantum*. HASPB (K26). Polimorfismo

BARBOSA JÚNIOR, Walter Lins. **Analyzing of the polymorphic regions of HASPB (K26) gene from *Leishmania infantum* in positive clinical samples for visceral leishmaniasis and VL/HIV co-infection.** 2016. Dissertation (Master's Program in Biosciences and Biotechnology in Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe disease that affects population of many countries, where Brazil has recorded the highest infection prevalence in the Americas. Studying the coding gene of the hydrophilic acylated surface protein B (HASPB or K26) of *Leishmania infantum* it is possible identify intraspecific polymorphic variation, consolidating the description of a polymorphic profile present in the State of Pernambuco. The aim of this study was analyzing of the polymorphic regions of HASPB (K26) gene from *Leishmania infantum* in positive clinical samples for visceral leishmaniasis and VL/HIV co-infection. The K26 PCR-based was optimized using serial dilutions from *L. infantum* genomic DNA. Clinical samples' DNA were screened by two PCR-based tools, kDNA and ITS1/RFLP, guiding subsequent K26 PCR assays in positive samples. High-resolution melt analysis (qPCR-HRM) was used in locating specific melting temperatures for *L. infantum*. K26 gene amplicons were sequenced and aligned to sequences from database. The K26 PCR-based detection threshold was 1 pg with 700-bp amplicon. Primers specificity was experimentally and *in silico* assayed, presenting non-specific annealing with human DNA. At the same time, PCR-based screening tools together selected 78 DNA samples, being 17 characterized as *L. infantum*. The K26 PCR-based assayed in DNA clinical samples revealed non-specific bands. qPCR-HRM analysing has resulted T<sub>m</sub> of 88.2 ° C, however, the clinical sample assay has revealed two different melting temperatures, 84.6 and 88.2 ° C. Three amplicons of K26 gene were sequenced and aligned to five sequences selected from database, indicating 38.2% of similarity. In conclusion, the K26 PCR-based tool is recommended for genetic polymorphisms analyzing, provided that DNA be extracted directly from isolates cultured.

Keywords: Visceral leishmaniasis. *Leishmania infantum*. HASPB (K26). Polymorphism

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho Mundo e no Novo Mundo.	15
<b>Figura 2</b>	Áreas com sobreposição da coinfeção LV/HIV-aids no mundo.	18
<b>Figura 3</b>	Fêmea do vetor ( <i>Lutzomyia longipalpis</i> ) responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral na América Latina.	19
<b>Figura 4</b>	Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i> .	20
<b>Figura 5</b>	Fluxo de atividades a partir do <i>screening</i> das amostras positivas.	31
<b>Quadro 1</b>	Sequências de <i>primers</i> com as respectivas temperaturas de anelamento.	34
<b>Figura 6</b>	Digestão do <i>amplicon</i> da região ITS1 de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> com a endonuclease de restrição <i>HaeIII</i> .	34
<b>Figura 7</b>	Curva de diluição de fator 10 para K26 PCR (700 pb).	37
<b>Figura 8</b>	Amplificação do kDNA de <i>Leishmania spp.</i> (145 pb).	38
<b>Figura 9</b>	Amplificação da região ITS1 de <i>Leishmania spp.</i> (300-350 pb).	39
<b>Figura 10</b>	Digestão do <i>amplicon</i> da região ITS1 com a endonuclease de restrição <i>HaeIII</i> .	39
<b>Figura 11</b>	Amplificação da região K26 de <i>Leishmania infantum</i> .	40
<b>Figura 12</b>	Curva de amplificação da qPCR.	41
<b>Figura 13</b>	Análise da curva de dissociação de alta definição (qPCR-HRM).	41
<b>Figura 14</b>	Parte da sequência reversa correspondente à banda de 700 pb da amostra clínica LV/HIV.	42
<b>Figura 15</b>	Parte da sequência reversa correspondente à banda de 700 pb do isolado de <i>L. infantum</i> .	43

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	15
<b>2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral</b> .....	15
<b>2.2 Classificação taxonômica</b> .....	18
<b>2.3 Aspectos biológicos do ciclo</b> .....	19
<b>2.4 Diagnóstico laboratorial</b> .....	20
2.4.1 Exames parasitológicos.....	21
2.4.2 Diagnóstico imunológico.....	21
2.4.3 Métodos moleculares.....	23
<b>2.5 Caracterização das espécies no gênero <i>Leishmania</i></b> .....	25
<b>2.6 Análise dos polimorfismos genéticos</b> .....	25
<b>2.7 Hydrophilic acylated surface protein B (HASP B)</b> .....	26
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	29
4.1 Objetivo geral.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	30
5.1 Área de estudo.....	30
5.2 População de estudo.....	30
5.3 Tipo do estudo.....	30
5.4 Amostra e critério de inclusão.....	30
5.5 Delineamento do estudo.....	30
5.6 Avaliação laboratorial.....	31
5.6.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
5.6.1.1 Otimização da K26 PCR.....	31
5.6.1.2 Ferramentas de screening.....	32
5.6.2 Análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP).....	33
5.6.3 Eletroforese.....	33
5.6.4 Purificação.....	33
5.6.5 Curva de dissociação (qPCR-HRM).....	34
5.6.6 Sequenciamento.....	35
<b>5.7 Análise dos dados</b> .....	36

5.7.1 Análise da curva de dissociação (qPCR-HRM) .....	36
5.7.2 Análises das sequências em banco de dados .....	36
<b>5.8 Considerações éticas</b> .....	36
<b>6 RESULTADOS</b> .....	37
<b>6.1 Otimização do sistema K26 PCR</b> .....	37
<b>6.2 <i>Screening</i> das amostras de DNA</b> .....	38
<b>6.3 Ensaios da K26 PCR em amostras clínicas</b> .....	39
<b>6.4 Ensaios de PCR em tempo real (qPCR-HRM)</b> .....	40
<b>6.5 Sequenciamento</b> .....	42
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>APÊNDICE A - Alinhamento das sequencias</b> .....	51
<b>ANEXO A - Parecer de aprovação do CEP</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença crônica grave causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*). É considerada uma infecção oportunista para os indivíduos imunodeprimidos, como nos casos de infecção por HIV, onde a LV representa um fator de risco para recidiva. Assim, recomenda-se a aplicação de ferramentas para caracterização de cepas de *Leishmania spp.*, revelando quais são os possíveis genótipos circulantes entre os hospedeiros, reservatórios e vetores do parasita, fortalecendo as estratégias de controle e monitoramento efetivo da doença (CHICHARRO *et al.*, 2013).

A técnica considerada padrão ouro para caracterização das espécies de *Leishmania* é a eletroforese de isoenzimas (MLEE), que é uma técnica laboriosa, cara, demorada, além de necessitar de grande quantidade de *Leishmania* em cultura (HIDE *et al.*, 2001). As ferramentas imunológicas baseadas em anticorpos monoclonais também são utilizadas na caracterização de espécies de *Leishmania spp.* do Novo e Velho Mundos, entretanto, podem existir variações intraespecíficas de reatividade aos antígenos espécie-específicos (McMAHON-PRATT; DAVID, 1981; SHAW *et al.*, 1986). No entanto, as técnicas de PCR e suas variantes têm sido bastante empregadas em estudos de caracterização molecular de espécies, utilizando pequena quantidade de material biológico para identificação de agentes infecciosos. Diversos alvos são estudados para o complexo *L. donovani*, tais como: minicírculo do cinetoplasto (kDNA), tornando-se alvo de interesse por apresentar numerosas cópias por célula (SILVA, Maria *et al.*, 2010); o espaçador interno transcrito (ITS), alvo de estudos para identificação das espécies de *Leishmania*, quando associado à PCR-RFLP (SCHÖNIAN *et al.*, 2003); genes codificantes de proteínas de choque térmico (HSPs), devido a importância que a família de proteínas HSP70 exerce, por ser considerada imunógeno para leishmaniose visceral (FRAGA *et al.*, 2013) e o gene K26, onde codifica uma proteína de superfície com função antigênica (HARALAMBOUS *et al.*, 2008).

*Hydrophilic acylated surface protein B* (HASP<sub>B</sub>), também conhecida como K26, é uma proteína que faz parte de uma família heterogênea de moléculas de superfície das espécies do gênero *Leishmania* (McKEAN *et al.*, 1997). A proteína é considerada polimórfica, constituída por uma série de domínios de aminoácidos repetitivos, estando presente nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, onde favorece a metaciclogênese, juntamente com a localização da forma promastigota no intestino médio do vetor flebotomíneo (SADLOVA *et al.*, 2010). A proteína HASP<sub>B</sub> apresenta potencial

antigênico, demonstrando aplicabilidade para o sorodiagnóstico, definindo as infecções promovidas pelo complexo *L. donovani* (MOHAPATRA *et al.*, 2010).

O gene K26 é considerado marcador molecular para leishmaniose visceral, apesar de ser polimórfico, sendo conservado e específico para o complexo *L. donovani*. *Primers* específicos (K26F/K26R) foram desenhados para discriminar parasitas do complexo *L. donovani* obtidos diretamente do meio de cultivo (HARALAMBOUS *et al.*, 2008). Esse alvo direciona estudos de diversidade genética em *L. infantum* e *L. donovani*, associando os polimorfismos gênicos à origem geográfica das cepas, tornando possível a distinção entre as espécies *L. infantum* e *L. donovani* de acordo com o tamanho do *amplicon*.

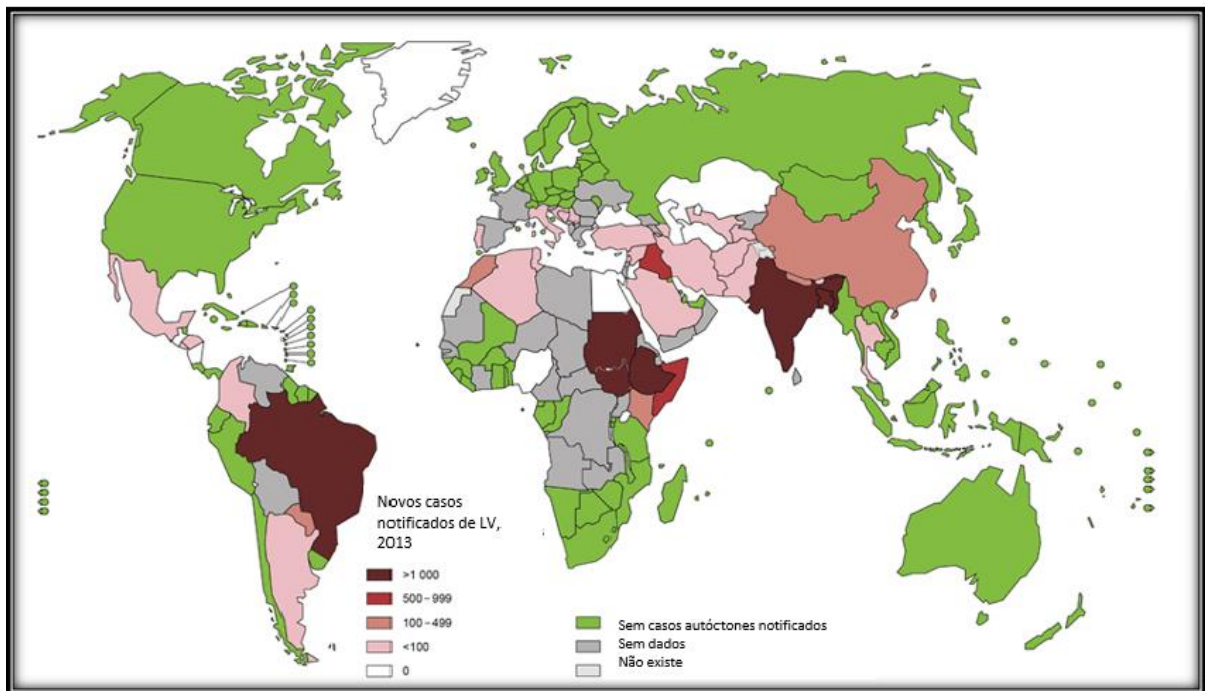
As informações referentes às alterações polimórficas intraespecíficas de *L. infantum* são restritas na literatura, principalmente quando obtidas a partir de amostras clínicas confirmadas para a LV e para a coinfeção (LV/HIV), onde análises apuradas tornam-se necessárias para o estabelecimento de um perfil polimórfico específico presente no Estado de Pernambuco. O objetivo do trabalho foi analisar as regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral

A Leishmaniose visceral (LV) é considerada doença endêmica em 98 países (Figura 1), cuja presença é evidenciada em quatro continentes (ALVAR *et al.*, 2012). As áreas rurais pobres do leste da África (Sudão, Etiópia, Quênia, Uganda), Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal), e América Latina (Brasil) representam os principais pontos de notificação para a doença (CHAPPUIS *et al.*, 2006).

**Figura 1** - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral no Velho Mundo e no Novo Mundo.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2013, tradução nossa).

Doença considerada negligenciada, com distribuição mundial principalmente nas zonas tropicais e subtropicais, onde 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco da infecção e cerca de 500 mil são afetadas, sendo a responsável por aproximadamente 50 mil mortes ao ano (FAUCHER; PIARROUX, 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Entre as doenças negligenciadas, a LV possui nível III de prioridade para Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007).

Na América Latina, o Brasil destaca-se por possuir maior endemicidade, apresentando casos notificados em 21 unidades da federação, estando a doença em expansão nas regiões



Centro-Oeste, Norte e Sudeste. A região Nordeste do Brasil possui 53,6% das notificações do país (BRASIL, 2011). No país, a importância da LV reside não somente na sua alta incidência, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes, atingindo principalmente pessoas que vivem em situações socioeconômicas precárias (ALVARENGA *et al.*, 2010; DESJEUX, 2004). A manifestação da forma clássica da doença acomete pessoas de todas as idades, tornando-se mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos (SILVA, Eduardo *et al.*, 2001). Proporcionalmente, o sexo masculino é o mais afetado e em alguns focos urbanos estudados existe a tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (BRASIL, 2014; SILVA, Eduardo *et al.*, 2001).

Segundo Dantas-Torres (2006) houve uma evolução na distribuição geográfica da LV no Estado de Pernambuco entre os anos de 1999 e 2000, com registro de casos em 119 municípios, representando praticamente todo o território pernambucano. O Sertão apresenta grande concentração dos casos, superando os casos registrados no Agreste e na Região Metropolitana do Recife neste mesmo período.

A partir de 1979, alguns casos de LV foram notificados durante a imunossupressão resultante de processos patológicos, de doenças inflamatórias crônicas e em tratamentos de doenças autoimunes ou transplantes de órgãos, durante a terapia imunossupressora. Em diferentes partes do mundo também foram relatados casos de LV durante a infecção pelo HIV (DEDET; PRATLONG, 2000).

O primeiro relato de caso de leishmaniose humana associado com o HIV foi descrito no sul da Europa por Loma *et al.* (1985) e a partir disto, dados estatísticos apontaram que entre os 33 países notificados para a coinfeção LV/HIV-aids até 1998, a Espanha, Itália, França e Portugal representavam 85% dos 1700 casos primariamente reportados, destacando o uso de drogas endovenosas como o principal fator responsável pela transmissão artificial das formas amastigotas de *Leishmania* nos países do Mediterrâneo. A metaciclogênese de *Leishmania* tem se tornado desnecessária nos países do Mediterrâneo, pelo fato do ciclo antroponótico de transmissão estar consolidado (NUNO-MARQUES *et al.*, 2007; PAREDES *et al.*, 2003). A infecção pelo HIV pode reativar a infecção latente por *Leishmania*, aumentando o nível de transmissão por flebotomíneos e facilitar a transmissão artificial de *Leishmania* (transmissão humano-humano) (MOLINA *et al.*, 2003).

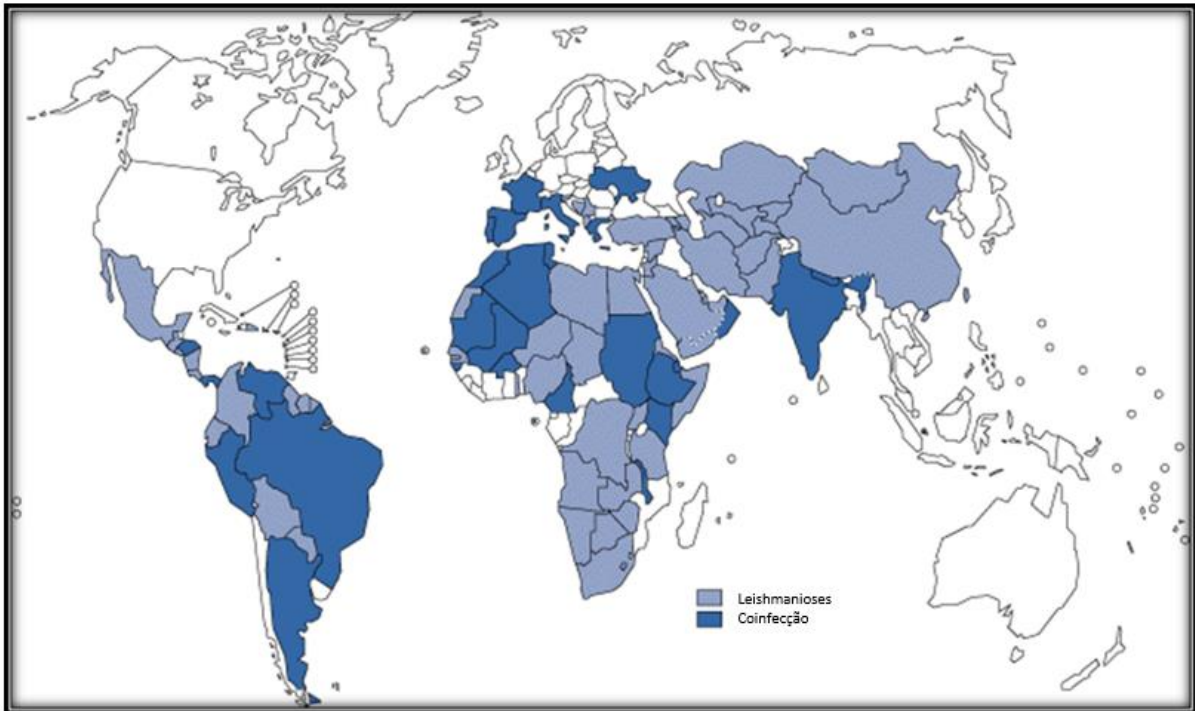
O aumento no número dos casos de coinfeção tem sido registrado, totalizando 35 países (Figura 2) com casos detectados (CRUZ *et al.*, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL

DE SAÚDE, 2007). Este aumento no número de casos de coinfeção surge da sobreposição com a epidemia de aids, principalmente em áreas onde a LV é endêmica, onde a infecção pelo HIV aumenta o risco do desenvolvimento da LV de 10-100 vezes. Mudanças epidemiológicas, tais como o aumento da população em zonas suburbanas, onde o vetor e o reservatório são abundantes, aumentaram esta sobreposição (CRUZ *et al.*, 2006). A LV acelera a progressão do HIV a condição da aids, o que aumenta a letalidade, tornando-se cinco vezes maior durante a coinfeção (DRUZIAN *et al.*, 2015; PINTADO; LOPES-VELEZ, 2001). Uma justificativa plausível é que as formas amastigotas possam induzir a replicação viral durante a infecção dos macrófagos (CRUZ *et al.*, 2006; GUERIN *et al.*, 2002).

No Brasil, esta associação também tem sido descrita de maneira crescente, sendo o país que apresenta mais de um terço dos casos de coinfeção da América Latina. No país, estudos referentes à coinfeção estão concentrados em relatos de casos locais e estudos de revisão (ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010; BERMAN, 2006; BORGES *et al.*, 1999; CALICH *et al.*, 1991; CARNAUBA *et al.*, 2009; CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2009; CAVALCANTI *et al.*, 2012; COTA *et al.*, 2011, 2012, 2013, 2014; DAHER *et al.*, 2009; DIEHL *et al.*, 2004; DRUZIAN *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2001; LINDOSO *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 1996; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; MALAFAIA, 2009; ORSINI *et al.*, 2002; RABELLO *et al.*, 2003; SILVA, Eduardo *et al.*, 2002; SILVA, Elis *et al.*, 2013; SOUSA-GOMES *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 1994).

No período de 2001 a 2010, foram confirmados 35.819 casos para LV no Brasil, dos quais 760 apresentavam a coinfeção LV/aids e 541 pela LV/HIV, o que revela o aumento progressivo do número de casos no país (SOUSA-GOMES, 2011).

**Figura 2** - Áreas com sobreposição da coinfeção LV/HIV-aids no mundo.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2007, tradução nossa).

## 2.2 Classificação taxonômica

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae que agrupa protozoários unicelulares, digenéticos (heteróxeos) (NEVES, 2012). As espécies *Leishmania (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* são responsáveis pela LV no mundo. No Continente Americano, a espécie que se destaca por apresentar importância epidemiológica é a *Leishmania (L.) chagasi*, onde Cunha e Chagas (1938) a consideram idêntica a *Leishmania (L.) infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia; no entanto, a espécie responsável pela doença no Velho Mundo é *L. (L.) donovani* (BRASIL, 2009; DOURADO *et al.*, 2007; FAUCHER; PIARROUX, 2011; GONTIJO; MELO, 2004).

A taxonomia do gênero *Leishmania* é fundamentada em duas correntes científicas: A primeira é baseada em dados genéticos e enzimáticos, que defendem a classificação de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* como mesma espécie, pelo fato de apresentarem diferenças mínimas a nível molecular (LUKES *et al.*, 2007; MAURICIO *et al.*, 2000) e, por isso, devendo ser consideradas sinônimas. A segunda considera que características fenotípicas e genotípicas as definem como espécies diferentes, separando em duas subespécies, atribuindo os nomes *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005), sendo esta, aceitável por alguns pesquisadores (SHAW, 2006).

A definição de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* como sinônimas é a mais adotada, devendo ser utilizada até que uma nova classificação para o gênero *Leishmania* seja proposta. A nomenclatura utilizada para descrever a espécie responsável pela LV nas Américas é *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (DANTAS-TORRES, 2006; LUKES *et al.*, 2007; MAURICIO *et al.*, 2000).

### 2.3 Aspectos biológicos do ciclo

Os hospedeiros invertebrados capazes de transmitir a LV são as fêmeas dos insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos (Diptera: Psychodidae da subfamília Phlebotominae), onde a espécie *Lutzomyia longipalpis* é a transmissora da doença no Brasil (Figura 3) (BRASIL, 2009; REY, 2011).

**Figura 3** - Fêmea do vetor (*Lutzomyia longipalpis*) responsável pela transmissão da Leishmaniose Visceral na América Latina.

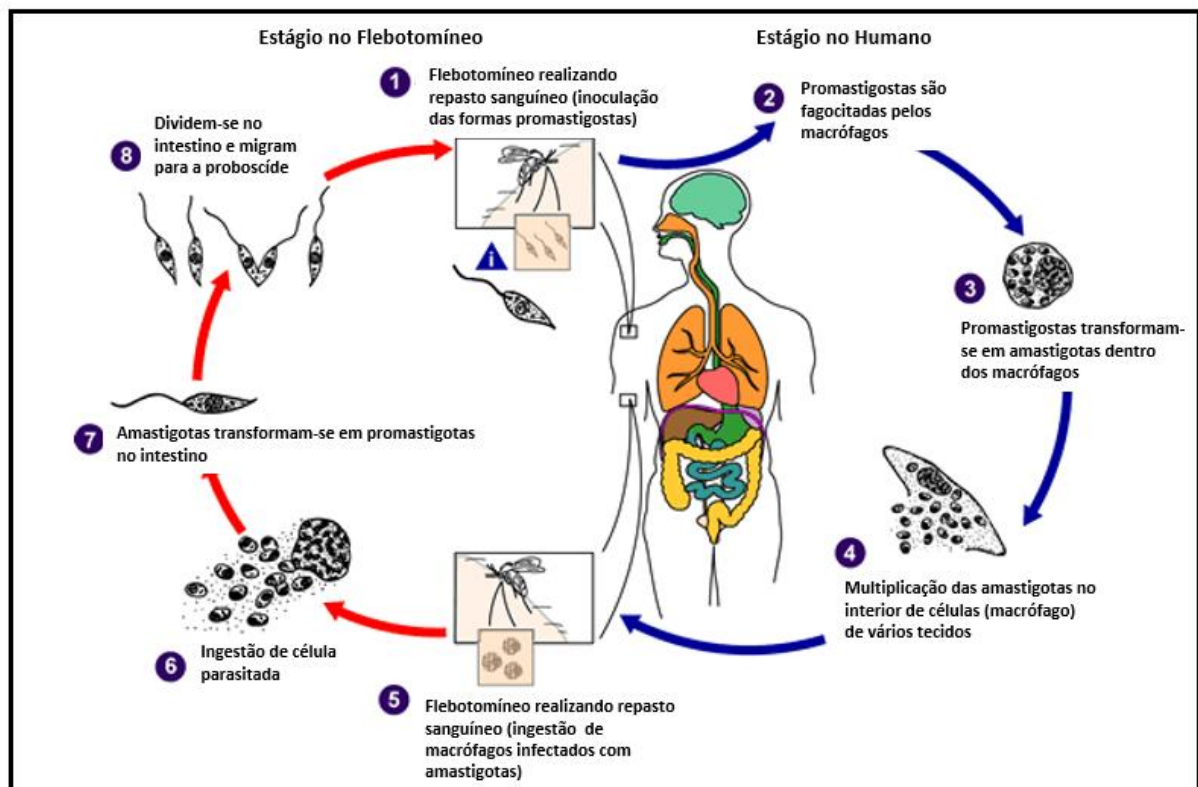


Fonte: Wikipedia (2013 apud BARBOSA JÚNIOR, 2013).

A infecção do vetor ocorre durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ao ingerir macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No intestino médio do inseto, o alimento é revestido por uma membrana quitinosa, a matriz peritrófica, onde ocorre a diferenciação das amastigotas em formas promastigotas, que se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária, seguindo pela porção torácica do intestino do vetor até a completa diferenciação em promastigotas metacíclicas (BRASIL, 2006; NEVES, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Ao realizar um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado (roedores,

canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e entre estes, o homem) o inseto vetor libera pela probóscide as formas promastigotas metacíclicas, que serão fagocitadas pelas células dendríticas e macrófagos do hospedeiro. No interior dessas células ocorre a diferenciação das promastigotas em amastigotas, que irão se multiplicar intensamente até o rompimento das células hospedeiras, levando à liberação das amastigotas que poderão se disseminar pelo sistema vascular e linfático para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea ou ser ingeridas por novos insetos vetores (Figura 4) (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

**Figura 4** - Ciclo de vida do gênero *Leishmania*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013, tradução nossa).

## 2.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico preciso é uma ferramenta importante no tratamento da LV, sendo este, categorizado em três grupos de exames: os exames parasitológicos, os diagnósticos imunológicos e os métodos moleculares. Os métodos adotados no diagnóstico da coinfeção são os mesmos empregados para a definição de LV, ressaltando a importância da associação de informações clínicas e epidemiológicas aos resultados de laboratório (BRASIL, 2011).

#### 2.4.1 Exames parasitológicos

O diagnóstico parasitológico é considerado o “padrão-ouro” no diagnóstico da LV, pelo fato de apresentar elevada especificidade de detecção. Há décadas, a detecção do parasita é considerada o diagnóstico definitivo para esta doença (SINGH *et al.*, 2009). A visualização das formas amastigotas em material de biópsia ou punção aspirativa de baço, medula óssea, fígado ou linfonodo torna-se possível em preparações após coloração com Giemsa ou Leishman (BABIKER *et al.*, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Os aspirados esplênicos apresentam elevada sensibilidade, porém não são muito utilizados devido à dificuldade técnica e operacional, onde há riscos de hemorragias durante o procedimento de coleta (SUNDAR; RAI, 2002). A punção aspirativa de medula óssea é referência para a definição da LV no Brasil (BRASIL, 2006). O exame tem apresentado baixa sensibilidade no grupo de pacientes coinfectados, onde o cultivo dos aspirados torna-se uma alternativa para aumento da sensibilidade diagnóstica (DENIAU *et al.*, 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A *Leishmania* pode ser isolada em cultivo nos meios NNN (Novy-McNeal-Nicolle), porém nos meios Schneider e LIT (Liver Infusion Triptose) se obtém maior taxa de positividade em menor tempo. As culturas devem ser observadas durante quatro semanas, devendo ser mantidas entre 24-26°C (BRASIL, 2006; SINGH, 2006).

#### 2.4.2 Diagnóstico imunológico

Além do diagnóstico parasitológico, existem outros métodos para diagnóstico de LV que apresentam boa sensibilidade e especificidade (GONTIJO; MELO, 2004). Os testes sorológicos, baseados na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos brutos e recombinantes de *Leishmania* têm muito valor no diagnóstico da LV, devido à estimulação de linfócitos B, resultando em hipergamaglobulinemia, onde aumenta a produção de anticorpos na LV (GONTIJO; MELO, 2004). Entretanto, existe a possibilidade de falsos resultados positivos, resultantes de reações cruzadas com tripanossomíases, tuberculose e toxoplasmose (SUNDAR; RAI, 2002). Tem-se disponíveis testes com diferentes aplicabilidades, com relação às condições de campo em que são utilizados e na disponibilidade dos reagentes. São eles: o teste de aglutinação direta (DAT), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os testes imunocromatográficos e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (SUNDAR; RAI, 2002).

O DAT foi desenvolvido por El Harith et al. (1986), onde é um método semiquantitativo de boa sensibilidade e especificidade, que é baseado na reação entre anticorpos na presença de antígenos (promastigotas mortas), tripsinizados, fixados com formalina e corados com azul brilhante. Os soros dos pacientes são diluídos em série, incubados juntamente ao antígeno, onde é possível visualizar a aglutinação apenas no dia seguinte (SUNDAR; RAI, 2002). Romero e Boelaert (2010) realizaram uma meta-análise com o objetivo de avaliar o desempenho do DAT em pacientes com LV, onde os resultados apresentaram estimativas de sensibilidade e especificidade de 94,8%.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é uma técnica bastante utilizada desde 1964 para o diagnóstico da LV, principalmente pelos países da América do Sul (COTA *et al.*, 2011; DUXBURY; SADUN, 1964). Consiste em uma reação antígeno-anticorpo, visualizada com o auxílio de um conjugado, onde os resultados da reação são representados por diluições. Dependendo do antígeno utilizado (espécie de *Leishmania* ou preparação antigênica) a sensibilidade pode variar, de 82 a 95% e especificidade de 78 a 92% (MAIA *et al.*, 2012).

O teste imunocromatográfico, rápido e simples, fornecido pela DiaMed IT-LEISH<sup>®</sup> é bastante utilizado para o diagnóstico da LV, onde utiliza a proteína recombinante rK39, que é específica para o complexo *L. donovani*, reagente com o soro ou sangue do paciente. O teste apresenta resultados de sensibilidade entre 98 e 100% em alguns estudos (ASSIS *et al.*, 2008; BURNS *et al.*, 1993). Sundar *et al.* (2003) aplicou o teste no nordeste da Índia, constatando sensibilidade de 100% e especificidade de 95%. O teste parece ser promissor para uso em programas de saúde pública, pois requer pequena quantidade de sangue periférico, é de rápida execução e leitura (10 minutos) e pode ser utilizado em condições de campo (SINGH *et al.*, 2009).

O teste de ELISA baseia-se em uma ligação de anticorpos com antígenos brutos solúveis, que é identificada por um conjugado marcado com enzima, de maneira que esta enzima age sobre um substrato e a reação faz com que um reagente cromógeno mude de cor (ASSIS *et al.*, 2008; SUNDAR; RAI, 2002). A técnica apresenta considerável sensibilidade, porém, sua especificidade é dependente do antígeno utilizado. Valores entre 80 a 100% de sensibilidade e 71 a 100% de especificidade foram descritos quando os testes de ELISA utilizaram um antígeno bruto de *Leishmania spp.* (ASSIS *et al.*, 2008; SUNDAR; RAI, 2002).

Cada teste sorológico tem suas limitações, mas na coinfeção isso é ainda mais pronunciado, onde é recomendada a utilização de mais de um teste sorológico a fim de aumentar a sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos (PINTADO; LOPES-

VELEZ, 2001). Geralmente encontram-se títulos baixos de anticorpos para *Leishmania* durante a coinfeção, uma vez que a infecção pelo HIV está associada aos distúrbios pronunciados do sistema imunitário, relacionados à ativação de células B policlonais e comprometimento da apresentação de antígenos (ALVAR *et al.*, 2008; DENIAU *et al.*, 2003). Entre estes pacientes, mais de 50% não têm níveis detectáveis de anticorpos para *Leishmania* (ALVAR *et al.*, 1997; MEDRANO *et al.*, 1998). Durante a coinfeção, a resposta humoral e celular para a doença é diminuída, o que aumenta o risco de reativação, levando a maior taxa de falha no tratamento (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Nas tentativas de diagnóstico para LV, tem-se procurado por exames não invasivos, onde a urina se torna uma boa opção para definição de casos positivos. Um novo teste rápido foi desenvolvido, baseado na aglutinação de partículas de látex recobertas com anticorpos policlonais (KAtex; Kalon Biological Ltd., Aldershot, Hants, United Kingdom) para detecção de um carboidrato antigênico de 5-20 kDa termoestável, de baixo peso molecular, que é excretado na urina de pacientes com LV (SARKARI *et al.*, 2002). A sensibilidade e especificidade alegadas são de 87,2% e de 100% respectivamente (ATTAR *et al.*, 2001). Riera *et al.* (2004) realizou um estudo na Espanha aplicando o KAtex, destacando sensibilidade de 85,7% para o teste. O KAtex pode ser utilizado como critério de cura para LV quando instituída a quimioterapia, devido à redução gradual da antigenúria (ALVAR *et al.*, 2008).

O método de coleta da urina é não invasivo, não causando inconveniências ao paciente. A pesquisa de antígeno na urina é considerada uma técnica promissora, principalmente para pacientes imunodeprimidos, sendo capaz de identificar com maior eficiência as infecções ativas (GAVGANI *et al.*, 2008; SARKARI *et al.*, 2002; SUNDAR *et al.*, 2007).

#### 2.4.3 Métodos moleculares

Desde a década de 80, ferramentas moleculares baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram desenvolvidas para a detecção e identificação precisa dos parasitas do gênero *Leishmania* (GONTIJO; MELO, 2004). Através desse método, o DNA de *Leishmania* pôde ser detectado em grande variedade de amostras biológicas, tais como sangue periférico, soro, urina, aspirados de medula óssea, baço, fígado ou linfonodos (ASSIS *et al.*, 2008). Inúmeros sistemas baseados em PCR nas amostras de sangue periférico e medula óssea têm sido desenvolvidos para *Leishmania*, com várias sequências-alvo, juntamente com um



grande número de *primers* desenhados (ARORA *et al.*, 2008). A técnica de PCR torna-se mais sensível quando o alvo a ser amplificado apresenta múltiplas cópias (LACHAUD *et al.*, 2002).

O DNA do cinetoplasto (kDNA) apresenta-se em múltiplas cópias no genoma de *Leishmania spp.*, tornando-se um alvo bastante utilizado em ensaios de PCR. O kDNA contém genes que codificam proteínas mitocondriais, assim distribuídos em cerca de 50 maxicírculos com 20.000 a 35.000 pb e 10.000-20.000 minicírculos, com sequencias de 500 a 2500 pb (CORTES, 2008). O espaçador interno transcrito 1 (ITS1) também é um alvo bastante explorado como ferramenta diagnóstica para *Leishmania spp.*, localizado na região organizadora nucleolar delimitada pelos genes 18S e o 5.8S, apresentando cerca 100 a 500 cópias no genoma (POLANCO *et al.*, 1998; SCHÖNIAN *et al.*, 2003).

O diagnóstico molecular requer quantidade muito pequena de DNA para detecção do parasita, tendo como vantagens a rapidez na execução, a isenção de interpretação subjetiva e a capacidade de monitoramento terapêutico, sendo assim, vista como uma técnica alternativa quando o paciente apresenta suspeita clínica, com microscopia e/ou a sorologia negativas ou indeterminadas (ALLAM *et al.*, 2009; NUNO-MARQUES *et al.*, 2007). O método apresenta elevada sensibilidade, acima de 90% e especificidade próxima a 100%, tornando-se adequada para procedimentos de diagnóstico (ASSIS *et al.*, 2008). A PCR detecta mais infecções assintomáticas que o exame direto, devido à elevada sensibilidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A PCR em tempo real (qPCR) é uma ferramenta molecular bastante utilizada na pesquisa e diagnóstico de leishmaniose visceral, demonstrado sensibilidade acima de 91.3%, detecção de 0,001 parasitas/ml, e especificidade de 61.82-100% (LACHAUD *et al.*, 2000; LIMA JUNIOR *et al.*, 2013; MARY *et al.*, 2004; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). A ferramenta proporciona detecção rápida, sensível e acurada do patógeno, onde não requer manipulação pós-PCR, evitando potenciais contaminações com produtos amplificados, tornando-se promissora para aplicabilidade diagnóstica (CORTES, 2008; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010).

A PCR tem se tornado uma ferramenta útil para monitorar a eficácia do tratamento, juntamente com a previsão de relapsos em pacientes coinfectados LV/HIV (ANTINORI *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2002; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; RIERA *et al.*, 2005).

## 2.5 Caracterização das espécies no gênero *Leishmania*

A técnica considerada padrão ouro para caracterização das espécies de *Leishmania* é a eletroforese de isoenzimas (MLEE); apesar de ser uma técnica laboriosa, cara, demorada e necessitar de grande quantidade de *Leishmania* em cultura; não sendo indicada para tipagem das espécies do complexo *L. donovani*, pelo fato de não as distinguir facilmente (HARALAMBOUS *et al.*, 2008; HIDE *et al.*, 2001; JAMJOOM *et al.*, 2004; RIOUX *et al.*, 1990).

As ferramentas imunológicas baseadas em anticorpos monoclonais são empregadas na caracterização de espécies de *Leishmania spp.* do Novo e Velho Mundos (McMAHON-PRATT *et al.*, 1981, 1982, 1985). Os anticorpos monoclonais são importantes para o direcionamento de estudos epidemiológicos e taxonômicos, apesar de existir variações intraespecíficas de reatividade aos antígenos espécie-específicos (SHAW *et al.*, 1986).

Os principais estudos de caracterização molecular das espécies de *Leishmania* são baseados nas técnicas de PCR convencional associadas à RFLP, amplificação randômica de polimorfismos no DNA (RAPD) e Tipagem de Microssatélites Multilocus (MLMT) (BAÑULS *et al.*, 1999; BULLE *et al.*, 2002; OCHSENREITHER *et al.*, 2006; SCHÖNIAN *et al.*, 2003, 2008). As técnicas de PCR constituem as ferramentas mais empregadas nos estudos de caracterização, pois utilizam pequena quantidade de material biológico para identificação de agentes infecciosos (BHATTARAI *et al.*, 2009).

Diversos alvos são estudados para o complexo *L. donovani*: o minicírculo do cinetoplasto (kDNA), tornando-se alvo de interesse por apresentar numerosas cópias por célula (SILVA, Maria *et al.*, 2010); o espaçador interno transcrito (ITS), estudado para identificação de espécies de *Leishmania*, quando associado à RFLP (SCHÖNIAN *et al.*, 2003); genes codificantes de proteínas de choque térmico (HSPs), devido a importância que os genes HSP70 e HSP20 desempenham para caracterização molecular das espécies de *Leishmania* direcionando estudos filogenéticos (FRAGA *et al.*, 2010, 2013) e o gene K26, considerado marcador molecular para LV, sendo conservado e específico para o complexo *L. donovani* (HARALAMBOUS *et al.*, 2008).

## 2.6 Análise dos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos são classificados de acordo com o tipo de repetição nucleotídica em uma sequência gênica. Os microssatélites são caracterizados por repetições de sequências de 2

a 5 nucleotídeos (*Small tandem repeats*-STR), no entanto, os minissatélites apresentam número variável de repetições, com sequências de nucleotídeos maiores (*Variable number of tandem repeats*-VNTR). A variação de apenas um único nucleotídeo é denominado SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*), sendo este tipo amplamente distribuído pelos genomas. Uma grande proporção de SNPs localiza-se em regiões que precedem fases de leitura aberta do gene ou em regiões intergênicas reguladoras da expressão do gene, sendo responsáveis pelo estabelecimento de fenótipos que expressam diferentes quantidades de proteínas codificadas, denominados “polimorfismos funcionais”, ao lado de variantes que levam a modificação da própria proteína (FRADE *et al.*, 2010).

A curva de dissociação de alta definição (qPCR-HRM), gerada pós-amplificação, é considerada uma ferramenta sensível de análise molecular para detecção de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs), medindo a taxa de dissociação da fita dupla de DNA de acordo com o aumento da temperatura. Essa dissociação é monitorada por intermédio de um corante fluorescente (Syber Green®) que se intercala no DNA de fita dupla e progressivamente se dissocia com o aumento da temperatura, reduzindo a emissão de fluorescência. A dissociação do DNA depende de alguns fatores, como o tamanho da sequência analisada e o conteúdo de bases GC do segmento (DUFRESNE *et al.*, 2006; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010; WOLFF *et al.*, 2008).

A qPCR-HRM é utilizada na identificação de doenças genéticas e duplicações de sequências organizadas em tandem, em escaneamentos de mutações simultâneas e genotipagem. A ferramenta também é utilizada para detecção de infecções diretamente no sangue ou em tecidos infectados, tornando-se vantajosa quando comparada aos exames parasitológicos que necessitam de cultivo e crescimento dos patógenos (TALMI-FRANK *et al.*, 2010).

## **2.7 Hydrophilic acylated surface protein B (HASP B)**

*Hydrophilic acylated surface protein B* (HASP B), também conhecida como K26, é uma proteína codificada por um grupo de genes ortólogos conhecidos como LmcDNA16, localizados no cromossomo 23, fazendo parte de uma família heterogênea de moléculas de superfície das espécies do gênero *Leishmania* (FLINN; SMITH, 1992; McKEAN *et al.*, 1997). A proteína é descrita como polimórfica, constituída por uma série de domínios de aminoácidos repetitivos (ALCE *et al.*, 1999). As regiões repetitivas descritas para a proteína

HASPB de *L. infantum* possuem 64% de similaridade às regiões repetitivas de *L. major*, variando em 14 aminoácidos (BHATIA *et al.*, 1999; McKEAN *et al.*, 1997).

A molécula está presente nas formas promastigotas e amastigotas do parasita (Figura 4), onde favorece a metacicloênese, juntamente com a localização da forma promastigota no intestino médio do vetor flebotomíneo (SADLOVA *et al.*, 2010). Desde a década de 90, o potencial antigênico da proteína HASPB vem sendo constantemente estudado. A proteína HASPB tem demonstrado aplicabilidade para o sorodiagnóstico, definindo infecções promovidas pelo complexo *L. donovani* (BATHIA *et al.*, 1999; MOHAPATRA *et al.*, 2010; SUNDAR *et al.*, 2007).

Haralambous *et al.* (2008) desenhou *primers* específicos (K26R/K26F) para discriminar parasitas do complexo *L. donovani*, direcionando estudos de diversidade genética, com a associação dos polimorfismos gênicos a origem geográfica das cepas. No estudo, a sensibilidade do sistema K26 foi de aproximadamente 50 pg para cepas de *L. infantum* (LEM75) e *L. donovani* (LEM3463), não sendo realizados ensaios de especificidade para outras espécies de microrganismos de importância clínico-epidemiológica. Neste mesmo trabalho, são realizados ensaios com o sistema K26 diretamente em DNA extraído de amostras de sangue periférico e aspirados de medula óssea e linfonodo de humanos e cães, sem o isolamento prévio do parasita em meio de cultivo; entretanto, esses resultados não foram divulgados. O artigo sugere que os polimorfismos localizados no gene K26 são responsáveis pelas diferenças entre os tamanhos dos *amplicons*, possibilitando a diferenciação entre as espécies do complexo *L. donovani* em diferentes áreas endêmicas. Outros estudos desenvolvidos no leste Africano utilizaram a PCR como ferramenta molecular para localização do gene K26 em isolados do parasita, diferenciando as espécies *L. infantum* e *L. donovani* de acordo com o tamanho do amplicon (GADISA *et al.*, 2010; ZACKAY *et al.*, 2013). No entanto, as informações referentes aos polimorfismos do gene K26 ainda são escassas na literatura.

Zackay *et al.* (2013) demonstraram que o uso da K26 PCR, qPCR-HRM, associados ao sequenciamento dos amplicons foram capazes de identificar as regiões polimorfismos existentes no gene HASPB nas espécies *L. donovani* e *L. infantum* em diferentes regiões do leste africano. A literatura não apresenta os resultados de ensaios aplicando o sistema K26 PCR diretamente em DNA extraído de sangue periférico de pacientes positivos para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV.

### 3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral é uma doença grave que atinge principalmente a população dos países em desenvolvimento, onde exige estratégias de controle para monitoramento efetivo da doença. Torna-se necessário o uso de ferramentas para caracterização molecular de cepas, revelando quais são os possíveis genótipos circulantes entre os hospedeiros, reservatórios e vetores de *Leishmania* (CHICHARRO *et al.*, 2013).

O estudo do gene codificante da proteína de superfície (HASPB) complexo-específica de *Leishmania* direciona os estudos de epidemiologia molecular, relacionando as variações polimórficas nucleotídicas, numéricas e organizacionais, à distribuição geográfica das leishmanioses. As informações referentes às alterações polimórficas intraespecíficas de *Leishmania infantum* são restritas na literatura, principalmente quando obtidas a partir de amostras clínicas confirmadas para a LV e para a coinfeção (LV/HIV), onde análises apuradas tornam-se necessárias.

Os estudos de caracterização das regiões gênicas polimórficas irão promover a difusão dos conhecimentos obtidos a partir da pesquisa básica, visando à consolidação de informações úteis direcionadas à codificação de proteínas com aplicabilidade para o sorodiagnóstico e a elaboração de vacinas.

A identificação dos polimorfismos no gene HASPB em área endêmica poderá localizar as principais alterações nucleotídicas de *L. infantum*, estabelecendo padrões distintos para a monoinfeção e coinfeção, consolidando a descrição de um perfil polimórfico específico admitido no Estado de Pernambuco.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Analisar as regiões polimórficas do gene HASPB (K26) de *Leishmania infantum* em amostras clínicas positivas para leishmaniose visceral e coinfeção LV/HIV.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a sensibilidade e especificidade do sistema K26 PCR;
- b) Utilizar dois sistemas de PCR simples, kDNA e ITS1/RFLP, como *screening* diagnóstico em amostras de DNA obtidas de pacientes;
- c) Aplicar o sistema K26 PCR em amostras de DNA positivas pelas ferramentas de *screening*;
- d) Localizar amplificações específicas para *L. infantum* a partir da curva de dissociação de alta definição (qPCR-HRM);
- e) Analisar os resultados do sequenciamento do gene K26 através de softwares de bioinformática.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Área de estudo**

O estudo foi desenvolvido no Estado de Pernambuco, localizado na região Nordeste do Brasil, envolvendo amostras de DNA referentes a casos clínicos procedentes da Região Metropolitana do Recife, Zona da Mata, Agreste e Sertão.

### **5.2 População de estudo**

O estudo foi desenvolvido com amostras de DNA positivas para LV e LV/HIV oriundas de pacientes acompanhados nos três principais serviços de referência para LV localizados em Recife – Pernambuco: o Hospital Universitário Oswaldo Cruz, vinculado a Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), Hospital Correia Picano da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco (HCP/SUS/SES-PE) e o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE).

### **5.3 Tipo do estudo**

O estudo foi experimental, utilizando amostras obtidas do banco de DNA do Laboratório de Doenças Transmissíveis do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ.

### **5.4 Amostra e critério de inclusão**

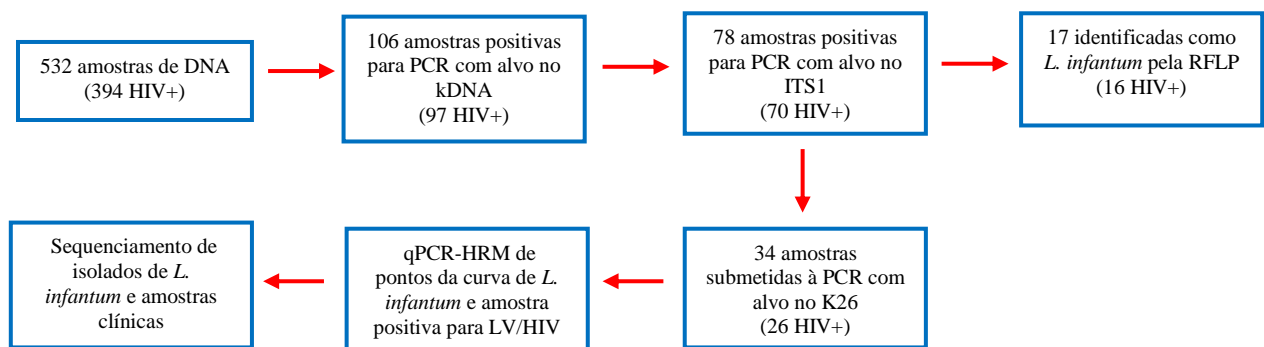
O DNA de amostras positivas para LV e para a coinfeção LV/HIV constituíram o universo do estudo.

### **5.5 Delineamento do estudo**

Inicialmente, o sistema K26 PCR foi otimizado utilizando cepas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75). Foi realizado o *screening* das amostras positivas para LV e coinfeção LV/HIV a partir de dois sistemas de PCR, kDNA e ITS1/RFLP, sendo posteriormente submetidas à K26 PCR. O estudo selecionou 532 amostras de DNA extraídas

de sangue total dos pacientes com suspeita clínica para LV, sendo 394 amostras provenientes de pacientes HIV+ (Figura 5). Ensaios de qPCR-HRM foram realizados, visando localizar temperaturas de *melting* específicas para *L. infantum* a partir da curva de dissociação de alta definição. Foram realizados ensaios para purificação de bandas a partir do *amplicon* de três isolados de *L. infantum* de pacientes, diretamente em gel de agarose a 4%, juntamente com as bandas provenientes da amplificação das amostras clínicas. As bandas purificadas foram submetidas ao sequenciamento.

**Figura 5** – Fluxo de atividades a partir do *screening* das amostras positivas.



Fonte: O autor.

## 5.6 Avaliação laboratorial

Os procedimentos laboratoriais aplicados neste estudo seguem categorizados nos subtópicos subsequentes.

### 5.6.1 Reação e cadeia da polimerase (PCR)

#### 5.6.1.1 Otimização da K26 PCR

A sensibilidade do sistema K26 PCR foi avaliada em curva de diluição de fator 10, extraído de cepas de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), e utilizando 20, 50, 100, 150 ng de DNA genômico, obtido das amostras clínicas. O desempenho da reação foi avaliado em concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e em gradiente de temperaturas de anelamento de 49,0; 49,6; 50,0; 50,4; 51,2; 52,0; 52,1 e 52,8 °C. A especificidade do sistema foi avaliada para as espécies de importância clínica e epidemiológica *L. braziliensis*,



*Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Wuchereria bancrofti*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium tuberculosis*. Um ensaio *in silico* foi realizado a partir do banco de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> e <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A K26 PCR foi preparada de acordo com as condições descritas por Haralambous et al. (2008), com as modificações descritas anteriormente: desnaturação inicial de 94° C por 5 min e 35 ciclos: 94° C por 30 s; gradiente 49,0 – 52,8 ° C por 15 s; 72° C por 1 min e extensão final de 72° C por 10 min (Quadro 1). As amplificações ocorreram no termocilador LifePro thermal cycler (Bioer Technology).

#### 5.6.1.2 Ferramentas de screening

Os *primers* utilizados na amplificação do DNA do cinetoplasto (kDNA) foram: RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') e RV2 (5'- CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3') (Quadro 1). O sistema Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA) foi utilizado para preparação do mix de reação de 25 µl, contendo 2 µl o DNA molde, 2,5 µl (10pmol/ µl) de cada primer, 1X PCR Buffer - Minus Mg, 400 µM dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U/ µl de Platinum® *Taq* DNA Polymerase. A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial 94° C por 5 min e 35 ciclos: 94° C por 30 s; 67° C por 1 min; 72° C por 30 s e uma extensão final a 70° C por 10 min. O alvo DNA do cinetoplasto (kDNA) produz um fragmento de 145pb (LE FICHOUX *et al.*, 1999).

Os *primers* utilizados na amplificação do espaçador interno transcrito 1 (ITS1) foram: LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'- TGATACCACTTATCGCACTT-3') (Quadro 1). O mix de reação de 50 µl era composto por 2 µl de DNA molde, 25 µl de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega Corp., Madison, WI) e 5 µl (10pmol/ µl) de cada primer. GoTaq® Green Master Mix é composto por 2x Green GoTaq reaction Buffer (pH 8.5), 400 µM dNTPs e 3 mM MgCl<sub>2</sub>. A amplificação foi realizada de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial 94° C por 3 min e 35 ciclos: 94° C por 40 s; 53° C por 45 s; 72° C por 1 min e uma extensão final a 72° C por 6 min. O alvo espaçador interno transcrito 1 (ITS1) produz um fragmento de 300 – 350 pb, dependendo da espécie de *Leishmania spp.* (SCHÖNIAN *et al.*, 2003).

As amplificações ocorreram no termocilador LifePro thermal cycler (Bioer Technology). Somente foram incluídas no estudo as amostras positivas simultaneamente para esses dois sistemas de PCR simples.

### 5.6.2 Análise de restrição de fragmentos polimórficos (RFLP)

Os produtos da ITS1 PCR (15 µL) foram digeridos com 1 µl de *Hae*III (10 U/ µl) a 37° C por 1h30min segundo as condições recomendadas pelo fornecedor (Invitrogen®, CA, USA). A enzima de restrição foi testada para sete espécies: *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. lainsoni* e *L. shawi*; sendo parâmetro de comparação para os produtos da ITS1 PCR das amostras clínicas (Figura 6). Os padrões de bandas foram comparados aos descritos para cada espécie em Schönian et al. (2003).

### 5.6.3 Eletroforese

As análises dos produtos de PCR foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 2,0% e 4,0%, este último para isolamento do *amplicon* do gene K26 e ITS1/RFLP. Os produtos de PCR foram corados por Blue Green Loading Dye 1 (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). As bandas de DNA foram separadas por eletroforese a 25 min em gel de agarose 2%, já 45 min para gel de agarose 4%, 90V em 1,0 x tampão TAE visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta, sendo fotografadas com um sistema de documentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

### 5.6.4 Purificação

As bandas de DNA provenientes da amplificação do sistema K26 PCR foram purificadas segundo as condições recomendadas pelo kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI).

**Quadro 1** - Sequencias dos *primers* com as respectivas temperaturas de anelamento.

<i>Primers</i>	Sequencias	Anelamento	Referência
RV1	5'-CTTTTCTGGTCCC GCGGGTAGG-3'	67°C	Le Fichoux <i>et al.</i> , 1999
RV2	5'-CACCTGGCCTATTTTACACCA-3'		
LITSR	5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'	53 °C	El Tai <i>et al.</i> , 2000
L5.8S	5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'		
K26R	5'-ACGAAGGACTCCGCAAAG-3'	Gradiente*	Haralambous <i>et al.</i> , 2008
K26F	5'-ACGAAGGACTCCGCAAAG-3'		

Fonte: O autor.

Nota: \* Gradiente de temperaturas de anelamento: 49,0; 49,6; 50,0; 50,4; 51,2; 52,0; 52,1 e 52,8 °C.

**Figura 6** – Digestão do *amplicon* da região ITS1 de diferentes espécies de *Leishmania* com a endonuclease de restrição *HaeIII*.

Fonte: O autor.

Nota: M - Marcador de peso molecular 100 pb; 1 - *L. infantum* (círculo); 2 - *L. braziliensis*; 3 - *L. amazonensis*; 4 - *L. guyanensis*; 5 - *L. mexicana*, 6 - *L. lainsoni*; 7 - *L. shawi*.

### 5.6.5 Curva de dissociação (qPCR-HRM)

Cinco pontos da curva de diluição de fator 10 (20 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg e 100 fg) (MHOM/BR/1974/PP75) e uma amostra positiva de paciente foram submetidos à PCR em tempo real. A água foi utilizada como controle negativo. O mix de reação de 50 µl foi composto de 10 µl de DNA molde, 25 µl de GoTaq® qPCR Master Mix, 2X (Promega Corp., Madison, WI) e 5 µl (10pmol/ µl) de cada primer K26F/K26R. GoTaq® qPCR Master Mix é composto de mix 2x contendo 1 corante GoTaq® Green, AmpliTaq Gold, DNA Polymerase LD, dNTPs com misturas de dUTP/dTTP e tampão. A amplificação foi realizada de acordo

com Zackay et al. (2013), com adaptações: desnaturação inicial de 94° C por 10 min e 40 ciclos: 94° C por 5 min; 55° C por 10 s; 72° C por 20 s, com rampa de HRM de 0,2 °C/s de 70 à 95 °C. A amplificação foi realizada no modelo Rotor-Gene Q real-time (QIAGEN, Alemanha) do Laboratório de Biologia Molecular de Vírus (LBMV) da Universidade de Pernambuco (UPE).

#### 5.6.6 Sequenciamento

As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz – PE, utilizando o equipamento ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Foi utilizado o Kit comercial ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento utilizada baseia-se no método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) que utiliza didesoxirribonucleotídeos acoplados a cromóforos fluorescentes. Os produtos das reações foram analisados em sequenciador ABI 3500xL Genetic Analyzer, desenvolvido pela Applied Biosystems.

Para a reação foram utilizados: 1 µl de primer K26F/K26R (3,2 pmol/µl), 0,5 µl de Bigdye® Terminator v3.1, 1 µl de Tampão de sequenciamento 5x (Tris-HCl, pH 9.0 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), 1 µl do produto de PCR purificado (10 ng/µL) e água MilliQ 10 µl q.s.p. O programa de amplificação seguiu a seguinte ciclagem: 1 ciclo a 94 °C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 50 °C por 10 s e 60 °C por 4 min. Para cada amostra foram realizadas 2 reações, sendo uma para o primer *forward* e outra para o reverso. Após amplificação, foi realizada a purificação/precipitação de DNA: ao volume total da reação de sequenciamento (10 µL) foi adicionado 2,5uL de EDTA (125mM, pH 8,0) e 25uL de etanol 100%. Após mistura em vórtex, a reação foi centrifugada a 3700 rpm por 45 minutos. O precipitado da reação foi lavado com 70 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 3700 rpm por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi solubilizado em 10 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e aplicado no sequenciador automático.

## 5.7 Análise dos dados

### 5.7.1 Análise da curva de dissociação (qPCR-HRM)

A curva de dissociação de alta definição (HRM) foi gerada pelo software Rotor-Gene Q real-time thermal analyser, versão 2.1.0 (QIAGEN, Alemanha).

### 5.7.2 Análises das sequências em banco de dados

As sequências de DNA obtidas foram analisadas através dos programas STADEN 1.6 -Pregap4, Trev e Gap4 (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK), 3100 Data Collection versão 1.1, Sequencing Analysis versão 3.7 (Applied Biosystems®, UK), e dos programas SeqMan™ II, EditSeq™, Megalign™, MapDraw™, pacote de programas Lasergene, versão 7.0 (DNASTAR® Inc., Madison, WI). Os dados gerados do sequenciamento das amostras foram comparados às sequências armazenadas no GenBank (EF504255, EF504256, EF504257, EF504258, DQ192034) aplicando o algoritmo BLAST. O alinhamento das sequências foi realizado a partir da ferramenta CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1997) do programa Megalign™ (DNASTAR® Inc., Madison, WI).

## 5.8 Considerações éticas

A proposta foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (CAEE: 34177614.0.0000.5190) (Anexo A), onde considera que o projeto não executa procedimentos relacionados às exigências de conduta envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 466/12 e complementares.

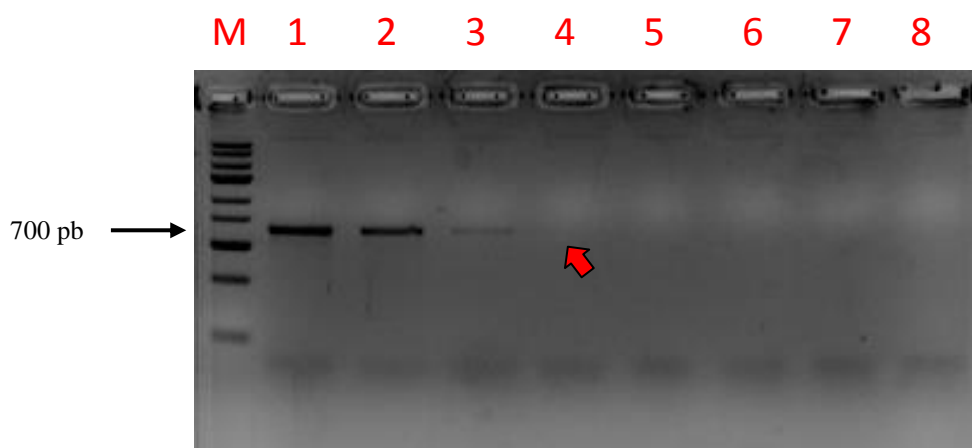
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Otimização do sistema K26 PCR

O limiar de detecção do DNA genômico de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) para a K26 PCR foi de 1pg (Figura 7). A sensibilidade da técnica foi estabelecida para concentração ótima de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) igual a 1,0 mM; entretanto, concentrações de 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM favoreceram o aparecimento de bandas espúrias. Com relação ao gradiente de temperaturas de anelamento avaliadas (49,0 - 52,8 °C), o melhor desempenho da reação foi a partir de 50 °C, onde a sensibilidade de detecção se manteve em 1pg de DNA. O sistema foi otimizado para volume final de 100  $\mu$ l/reação, sendo estabelecida concentração ótima de  $MgCl_2$  em 1,0 mM e temperatura de anelamento em 50°C. As demais condições foram mantidas segundo Haralambous et al. (2008).

Nos ensaios de especificidade, o sistema K26 foi negativo para espécies de tripanossomatídeos endêmicos na região Nordeste do Brasil (*L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*). As espécies *Schistosoma mansoni*, *Wuchereria bancrofti*, *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium tuberculosis* também foram negativas para esse sistema. O ensaio *in silico* com os *primers* K26F/K26R revelou a possibilidade de amplificação inespecífica para DNA genômico humano.

**Figura 7** – Curva de diluição de fator 10 para K26 PCR (700 pb).



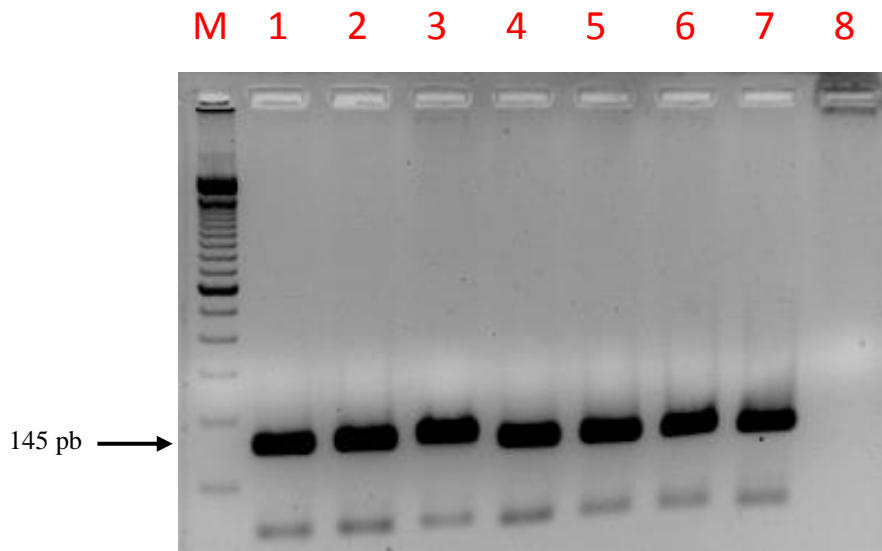
Fonte: O autor.

Nota: M – Marcador de peso molecular 200 pb. 1 – 1 ng; 2 – 100 pg; 3 – 10 pg; 4 – 1 pg (flecha); 5 – 100 fg; 6 – 10 fg; 7 – 1 fg; 8 – Controle negativo.

## 6.2 *Screening* das amostras de DNA

Inicialmente, as amostras foram submetidas à primeira ferramenta de *screening*, a reação de PCR com alvo no kDNA, selecionando 106 (97 HIV+) amostras positivas (Figura 8). As 106 amostras foram submetidas ao sistema ITS1, devido a capacidade de caracterização molecular da espécie *Leishmania infantum*, selecionando 78 amostras positivas (Figura 9). Entre as positivas, apenas 17 (16 HIV+) apresentaram o padrão característico de bandas correspondente à espécie *L. infantum* (55, 72 e 184 pbs) (LEISHMANIASIS EPIDEMIOLOGY NETWORK SOUTH AMERICA, 2009) (Figura 10).

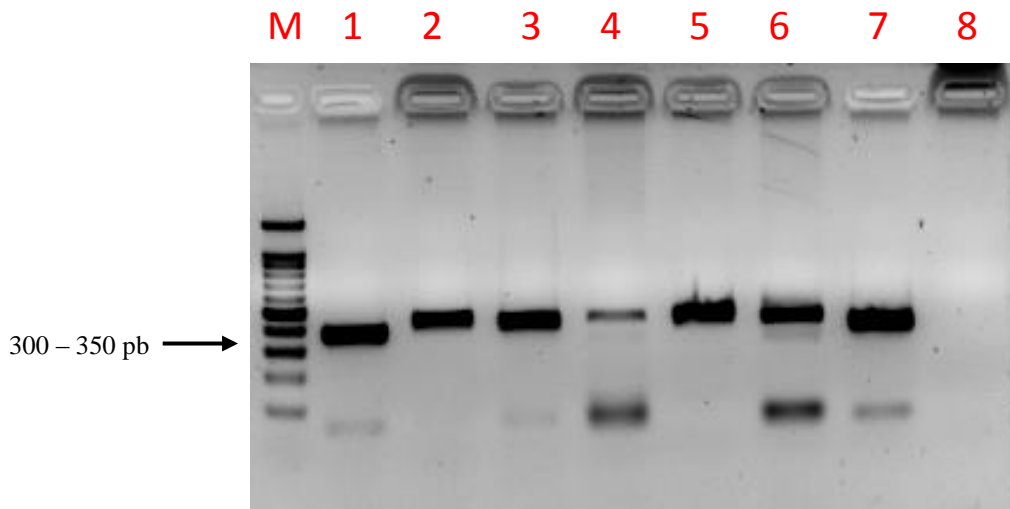
**Figura 8** - Amplificação do kDNA de *Leishmania spp.* (145 pb).



Fonte: O autor.

Nota: M - Marcador de peso molecular 100pb; 1-3 Amostras clínicas LV; 4-6 Amostras clínicas LV/HIV; 7 - Controle positivo; 8 - Controle negativo.

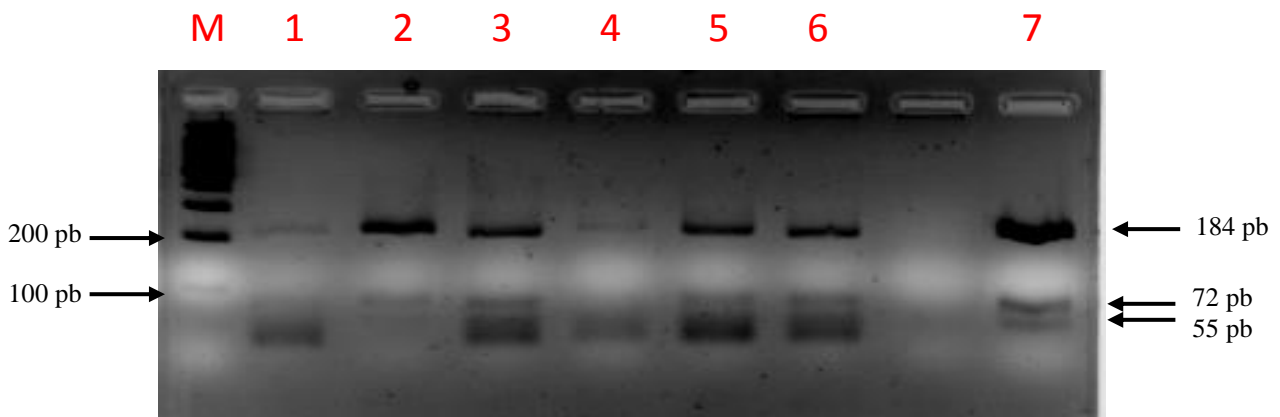
**Figura 9** - Amplificação da região ITS1 de *Leishmania spp.* (300-350 pb).



Fonte: O autor.

Nota: M - Marcador de peso molecular 100pb; 1-3 Amostras clínicas LV; 4-6 Amostras clínicas LV/HIV; 7 - Controle positivo; 8 - Controle negativo.

**Figura 10** - Digestão do *amplicon* da região ITS1 com a endonuclease de restrição *HaeIII*.



Fonte: O autor.

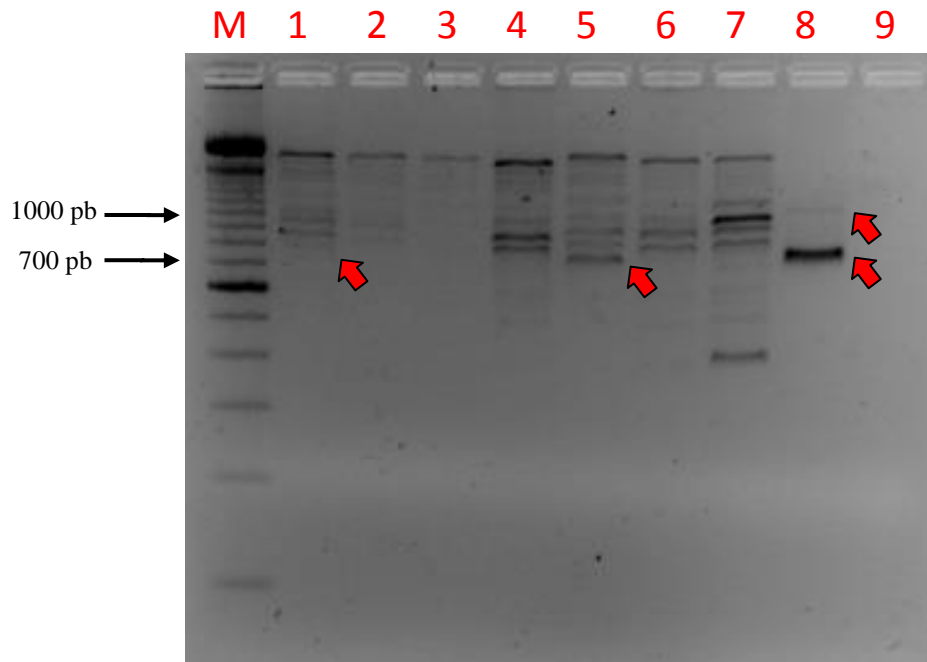
Nota: M - Marcador de peso molecular 100pb, 1-3 Amostras clínicas LV; 4-6 Amostras clínicas LV/HIV; 7 - Controle positivo.

### 6.3 Ensaio da K26 PCR em amostras clínicas

Os ensaios visando a padronização do sistema K26 PCR em amostras clínicas foram desenvolvidos com 34 amostras positivas (26 HIV+), simultaneamente, pelas duas ferramentas de *screening*. Entre as concentrações de DNA genômico adicionados para cada reação (20, 50, 100, 150 ng), somente em ensaios a partir de 100 ng a banda de 700 pb foi detectada; entretanto, houve amplificação de bandas inespecíficas (Figura 11).



**Figura 11** - Amplificação da região K26 de *Leishmania infantum*.

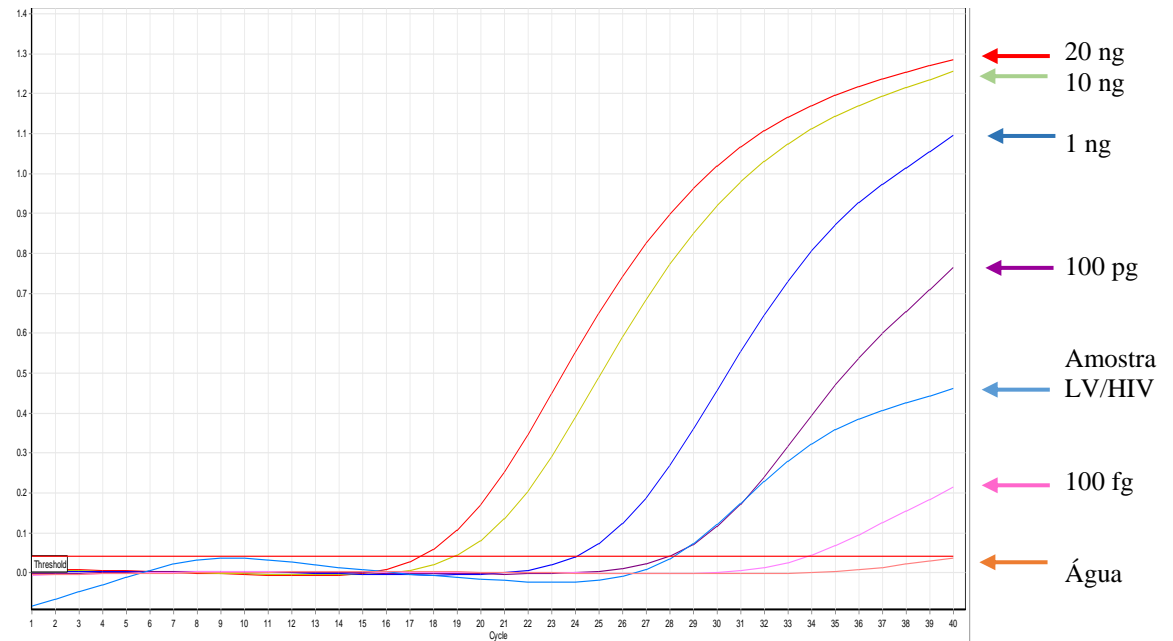


Fonte: O autor.

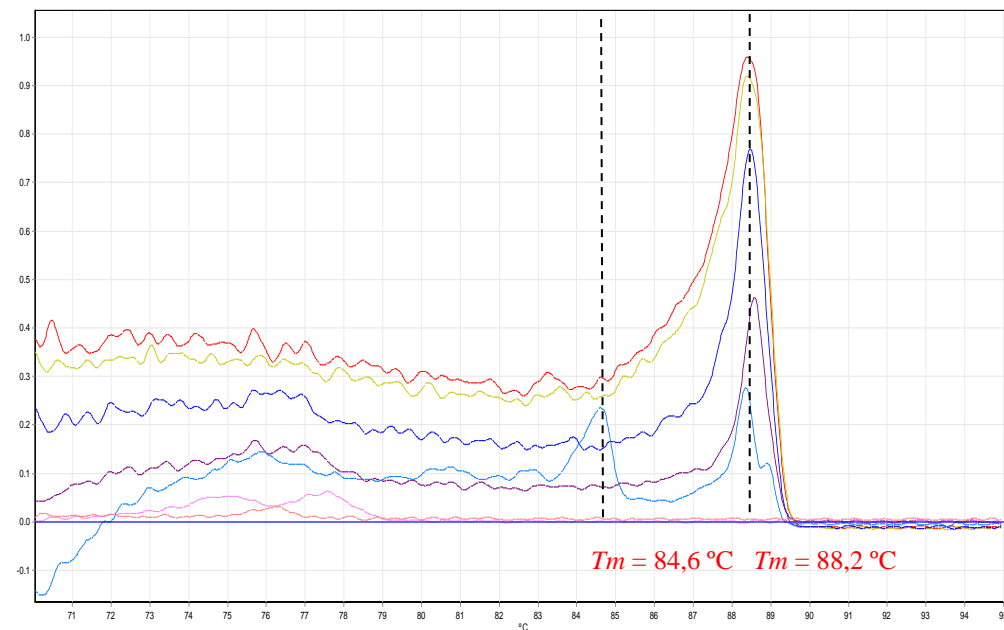
Nota: M - Marcador de peso molecular 100pb; 1-3 Amostras clínicas LV; 4-6 Amostras clínicas LV/HIV; 7 - Amostra clínica negativa; 8 - Controle positivo (*L. infantum* isolada de paciente); 9 - Água.

#### 6.4 Ensaios de PCR em tempo real (qPCR-HRM)

Ensaios de qPCR-HRM foram realizados com pontos da curva de diluição de *L. infantum* e uma amostra clínica LV/HIV, flecha 5 (Figura 11), visando localizar temperaturas de *melting* específicos para o parasita a partir da curva de dissociação de alta definição (HRM). As amplificações resultantes do DNA genômico de *L. infantum* de 20ng, 10ng, 1ng, 100pg, 100fg e DNA de amostra clínica apresentaram os respectivos valores de Ct: 17,5; 19; 24; 28; 34 e 28. A amplificação foi detectada até o 28º ciclo, correspondente a 100pg de DNA genômico e a amostra clínica (Figura 12). A curva de dissociação de alta definição (HRM) apresentou temperatura de *melting* de 88,2 °C, referente aos quatro primeiros pontos da curva de diluição. O ensaio com a amostra clínica revelou duas temperaturas de *melting* distintas, 84,6 e 88,2 °C, sendo o primeiro, provavelmente, referente à amplificação inespecífica com DNA humano (Figura 13).

**Figura 12** – Curva de amplificação da qPCR.

Fonte: O autor.

**Figura 13** – Análise da curva de dissociação de alta definição (qPCR-HRM).

Fonte: O autor.

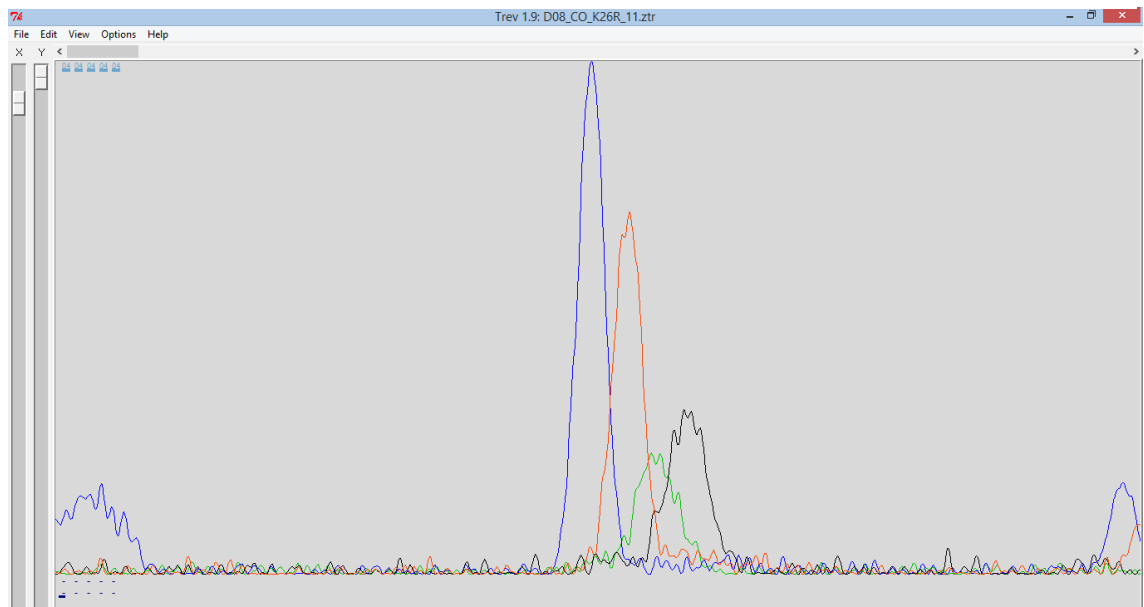
Nota: Concentrações de DNA da cepa de *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) - Vermelho: 20 ng; Verde: 10 ng; Azul escuro: 1 ng; Roxo: 100 pg; Rosa: 100 fg. Amostra positiva LV/HIV – Azul claro. Água - Laranja.

## 6.5 Sequenciamento

Inicialmente, foram purificados diretamente do gel de agarose 4% os *amplicons* de 700 pb das amostras clínicas de LV e LV/HIV, flechas 1 e 5, respectivamente (Figura 11), juntamente com os *amplicons* de 700 e 1000 pb de três isolados de *L. infantum* provenientes de pacientes, sendo posteriormente direcionados ao sequenciamento.

Os arquivos *forward* e *reverse*, correspondentes as sequencias das amostras clínicas de 700 pb, juntamente com os de 1000 pb dos isolados, não geraram *contigs*, devido à baixa qualidade na expressão das bases, apresentando ambiguidade em determinados pontos do cromatograma (Figura 14). Os *Contig 1*; *Contig 2* e *Contig 3* gerados a partir da banda de 700pb dos isolados apresentaram 510, 190, 423 pb, respectivamente (Figura 15a.). As perdas de nucleotídeos nas extremidades 5' e 3' ficaram evidentes após o alinhamento aplicando o método Clustal W (Figura 15b).

**Figura 14** – Parte da sequência reversa correspondente à banda de 700 pb da amostra clínica LV/HIV.



Fonte: O autor.

Nota: Valor de *Phred* igual a 04 na parte superior esquerda do cromatograma.



accession: EF504255, EF504256, EF504257, EF504258, DQ192034 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=k26+Leishmania+infantum>)].

A análise do alinhamento indicou 38,2 % de similaridade entre as oito sequencias avaliadas. Foram observados 42 nucleotídeos repetitivos (11 cópias entre as posições 152 – 615 na EF504255, EF504256 e DQ192034; 10 cópias entre as posições 152 – 573 no *Contig* 1, EF504257 e EF504258; 9 cópias entre as posições 152 – 531 no *Contig* 3; 4 cópias dispostas entre as posições 152 - 321 no *Contig* 2).

Os polimorfismos foram avaliados na região comum às oito sequencias, entre as posições 152 – 321, correspondente às quatro primeiras cópias. Foram observados 26 *mismatches* nas duas primeiras cópias; 27 e 25 na terceira e quarta cópias, respectivamente. O *Contig* 3 apresentou um *gap* na posição 220. Houve inserção de citosina na posição 206 do *Contig* 2; e de guanina e citosina nas posições 205 e 206 do *Contig* 3. As transições entre as bases A-G representam 26 % dos SNPs observados (Apêndice A). A partir dessas análises, houve a confirmação que o *amplicon* era correspondente ao gene K26 dos isolados de *L. infantum* provenientes de pacientes.

## 7 DISCUSSÃO

Os ensaios baseados em PCR representam umas das principais ferramentas aplicadas para diagnosticar leishmaniose visceral, devido a elevada sensibilidade. Os protocolos de PCR podem ser aplicados para diferentes espécies de *Leishmania*, apresentando desempenho satisfatório frente aos exames parasitológicos (ALVAR *et al.*, 2008; REITHINGER; DUJARDIN, 2007). O minicírculo do kDNA é o alvo mais estudado, sendo conseqüentemente o mais utilizado em pesquisas moleculares para diagnóstico de calazar humano (LE FICHOUX *et al.*, 1999; LIMA JUNIOR *et al.*, 2009, 2013; MA; BU; HUA, 2011; NOYES *et al.*, 1998; RAVEL *et al.*, 1995; RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; SALOTRA *et al.*, 2001; SILVA, Maria *et al.*, 2010; SMYTH *et al.*, 1992). Assim, a PCR com alvo molecular no kDNA foi eleita a ferramenta de *screening*, selecionando 106 amostras positivas (97 HIV+).

O espaçador interno transcrito (ITS) representa um dos alvos mais utilizados para diagnóstico de LV, sendo amplamente utilizado em estudos de caracterização molecular de espécies do gênero *Leishmania* no Velho e Novo Mundos (SCHÖNIAN; KUHL; MAURICIO, 2011). O alvo possui sítios de clivagem para enzimas de restrição, possibilitando a distinção entre espécies de *Leishmania spp.* a partir de um perfil específico de bandas (SCHÖNIOAN *et al.*, 2003). A ITS1 PCR foi utilizada nesta pesquisa como suporte à ferramenta de *screening*, pois há relatos de amplificação inespecífica para *Tripanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni* quando utilizados os *primers* RV1/RV2 (WANDERLEY, 2011). Neste estudo, foram selecionadas 78 amostras positivas (70 HIV+) para ITS1 PCR, sendo a espécie *L. infantum* identificada em apenas 17 amostras (16 HIV+), onde essas apresentaram *amplicon* de maior intensidade em gel de agarose 2%. Esses dados sugerem que a clivagem enzimática está diretamente relacionada à intensidade do *amplicon* em gel de agarose.

O sistema K26 PCR é utilizado em estudos de caracterização molecular das espécies do complexo *L. donovani* isoladas em meio de cultivo (CHICHARRO *et al.*, 2013; GADISA *et al.*, 2010; GOUZÉLOU *et al.*, 2013; HARALAMBOUS *et al.*, 2008; POUBEL, 2010; ZACKAY *et al.*, 2013). Os resultados apresentados por Haralambous *et al.* (2008) apontam sensibilidade aproximada de 50 pg para a K26 PCR, ressaltando a possibilidade para detecção do DNA no complexo *L. donovani* diretamente de amostras biológicas, não sendo necessário o isolamento do parasita a partir de cultura. Neste mesmo estudo, avaliou-se a especificidade do sistema para diferentes espécies de *Leishmania spp.*, confirmando positividade apenas para espécies do complexo *L. donovani*. Os ensaios de sensibilidade realizados no presente estudo

detectaram até 1 pg de DNA em curva de diluição de fator 10, resultado assim obtido mediante otimização do protocolo original de Haralambous et al. (2008). A baixa sensibilidade da técnica (1 pg) dificulta a utilização do alvo para diagnóstico, pois aumenta a probabilidade de falsos resultados. Com relação a especificidade, os *primers* K26F/K26R apresentaram resultados negativos para seis espécies de microrganismos de importância clínico-epidemiológica para o estado de Pernambuco; entretanto, revelou ampliações inespecíficas para DNA genômico humano (Figura 11), sendo a inespecificidade também confirmada em banco de dados do NCBI.

Os experimentos envolvendo o sistema K26 em amostras clínicas para LV e LV/HIV revelaram produtos com diferentes pesos moleculares (Figura 11). Haralambous et al. (2008) identificou banda dupla entre 600 e 800 pb em cepas de *L. infantum* provenientes de Portugal, Espanha e Ilha de Chipre. Normalmente, cepas de *L. infantum* europeias apresentam-se mais polimórficas, onde a maioria dos produtos variam de 385-1300 pb; ao contrário de cepas *L. donovani* africanas, que mantêm um padrão de bandas na altura aproximada de 290, 360, 410, 450 pb (CHICHARRO *et al.*, 2013; GADISA *et al.*, 2010; GOUZELOU *et al.*, 2013; HARALAMBOUS *et al.*, 2008; ZACKAY *et al.*, 2013). Em estudo de avaliação da diversidade genética de cepas de *L. infantum* procedentes de 20 indivíduos com LV (cães e humanos) em diversas regiões do Brasil, três perfis de bandas foram identificados: um com peso molecular de 970 pb, outro com 1295 pb e um terceiro com banda dupla (970/1295 pb) (POUBEL, 2010). Na figura 11, a eletroforese em gel de agarose 4% não definiu precisamente a banda correspondente ao gene K26 nas amostras clínicas deste estudo.

A curva de dissociação de alta definição (qPCR-HRM) é uma técnica sensível, utilizada para detecção de infecções diretamente no sangue ou em tecidos infectados, tornando-se vantajosa quando comparada aos exames parasitológicos que necessitam de cultivo e crescimento dos patógenos (TALMI-FRANK *et al.*, 2010). A análise do qPCR-HRM em DNA genômico de *L. infantum* e em amostra clínica LV/HIV, flecha 5 (Figura 11), confirmou temperatura de *melting* de 88,2 °C, sendo equivalente à apresentada pela espécie *L. donovani* (Figura 13). Cepas de *L. donovani* foram separadas em dois grupos na Etiópia de acordo com o tamanho do *amplicon*; o primeiro de 450 e 360 pb, representando a região sudoeste do país; e o segundo, 290 e 410 pb, representando a região noroeste (ZACKAY *et al.*, 2013). O tamanho do fragmento, associado ao conteúdo de GC, exercem influência na temperatura de *melting* (DUFRESNE *et al.*, 2006, WOLFF *et al.*, 2008), pois fragmentos acima de 360 pb apresentaram *Tm* maior que 87 °C, caracterizando as cepas circulante na Etiópia, juntamente com a cepa de *L. infantum* e a amostra clínica utilizadas neste estudo. A

amostra clínica apresentou um segundo valor para  $T_m$  de 84,6 °C, estando relacionado, provavelmente, as amplificações inespecíficas do DNA humano (Figura 13). Mais ensaios serão necessários para corroborar esses resultados, possibilitando à definição dos polimorfismos de *L. infantum* a partir da HRM, diferenciando das temperaturas de *melting* provenientes das amplificações do DNA humano.

A organização do gene K26 entre as espécies do complexo *L. donovani* são semelhantes, variando em número de cópias e polimorfismos intrínsecos às sequências repetitivas. Schnur e Jacobson (1989) e Zackay et al. (2013) ilustram possíveis fatores responsáveis pelas variações polimórficas dentro de *Leishmania spp.*, admitindo como determinantes as diferenças entre espécies dos vetores flebotomíneos e hospedeiros do parasita. Alce et al. (1999) sequenciaram duas bandas referentes à amplificação do gene K26, detectando 42 nucleotídeos repetitivos (aproximadamente 22 cópias para o fragmento de 1200 pb e 2,5 cópias para o fragmento de 420 pb). Os genes que apresentam repetições em *tandem* codificam antígenos que são imunógenos naturais, desencadeando resposta humoral aos epítomos repetitivos (STAHL et al., 1984).

Neste estudo, apenas o sequenciamento da banda de 700 pb dos isolados de *L. infantum* provenientes de pacientes confirmaram o gene K26, revelando um padrão de sequências repetitivas e polimórficas (Apêndice A). A baixa qualidade do sequenciamento das amostras clínicas pode ser justificada pela proximidade das bandas espúrias à sequência de interesse, que dificultavam a excisão precisa no gel de agarose.



## **8 CONCLUSÕES**

Ensaio diagnóstico com a K26 PCR diretamente em DNA extraído de sangue periférico não são recomendados, pois o limiar de detecção de 1 pg aumentaria o risco de falsos resultados negativos, além da dificuldade para identificação da banda de interesse devido às amplificações inespecíficas.

O sistema K26 PCR é recomendável para análises dos polimorfismos genéticos, contanto que o DNA seja extraído diretamente de espécies isoladas em meio de cultura.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espera-se isolar as bandas correspondentes ao gene K26 das amostras clínicas, a partir da otimização do protocolo de purificação, visando fortalecer os estudos de epidemiologia molecular para a espécie *L. infantum* provenientes de pacientes positivos para LV e LV/HIV, relacionando as variações polimórficas nucleotídicas, numéricas e organizacionais, à distribuição geográfica das leishmanioses.

## REFERÊNCIAS

- ALCE, T. M. *et al.* Expression of hydrophilic surface proteins in infective stages of *Leishmania donovani*. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 191–196, 1999.
- ALEXANDRINO-DE-OLIVEIRA, P. *et al.* HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in central-west Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 692-697, 2010.
- ALLAN, M. Z. *et al.* PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region, Mymensingh district, Bangladesh. **Tropical Medicine International Health**, Oxford, v. 14, p. 499-503, 2009.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection, the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, p. 298-319, 1997.
- ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 21, p.334–359, 2008.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 1-12, 2012.
- ALVARENGA, D. G. *et al.* Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43, p. 194-197, 2010.
- ANTINORI, S. *et al.* Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.44, p. 1602–1610, 2007.
- ARORA S. K. *et al.* An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Chandigarh, v. 102, p. 41–45, 2008.
- ASSIS, T. *et al.* Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Belo Horizonte, v. 17, p. 107-116, 2008.
- ATTAR, Z. *et al.* Latex agglutination test for the urinary antigens in visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 78, p. 11-16, 2001.
- BABIKER, Z. O. *et al.* Utility of lymph node aspiration in the diagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 76, p. 689-693, 2007.
- BAÑULS, A. L. *et al.* Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania*

*panamensis/guyanensis* in Equador. **Journal Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 44, p. 408-411, 1999.

BARBOSA JÚNIOR, W. L. **Uso do teste rápido no diagnóstico da coinfeção leishmaniose visceral e HIV-aids no Estado de Pernambuco**. 2013. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, 2013.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, p. 289-294, 2006.

BHATIA, A. *et al.* Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.102, p. 249–261, 1999.

BHATTARAI, N. R. *et al.* PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among health Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-azar. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 14, p. 404-411, 2009.

BORGES, A. S. *et al.* Concomitância de leishmanioses e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV): estudo de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 32, p. 713-719, 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Visceral: Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV**. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF, 2014.

BULLE, B. *et al.* Practical approach for typing stains of *Leishmania infantum* by microsatellite analyses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 3391-3397, 2002.

BURNS, J. M. *et al.* Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 775-779, 1993.

CALICH, L. *et al.* Relato de um caso de calazar em paciente com AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 24, p. 64, 1991.

CARNAUBA, D. *et al.* Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kalazar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*

*chagasi*: a case report. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 13, p. 504-507, 2009.

CARRANZA-TAMAYO C. O. *et al.* Prevalence of *Leishmania* infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasília, Federal District, Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.103, p. 743–748, 2009.

CAVALCANTI, A. *et al.* Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 54, p. 43-47, 2012.

CHAPPUIS, F. *et al.* A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, Londres, v. 333, p.1-5, 2006.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews**, Londres, v. 5, p.873-882, 2007.

CHICHARRO, C. *et al.* Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. **Euro Surveill**, Saint-Maurice, 25 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20545>>. Acesso em: 15 dez. 2013.

CORTES, S. J. C. **Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal**. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

COTA, G. F. *et al.* The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, e1665, 2012.

COTA, G. F. *et al.* Comparison of parasitological, serological, and molecular tests for visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a cross-sectional delayed-type study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, p.570–577, 2013.

COTA, G. F. *et al.* *Leishmania*-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, e2816, 2014.

COTA, G. F.; SOUZA M. R.; RABELLO A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIVpatients: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, p.1-8, 2011.

CRUZ, I. *et al.* A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 96, suppl. 1, p.s185–s189, 2002.

CRUZ, I. *et al.* *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, p. 357-388, 2006.

- CUNHA, A. M; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. previous note. **Hospital (Rio de Janeiro)**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-6, 1938.
- DAHER, E. F. *et al.* Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in fifteen patients from Brazil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 95, p. 652–655, 2009.
- DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, Brasília, v. 40, p. 537-541, 2006.
- DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 117-118, 2006.
- DEDET, J. P.; PRATLONG, F. *Leishmania*, *Trypanosoma* and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 47, p. 37–39, 2000.
- DENIAU, M. *et al.* The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.97, p.15-33, 2003.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DIEHL, A. R. S. *et al.* Microscopy and polymerase chain reaction detection of *Leishmania chagasi* in the pleural and ascitic fluid of a patient with AIDS: case report and review of diagnosis and therapy of visceral leishmaniasis. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, Ontario, v. 15, p. 231-234, 2004.
- DOURADO, Z. F. *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, p. 205-214, 2007.
- DRUZIAN, A. F. *et al.* Risk factors for death from visceral leishmaniasis in an urban area of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, p. 1-11, 2015.
- DUFRESNE, S. D. *et al.* BRCA1 and BRCA2 mutation screening using SmartCycler II high-resolution melt curve analysis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine (1926)**, Chicago, v. 130, p. 185–187, 2006.
- DUXBURY, R. E.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 13, p. 525-529, 1964.
- EL HARITH, A. *et al.* A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p.583-587, 1986.

EL TAI, N. O. *et al.* Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-stand confirmation polymorphisms (sscp) and sequencing. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.94, p. 5 - 9, 2000.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses viscérales. **La Revue de Médecine Interne**, Paris, v. 12, p. 1-8, 2011.

FERREIRA, E. *et al.* Visceral leishmaniasis in a Brazilian child infected perinatally with human immunodeficiency virus. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 20, p. 224–226, 2001.

FLINN, H. M.; SMITH D. F. Genomic organisation and expression of a differentially regulated gene family from *Leishmania major*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, p. 755–762, 1992.

FRADE, A. F. **Polimorfismo genético em citocinas com impacto no desenvolvimento e progressão da leishmaniose visceral em indivíduos de áreas endêmicas do Maranhão e Piauí**. 2010. Tese (Doutorado em Alergia e Imunopatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FRAGA, J. *et al.* Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p. 238–245, 2010.

FRAGA, J. *et al.* Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 18, p.229-237, 2013.

GADISA, E. *et al.* *Leishmania donovani* complex (Kinetoplastida, Trypanosomatidae): comparison of deoxyribonucleic acid based techniques for typing of isolates from Ethiopia. **Experimental Parasitology**, New York, v. 126, p. 203–208, 2010.

GAVGANI. *et al.* KAtex antigen-detection test as a diagnostic tool for latent visceral leishmaniasis cases. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, p.852-859, 2008.

GOUZELOU, E. *et al.* Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. **Parasites & Vectors**, London, v. 6; p. 1-19, 2013.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p.338-349, 2004.

GUERIN, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: Current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p.494–501, 2002.

HARALAMBOUS, C. *et al.* Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, New York, v. 60, p. 33–42, 2008.

HIDE, M. *et al.* Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. **Parasitology**, London, v. 123, p. 425-432, 2001.

JAMJOOM, M. B. *et al.* *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and “*L. archibaldi*” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. **Parasitology**, London, v. 129, p. 399–409, 2004.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 811-827, 2005.

LACHAUD, L. *et al.* Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis with special reference to AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p. 236-240, 2000.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p. 210-215, 2002.

LE FICHOUX, Y. *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1953–1957, 1999.

LEISHMANIASIS EPIDEMIOLOGY NETWORK SOUTH AMERICA, 2009, Rio de Janeiro. **Manual molecular procedures**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2009.

LIMA JUNIOR, M. S. C. *et al.* Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 42, p. 52-56, 2009.

LIMA JUNIOR, M. S. C. *et al.* Sensitivity of PCR and real-time PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis using peripheral blood. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Hong Kong, v. 3, p. 10-15, 2013.

LINDOSO, J. A. *et al.* Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, p. 1-9, 2013.

LOMA, A. *et al.* Leishmaniasis or AIDS? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 79, p. 421-422, 1985.

LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 9375-9380, 2007.

MA, Y., BU, L., HUA, X. 20-year search on molecular markers of *Leishmania* isolates from different Kala-azar foci in China to confirm whether genetic fingerprints of Kala-azar pathogens correlate with disease types. **Journal of Biomedical Engineering**, Guildford, v. 28, p. 997-1000, 2011.



- MACHADO, A. A. *et al.* Novos casos de leishmaniose associados a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 29, p. 26, 1996.
- MAIA, Z. *et al.* Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6 p. 1-8, 2012.
- MAIA-ELKHOURY A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2941-2947, 2008.
- MALAFAIA, G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 587–596, 2009.
- MARY, C. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p 5249-5255, 2004.
- MAURICIO, I. L. *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 188-189, 2000.
- McMAHON-PRATT, D. *et al.* Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 129, p. 926-927, 1982.
- McMAHON-PRATT, D. *et al.* Subspecies and specie-specific antigens of *Leishmania mexicana* characterized by monoclonal antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 134, p. 1935-1940, 1985.
- McMAHON-PRATT, D.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. **Nature**, London, v. 291, p. 581-583, 1981.
- McKEAN, P. G. *et al.* Diversity in repeat-containing surface proteins of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 86, p. 225–235, 1997.
- MEDRANO, F. J. *et al.* The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.59, p.155-162, 1998.
- MOHAPATRA, T. M. *et al.* Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 4, p. 114-117, 2010.
- MOLINA, R. *et al.* HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v. 97, p. 29-45, 2003.
- NOYES H. A. *et al.* 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**, Washington, v. 36, p. 2877–2881, 1998.
- NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

NUNO-MARQUES, *et al.* Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana na era da terapêutica antiretroviral de alta eficácia. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 20, p. 291-298, 2007.

OCHSENREITHER, S. *et al.* Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 stains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, p. 495-503, 2006.

ORSINI, M. *et al.* Identification of *Leishmania chagasi* from skin in *Leishmania*/HIV co-infection: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, p. 259-262, 2002.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Bauru, v. 16, p. 537-542, 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, London, v. 5, p. 1-10, 2015.

PAREDES, R. *et al.* Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 49, p. 39-49, 2003.

PINTADO, V.; LOPES-VELEZ, R. Visceral leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus infection. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 19, p. 353-357, 2001.

POLANCO, C. *et al.* Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. **Genetics**, Bethesda, v.149, p.243-256, 1998.

POUBEL, S. B. **Variabilidade genética de isolados de *Leishmania infantum* x *L. chagasi* procedentes de várias regiões do Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RABELLO, A. *et al.* *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 1, p.17-28, 2003.

RAVEL, S. *et al.* A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. **Acta Tropica**, Basel, v. 59, p.187-196, 1995.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 21-25, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RIERA, C. *et al.* Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* co-infection: value in diagnosis and post-treatment follow up. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 23, p. 899-904, 2004.

RIERA, C. *et al.* Value of culture and nested polymerase chain reaction of blood in the prediction of relapses in patients co-infected with leishmania and human immunodeficiency virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, p.1012–1015, 2005.

RIOUX, J. A. *et al.* Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 65, p. 111-125, 1990.

RODGERS, M. R., POPPER, S. J., WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 71, p. 267–275, 1990.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, e584, 2010.

SADLOVA, J. *et al.* The stageregulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 12, p. 1765–1779, 2010.

SALOTRA, P. *et al.* Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with Kala-azar and Post-Kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 849–854, 2001.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 77, p. 5463-5467, 1977.

SARKARI, B. *et al.* Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. **Acta Tropical**, Basileia, v. 82, p. 339–348, 2002.

SHAW, J. J. *et al.* Serodemes of the *Leishmania braziliensis* complex. **Colloque International**, Montpellier, p. 179-183, 1986.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 577-579, 2006.

SCHNUR, L. F., JACOBSON, R. L. Surface reaction of *Leishmania*. IV. Variation in the surface membrane carbohydrates of different strains of *Leishmania major*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 83, p. 455–463, 1989.

- SCHÖNIAN, G. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, p. 349–358, 2003.
- SCHÖNIAN, G. *et al.* Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, p. 135-142, 2008.
- SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, Amsterdam, v.138, p. 405–425, 2011.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 285-291, 2001.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) brasiliensis* in a patient infected with HIV. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 44, p. 145-149, 2002.
- SILVA, E. D. *et al.* Case study of patient with HIV-AIDS and visceral leishmaniasis co-infection in multiple episodes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 55, p. 425-428, 2013.
- SILVA, M. A. L. *et al.* Molecular targets used in PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 7, p. 1-15, 2010.
- SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, p. 311-30, 2006.
- SINGH, D. *et al.* The rK39 strip test is non-predictor of clinical status for kala-azar. **BMC Research Notes**, London, v. 2, p. 1-4, 2009.
- SMYTH, A. J. *et al.* Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**, London, v. 105, p. 183–192, 1992.
- SOUSA-GOMES, M. L. *et al.* Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, p. 519-526, 2011.
- STAHAL, H. D. *et al.* Differential antibody screening of cloned *Plasmodium falciparum* sequences expressed in *Escherichia coli*: procedure for isolation of defined antigens and analysis of human antisera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 2456-2460, 1984.
- SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 951-958, 2002.

SUNDAR, S. *et al.* Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (Diamed-it Leish) for Indian visceral leishmaniasis and PKDL. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, p. 3-7, 2003.

SUNDAR, S. *et al.* Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Tropical Medicine International Health**, Oxford, v. 12, p. 284–289, 2007.

TALMI-FRANK, D. *et al.* Detection and identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, e581, 2010.

THOMPSON, J. D. *et al.* The CLUSTRAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VIANA, G. M. C. *et al.* Leishmaniose Visceral e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Relato de um caso. **Revista do Instituto Brasileiro de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 36, p. 384-386, 1994.

WANDERLEY, L. B. **Avaliação da especificidade dos primers RV1 e RV2 para o diagnóstico molecular da leishmaniose visceral.** 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

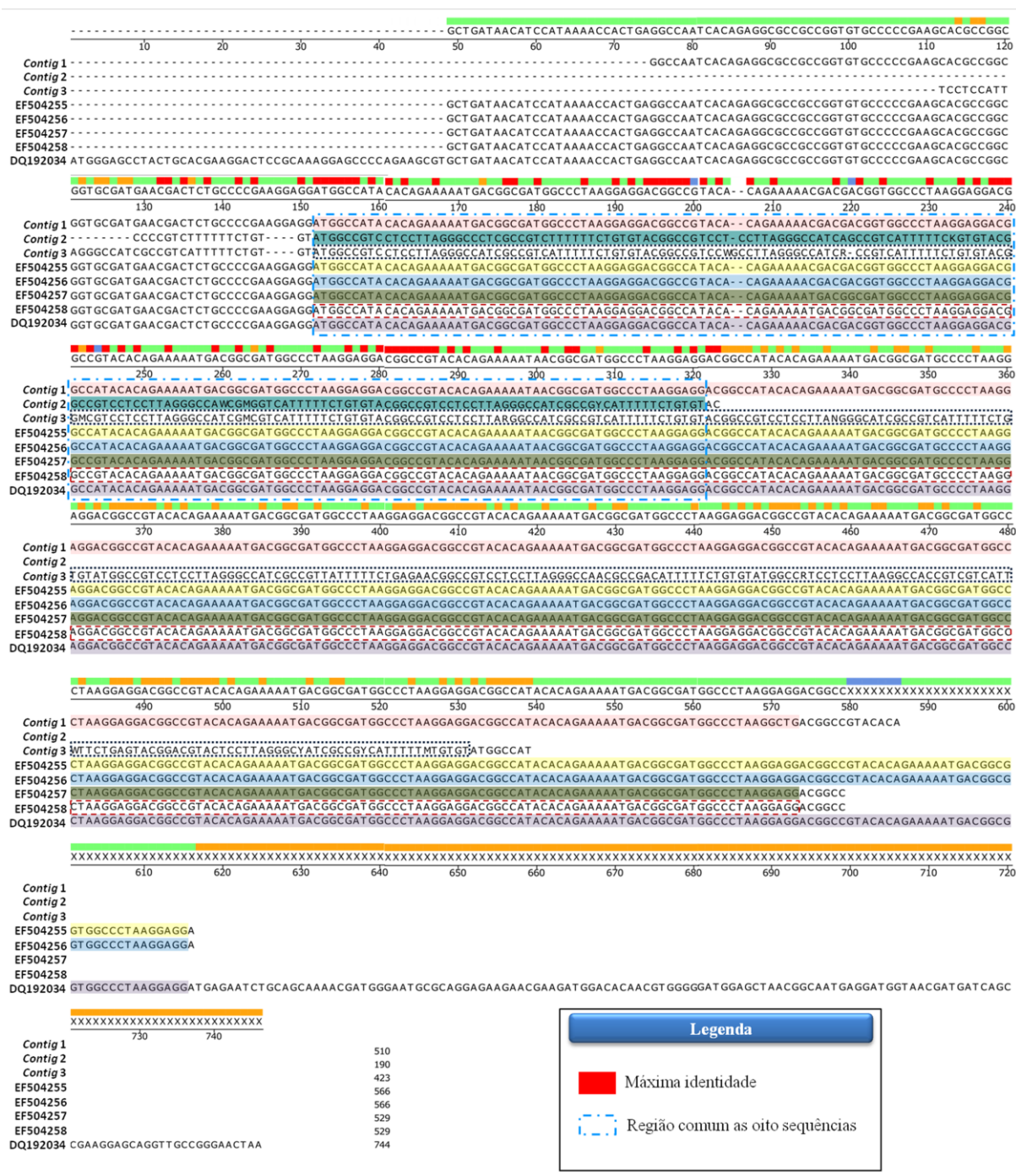
WOLFF, B. J. *et al.* Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high resolution melt analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, p. 3542–3549, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection. **Addis Ababa**, Naribi, p. 20-22, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of the leishmaniases**, Geneva, 2010.

ZACKAY, A. *et al.* Polymorphism in the HASPB repeat region of East African *Leishmania donovani* strains. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, p. 1-9, 2013.

## APÊNDICE A - Alinhamento das sequencias



## ANEXO A - Parecer de aprovação do CEP



Comitê de Ética  
em Pesquisa

**Título do Projeto:** "Caracterização das regiões polimórficas do gene HASPB de Leishmania infantum em amostras clínicas".

**Pesquisador responsável:** Ana Aguiar dos Santos

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 31/07/2011

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 29/11

**Registro no CAAE:** 34177614.0.0000.5190

**PARECER Nº 888.988**

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12 e complementares.

Recife, 11 de dezembro de 2014.

Janaina Campos de Miranda  
Pesquisadora em Saúde Pública  
Coordenadora  
Mat. SIAPE 464777  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ