

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

TAYNÁ CORREIA DE GOES

Análise in silico e aplicabilidade da região IGS rRNA de Leishmania spp. para identificação de espécies que causam a Leishmaniose Tegumentar Americana

RECIFE

2019

TAYNÁ CORREIA DE GOES

Análise *in silico* e aplicabilidade da região IGS rRNA de *Leishmania* spp. para identificação de espécies que causam a Leishmaniose Tegumentar Americana

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr.^a. Milena de Paiva Cavalcanti

Coorientador: Dr. Antônio Mauro Rezende

Recife

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- G598a Goes, Tayná Correia de.
Análise in silico e aplicabilidade da região IGS rRNA de *Leishmania* spp. para identificação de espécies que causam a Leishmaniose Tegumentar Americana / Tayná Correia de Goes. - Recife: [s.n.], 2019.
65 p.: ilus., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.
Orientadora: Milena de Paiva Cavalcanti; coorientador: Antônio Mauro Rezende.
1. Leishmaniose. 2. Genes de RNAr. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 4. Análise de Sequência de DNA. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. II. Rezende, Antônio Mauro. III. Título.

CDU 616.993.161

TAYNÁ CORREIA DE GOES

Análise *in silico* e aplicabilidade da região IGS rRNA de *Leishmania* spp. para identificação de espécies que causam a Leishmaniose Tegumentar Americana

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em 27 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a. Milena de Paiva Cavalcanti
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Antônio Mauro Rezende
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Gabriel da Cruz Wallau
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Para minha Vovó Carminha e meu Vovô Vavá,
que lá do céu continuam torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente agradecida à Deus por ter iluminado cada escolha na minha vida para que esse momento acontecesse, por ter me dado sabedoria e persistência para lutar pelos meus sonhos.

Aos meus pais Tatiana e Ricardo, por todo apoio, confiança e estímulo aos meus estudos.

Aos meus irmãos Ludmylla, Angela e Rudah por tornarem aqueles dias mais pesados e tensos de estudo, em dias mais leves e divertidos.

Ao meu namorado Erick que esteve comigo em todos os momentos, sempre confiando que eu podia ir além e dar o melhor de mim.

À minha orientadora Dr^a. Milena de Paiva e minha coorientadora (do coração) Rayana, que acreditaram no meu potencial e investiram em mim todo conhecimento que pude absorver. Agradeço também assim, como ao meu co-orientador Dr. Antônio Rezende pelas correções e sugestões propostas para este trabalho e para todo o projeto.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, e aos meus amigos de equipe de antes e de hoje: Cíntia, Ana Carla, Maria Gabriella, Rômulo, Victor, Anny, Lays e Suênia, que me ajudaram muito com experimentos e também me ensinaram bastante.

Ao Núcleo de Bioinformática, por me ajudarem tanto a conseguir meus resultados.

Aos meus amigos do Instituto de Genética Forense Eduardo Campos, principalmente minhas companheiras do Laboratório de Biologia Forense por todo incentivo e permutas para que eu pudesse terminar meus experimentos.

À todos os meus familiares e amigos que torceram por mim, muito obrigada!

“A ciência não é apenas
um discípulo da razão, mas
também um romance
e uma paixão.”

Stephen Hawking

GOES, Tayná Correia de. **Análise *in silico* e aplicabilidade da região IGS rRNA de *Leishmania* spp. para identificação de espécies que causam a Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

Dentre fatores importantes para a evolução da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) está espécie do parasito, sendo a caracterização da mesma, de suma importância. Derivados do RNA ribossomal (rRNA) foram utilizados em estudos para caracterização de *Leishmania* spp. através de PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), porém, a região *Intergenic Spacer* (IGS) não foi explorada para este fim. Assim, foi proposto a análise *in silico* e verificação da aplicabilidade da região IGS rRNA de *Leishmania* spp. para identificação de espécies que causam a LTA. Com base em sequências de *Leishmania major*, foram desenhados *primers* para amplificação da região IGS rRNA completa de *Leishmania* spp. Os produtos foram submetidos ao Sequenciamento Capilar e de Nova Geração. As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas em relação à tamanho e similaridade, bem como depositadas no *GenBank*. Foram analisadas características do elemento de repetição (IGSRE) presente no IGS rRNA. Além disso, foi desenvolvido e otimizado um sistema *primers* para identificação de *Leishmania braziliensis* para qPCR, sendo aplicado testes de sensibilidade (S), especificidade (σ) e eficiência (ϵ). Verificou-se que o tamanho médio para a região IGS rRNA é de 3 kb, e a região repetitiva IGSRE varia entre 61-71 pb. A análise de similaridade das sequências obtidas demonstrou alta conservação entre as espécies. Foram depositadas no *GenBank*, quinze sequências parciais geradas para da região IGS rRNA de nove espécies. O sistema de *primers* específico para *L. braziliensis*, apresentou $S = 10^6$, $\epsilon = 99,73\%$ e, $\text{Log}\sigma = 10^3$ para *Leishmania naiffi*, $\text{Log}\sigma = 10^4$ para *Leishmania guyanensis* e $\text{Log}\sigma = 10^5$ para *Leishmania shawi*. O sistema pode ser utilizado para diagnóstico, identificação e quantificação, auxiliando no direcionamento para uma conduta terapêutica mais apropriada aos casos de infecção por este parasito. E, as sequências inéditas depositadas em bancos de dados, podem ser utilizadas para múltiplas análises de pesquisadores no mundo.

Palavras chaves: Leishmaniose. Genes de RNAr. PCR em Tempo Real. Análise de Sequência de DNA.

GOES, Tayná Correia de. ***In silico* analysis and applicability from *Leishmania* spp. IGS rRNA region to identify species that cause American Cutaneous Leishmaniasis.** 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Among important factors for the evolution of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a parasite species, and its characterization is of paramount importance. Derivatives of ribosomal RNA (rRNA) were used in studies to characterize *Leishmania* spp. using quantitative Real Time PCR (qPCR), however, the Intergenic Spacer region (IGS) was not explored for this purpose. Thus, the objective of the project was the *in silico* analysis and verification of the applicability of the *Leishmania* spp. IGS rRNA region to identify species that cause LTA. Based on *Leishmania major* sequences, primers were designed for complete IGS rRNA region of *Leishmania* spp amplification. The products were submitted to Capillary and New Generation Sequencing. The sequences obtained were aligned and analyzed for size and similarity, as well as deposited in GenBank. Characteristics of the repeat element (IGSRE) present in the IGS rRNA were analyzed. In addition, a primers system for identification of *Leishmania braziliensis* for qPCR was developed and optimized. Sensitivity (S), specificity (σ) and efficiency (ϵ) tests were applied. It has been found that the mean size for the IGS rRNA region is 3 kb, and the IGSRE repeating region ranges from 61-71 bp. The similarity analysis of the sequences obtained showed high conservation among the species. Fifteen partial sequences generated for the IGS rRNA region of nine species were deposited in GenBank. The specific primer system for *L. braziliensis* showed $S = 10\text{fg}$, $\epsilon = 99.73\%$ and, $\text{Log}\sigma = 10^3$ for *Leishmania naiffi*, $\text{Log}\sigma = 10^4$ for *Leishmania guyanensis* and $\text{Log}\sigma = 10^5$ for *Leishmania shawi*. The system can be used for diagnosis, identification and quantification, assisting in the targeting of a therapeutic course more appropriate to the cases of infection by this parasite. And, the unpublished sequences deposited in databases can be used for multiple analyzes of researchers in the world.

Keywords: Leishmaniasis. Genes, rRNA. Real Time PCR. Sequence Analysis, DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	19
Figura 2 -	Cladograma com a atual classificação das espécies de <i>Leishmania</i> .	20
Figura 3 -	Espectro clínico da leishmaniose tegumentar Americana.	24
Figura 4 -	Organização dos genes do RNA ribossomal em eucariotos.	29
Figura 5 -	Subunidades formadoras do RNA ribossomal de <i>Leishmania major</i> .	34
Figura 6 -	Gel de Agarose a 1,0% mostrando resultado da otimização da reação de PCR para amplificação da região IGS rRNA de <i>Leishmania major</i> .	42
Figura 7 -	Gel de Agarose a 1,0% mostrando resultado da reação de PCR para amplificação da região IGS rRNA de diferentes <i>Leishmania</i> spp.	43
Figura 8 -	Análise da qualidade de uma sequência de <i>Leishmania braziliensis</i> a partir do <i>primer</i> 18SR obtida no Sequenciamento Capilar.	44
Figura 9 -	Alinhamento das espécies de <i>Leishmania</i> sequenciadas a partir do <i>primer</i> 18S R.	45
Figura 10 -	Gel de Agarose a 1,0% mostrando resultado da reação de PCR para amplificação da região IGS rRNA de diferentes <i>Leishmania</i> spp.	46
Figura 11 -	Parte do alinhamento das sequências de <i>Leishmania</i> spp. obtidas no SNG.	47
Figura 12 -	Representação gráfica do tamanho das sequências de espécies causadoras da LTA obtidas após Sequenciamento Capilar e SNG.	48
Figura 13 -	Teste de concentração do sistema LB/IGS demonstrado na curva de amplificação.	51
Figura 14 -	Eficiência da reação com o sistema LB/IGS demonstrado em curva padrão.	52
Figura 15 -	Curvas de amplificação e <i>Melting</i> demonstrando reação cruzada entre espécies do Subgênero <i>Viannia</i> para o sistema LB/IGS.	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Distribuição e manifestações clínicas relacionadas às espécies de <i>Leishmania</i> no Novo Mundo.	22
Quadro 2 -	Código das diferentes cepas de referência utilizadas nos ensaios de PCR convencional e de PCR quantitativa em Tempo Real.	36
Quadro 3 -	Diretrizes para desenho de <i>primers</i> .	39
Quadro 4 -	Características dos <i>primers</i> desenhados para amplificação da região IGS rRNA de <i>Leishmania</i> spp.	41
Quadro 5 -	Resultados da busca pelos <i>primers</i> 28SF e 18SR no BLASTn.	41
Quadro 6 -	Quantidade de bases sequenciadas por espécie de <i>Leishmania</i> após SNG.	44
Quadro 7 -	Sistema de <i>primers</i> para complementação da região IGS de <i>Leishmania</i> spp.	45
Quadro 8 -	Quantidade de bases sequenciadas por espécie de <i>Leishmania</i> após Sequenciamento Capilar para complementação.	46
Quadro 9 -	Quantidade de bases sequenciadas por espécie de <i>Leishmania</i> após SNG.	48
Quadro 10 -	Tamanho e frequência da região IGSRE de diferentes <i>Leishmania</i> spp.	49
Quadro 11 -	Sistema de <i>primers</i> específicos para <i>L. braziliensis</i> tendo como alvo a região IGS rRNA.	50
Quadro 12 -	Análise logarítmica da probabilidade de reação cruzada para o sistema LB/IGS.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições de reação e ciclagem para cada enzima utilizada na amplificação da região IGS rRNA de <i>Leishmania major</i> .	35
Tabela 2 -	Análise pelo BLASTn das espécies de <i>Leishmania</i> sequenciadas a partir dos <i>primers</i> 28S F e 18S R.	44
Tabela 3 -	Análise pelo BLASTn das espécies de <i>Leishmania</i> sequenciadas a partir dos <i>primers</i> IGS1F e IGS1R.	46

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

µg -	Micrograma
µg -	Microlitro
Ct -	Ciclo <i>Threshold</i> (Ciclo limiar)
Cyt b -	Citocromo b
ddNTP -	<i>Dideoxynucleotide triphosphate</i> (Dideoxínucleotídeo trifosfato)
DNA -	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP -	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (Deoxínucleotídeo trifosfato)
ETS -	<i>External Transcribed Spacer</i>
G6PD -	<i>glucose-6-phosphate-dehydrogenase</i>
GP63 -	Glicoproteína 63
HSP -	<i>Heat Shock Protein</i>
IAM -	Instituto Aggeu Magalhães
IGS -	<i>Intergenic spacer</i>
ITS -	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Kb -	Kilobase
kDNA -	<i>kinetoplast DNA</i>
LCD -	Leishmaniose cutânea difusa
LCL -	Leishmaniose cutânea localizada
LMC -	Leishmaniose mucocutânea
LT -	Leishmaniose tegumentar
LTA -	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV -	Leishmaniose visceral

Min -	Minuto
MLEE -	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST -	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
ng -	Nanograma
NPT -	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
NTS -	<i>Non Transcribed Spacer</i>
°C -	Graus Celcius
OMS -	Organização Mundial da Saúde
Pb -	Pares de bases
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
Pmol -	Picomol
qPCR -	PCR quantitativa em Tempo Real
RFLP -	<i>Restriction Fragment Length Polimorfism</i>
RNA -	<i>Ribonucleic acid</i>
rRNA -	RNA ribossomal
Seg -	Segundo
SSU rRNA -	<i>Small Subunit rRNA</i>
™ -	<i>Trade Mark</i>
T_m -	Temperatura de <i>melting</i> (Temperatura de fusão)
U -	Unidade
CISGEN -	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	A Leishmaniose Tegumentar Americana	21
2.1.1	Manifestações clínicas da LTA	23
2.1.2	Diagnóstico e Tratamento da LTA	25
2.2	Identificação de <i>Leishmania</i> spp.	26
2.3	PCR em Tempo Real	27
2.4	O rRNA como alvo para identificação de <i>Leishmania</i> spp	29
2.4.1	<i>Intergenic Spacer</i> (IGS)	30
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS GERAL	33
4.1	Objetivos específicos	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	34
7.2	Teste inicial dos <i>primers</i> e otimização da reação de PCR	34
7.3	PCR da região IGS rRNA para diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	35
7.4	Purificação e Sequenciamento de capilar da região IGS rRNA de <i>Leishmania</i> spp.	36
7.5	Purificação e Sequenciamento de Nova Geração da região IGS rRNA de <i>Leishmania</i> spp.	37
7.5.1	Extração e mapeamento das Sequências obtidas pelo Sequenciamento de Nova Geração	37
7.6	Alinhamento e análise <i>in silico</i> das sequências	38
7.7	Desenvolvimento e otimização de sistema de <i>primers</i> para identificação de <i>L. braziliensis</i> ..	38
7.8	Análise dos dados	39
7.9	Considerações éticas	40
8	RESULTADOS	41

8.1	Teste inicial dos <i>primers</i> e otimização da reação de PCR	42
8.2	PCR da região IGS rRNA para diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	43
8.3	Sequenciamento capilar da região IGS rRNA	43
8.4	Desenho de <i>primers</i> para complementação da região IGS rRNA de <i>Leishmania</i> spp.	45
8.5	Análise das sequências obtidas no SNG.....	47
8.6	Análise <i>in silico</i> da região IGSRE	48
8.7	Depósito das sequências no GenBank.....	50
8.8	Desenho de <i>primers</i> específicos para <i>L. braziliensis</i>	50
8.9	Sistema específico para amplificação de <i>L. braziliensis</i> com alvo na região IGS rRNA	50
9	DISCUSSÃO	53
10	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO A – CADASTRO NO CISGEN	65

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) consiste de uma zoonose causada por múltiplas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* integrantes da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (REITHINGER et al., 2007). Até o momento, 11 espécies dermatópicas deste parasita foram identificadas no Novo Mundo, e estas foram divididas em complexos, sendo oito pertencentes ao subgênero *Viannia* e três ao subgênero *Leishmania*. As lesões ao tegumento, características da LTA, apresentam-se em diversos graus de severidade (LAINSON; SHAW, 2010).

A evolução da doença depende da espécie do protozoário e da condição imunológica do hospedeiro, podendo haver remissão dos sintomas ou avanço para diferentes manifestações clínicas (ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE, 2013). Dentre as principais formas da LTA, estão a leishmaniose cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC). A LCL se caracteriza por lesões exclusivamente cutâneas, únicas ou em pequeno número, e que tendem à cicatrização espontânea. Entre os agentes causadores dessa subforma está a *Leishmania (Viannia) naiffi*. A LCD é caracterizada por um grave processo infeccioso devido à grande quantidade do parasita *Leishmania (Leishmania) amazonensis* presente nas lesões e a sua capacidade de resistência ao tratamento, sendo assim a forma mais grave, porém rara, da LTA. Já a LMC compromete regiões mucosas do trato respiratório superior, e pode ser causada pela *Leishmania (Viannia) guyanensis*, que apresenta alta prevalência na região Norte do Brasil, e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, espécie de maior importância epidemiológica, devido sua ampla distribuição em todas as áreas onde a LTA é endêmica no país (BRASIL, 2017).

Diante da implicação direta entre a *Leishmania* spp. e as manifestações clínicas por ela causada, além de aspectos como padrões de transmissão específicos e o prognóstico da doença, as diferentes espécies podem reagir diferencialmente a certas drogas ou conduta terapêutica, evidenciando a necessidade da identificação etiológica para um melhor direcionamento terapêutico e controle eficiente da LTA (BLUM et al., 2012).

O padrão-ouro em caracterização de espécies de *Leishmania* defendido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é a *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). Entretanto, esta técnica demanda um longo tempo de processamento, necessita de cultura prévia e poucos laboratórios no mundo a realizam (VAN DER AUWERA; DUJARDINA,

2015). Tendo em vista as dificuldades para a prática da MLEE, a análise do genoma inteiro através de sequenciamento tem sido a melhor opção para a caracterização de espécies devido à grande quantidade de informações, alta resolução e praticidade fornecida por este tipo de abordagem (CANTACESSI et al., 2015).

Além do sequenciamento genômico, outros estudos demonstram a eficácia da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para o direcionamento da espécie do parasita presente em amostras clínicas devido à sua grande precisão e sensibilidade (MORAIS et al., 2016). A especificidade da reação se eleva com a utilização de sondas de hibridização através da tecnologia *TaqMan*, pois há a geração de fluorescência por meio de ligação específica da sonda em uma região interna da sequência amplificada (CRUZ et al., 2013).

Os alvos mais utilizados em ensaios de PCR com finalidade de diagnóstico e/ou caracterização são os derivados dos genes que codificam os RNAs ribossomais (rRNAs), uma vez que estes genes possuem sequências intercalares que, em geral, variam entre e dentro das populações, por exemplo a região conhecida como *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013), e sequências codificadoras conservadas, como a *Small Subunit* (SSU rRNA) (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013), entretanto, a região *Intergenic Spacer* (IGS), ainda não foi explorada na diferenciação de espécies de *Leishmania*, embora já tenha sido utilizada para outros organismos, como protozoários do gênero *Trypanosoma* (DIETRICH et al., 1993; DOWNEY; DONELSON, 1999; MARTÍNEZ-CALVILLO; HERNÁNDEZ, 1994) e bactérias do gênero *Bacillus* (ELDER; TURNER, 1995; RICCI; SCALI; PASSAMONTI, 2008; SCHNARE et al., 2000).

Além dos citados anteriormente, outros alvos já descritos para caracterização de espécies são os minicírculos do *kinetoplasto* DNA (kDNA) (JARA et al., 2013), a glicoproteína 63 (GP63) (VICTOIR et al., 2003), o Citocromo b (Cyt b) (VALENCIA et al., 2012), a Proteína de Choque Térmico (do inglês, *Heat Shock Protein* - HSP) (FRAGA et al., 2013), e a *glucose-6-phosphate-dehydrogenase* (G6PD) (GRAÇA et al., 2012). Contudo, existe uma concordância entre os estudos envolvendo os vários alvos sobre a dificuldade na diferenciação das espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* (CRUZ et al., 2013; ROELFSEMA et al., 2011).

Diante deste consenso e da importância clínica da identificação de espécies, este trabalho visa à análise de uma região promissora à caracterização de *Leishmania* spp. intimamente relacionadas geneticamente, e causadoras da LTA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

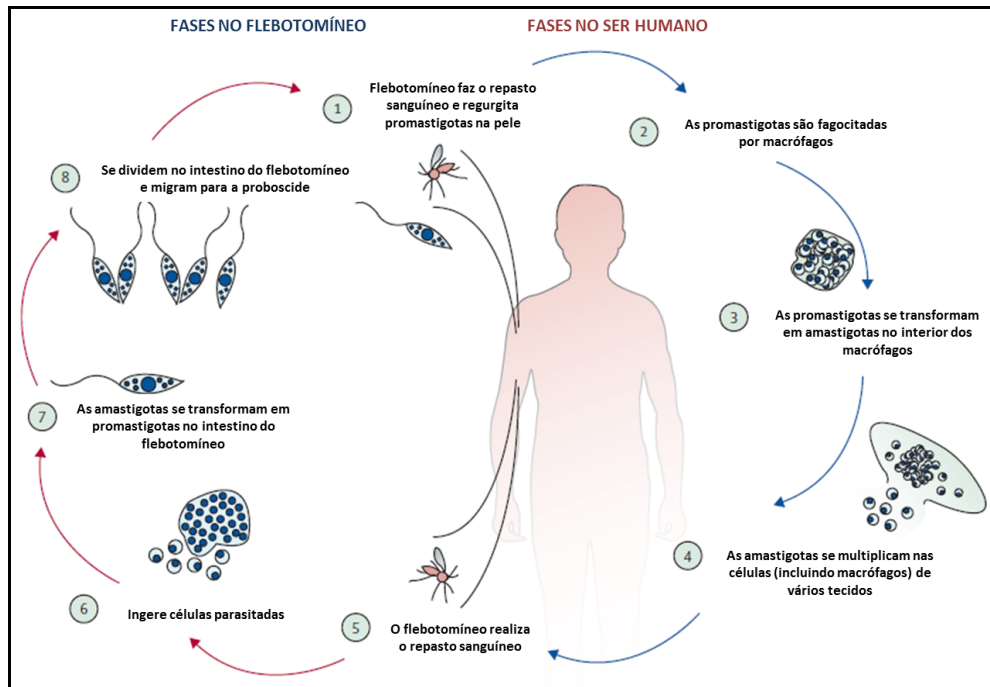
As leishmanioses caracterizam-se como doenças infecto-parasitárias, cujo agente etiológico são diversas espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Em sua grande maioria, são zoonoses transmitidas aos seres humanos através de repasto sanguíneo realizado por flebotomíneos fêmeas (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). As áreas endêmicas abrangem 98 países dispostos entre os trópicos e bacia mediterrânea, gerando risco de infecção para aproximadamente 350 milhões de pessoas. Cerca de 12 milhões de casos já foram registrados, com uma incidência anual mundial estimada de 0,7-1,2 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (LT) e 0,2-0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral (LV) (ALVAR et al., 2012).

Nas últimas décadas, fatores como migrações populacionais e desmatamento têm expandido a doença de áreas rurais para áreas urbanas e periurbanas. E, devido às condições climáticas e territoriais favoráveis, o Brasil encontra-se em posição de destaque na América Latina em relação aos casos de ambas as formas clínicas, possuindo registros de 26.008 casos/ano (BRASIL, 2017).

O tecido infectado pelos parasitas define as manifestações clínicas da leishmaniose, os quais podem estar em órgãos internos (LV), ou no tegumento (LT). Esta última pode se apresentar ainda ao menos de três formas principais: Leishmaniose cutânea localizada (LCL), Leishmaniose cutânea difusa (LCD) e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (BRASIL, 2017). O homem é infectado pela *Leishmania* de forma acidental, sendo mais frequente o parasitismo de cães, roedores e marsupiais, podendo assim, a doença ser de caráter zoonótico e antropozoonótico (NOYES, 1998).

Duas formas evolutivas são observadas na *Leishmania*: a forma amastigota, encontrada em vacúolos parasitóforos de células do sistema fagocítico mononuclear, nos hospedeiros vertebrados; e a forma promastigota, que é flagelada e infectante, encontrada no inseto vetor (hospedeiro invertebrado). Após a sucção de macrófagos infectados contendo amastigotas durante o repasto sanguíneo, o parasita se modifica morfológicamente no trato digestivo do flebotomíneo, transformando-se em promastigota (Figura 1) (NEVES, 2012).

Figura 1- Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

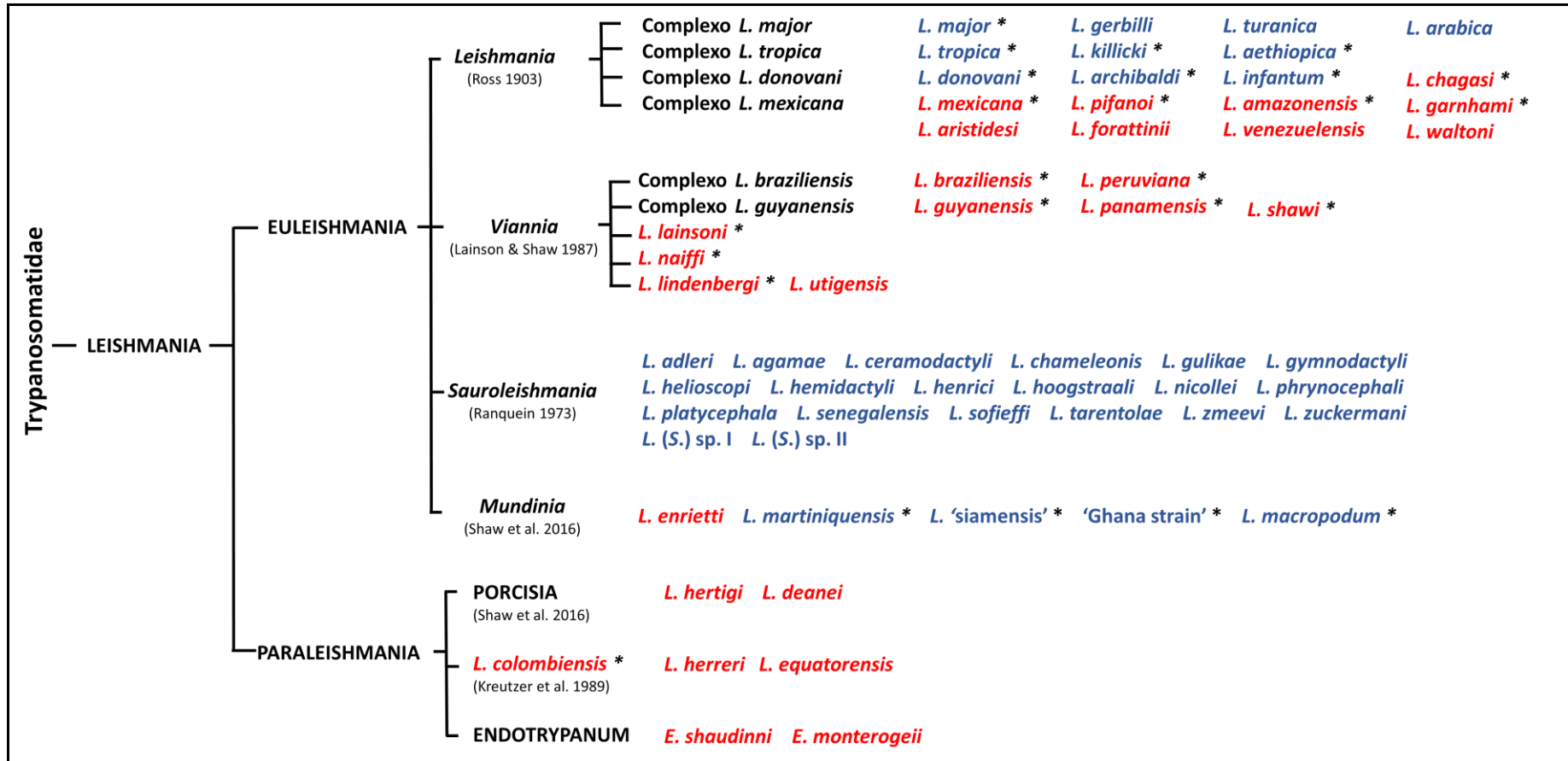


Fonte: Reithinger et al. (2007, tradução nossa).

Legenda: 1-4 – Etapas do Ciclo heteroxênico do parasita *Leishmania* no hospedeiro vertebrado; 5-8 – Etapas do Ciclo heteroxênico do parasita *Leishmania* no hospedeiro invertebrado. O protozoário ao ser inserido na corrente sanguínea do mamífero pelo flebotomíneo, é fagocitado por macrófagos que se rompem após sucessivas multiplicações dos parasitas, deixando-os disponíveis para inoculação por outros flebotomos.

Atualmente, 54 espécies de *Leishmania* são conhecidas (Figura 2), e pelo menos 21 delas são patogênicas para humanos (AKHOUNDI et al., 2016). Devido ao amplo espectro de reservatórios não humanos e ao grande número de vetores envolvidos na transmissão, um diagnóstico completo destes parasitas, identificando a espécie, é uma característica importante dos programas de controle (STAUCH et al., 2014). O grau de virulência e a manifestação clínica variam de acordo com as espécies de *Leishmania*, além de fatores como a genética e sistema imunológico do hospedeiro. Sendo assim, um diagnóstico preciso é essencial para o controle destes parasitas, além de fornecer suporte para a obtenção de dados epidemiológicos e direcionar escolhas terapêuticas com maiores chances de sucesso (AKHOUNDI et al., 2017).

Figura 2 – Cladograma com a atual classificação das espécies de *Leishmania*.



Fonte: Akhondi et al. (2017, tradução nossa).

Legenda: Classificação atualizada do gênero *Leishmania* referente à sua divisão em subgêneros, complexos e espécies; * Espécies patogênicas ao homem; em azul – Espécies mais comumente encontradas no Velho Mundo; em vermelho – Espécies mais comumente encontradas no Novo Mundo.

A estrutura taxonômica do gênero *Leishmania*, por convenção, é organizada em níveis de subgênero, complexos de espécies e subespécies. O gênero *Leishmania* é composto por pelo menos quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia* (AKHOUNDI et al., 2016).

O subgênero *Leishmania* possui quatro complexos principais, tendo cada um deles uma espécie representativa: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Leishmania) tropica*. A determinação de complexos no subgênero *Viannia* se torna mais complicado, devido a grande proximidade filogenética entre as espécies (LAINSON; SHAW, 2010). Entretanto, classifica-se o subgênero *Viannia* nos complexos das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, além de possuir as espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Viannia) utigensis* ainda não enquadradas em nenhum complexo (BRAGA et al., 2003; LAINSON; SHAW, 1987).

Ao serem comparados com outros eucariotos, os tripanossomatídeos, incluindo as *Leishmania* spp., possuem em sua organização genômica características peculiares, tais como alta densidade gênica dentro de pequenos cromossomos, ausência de íntrons e regiões codificantes policistrônicas. Em adição a isso, estes protozoários flagelados possuem como traço marcante a presença de uma organela homóloga a mitocôndria, denominada cinetoplasto, a qual contém uma grande rede de DNA próprio, denominado kDNA (AKHOUNDI et al., 2017; LUKEŠ; HASHIMI; ZÍKOVÁ, 2005).

Os genomas de *Leishmania* variam de tamanho entre as espécies, possuindo desde 29 Mb para a *L. amazonensis* (REAL et al., 2013) até 33 Mb para *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* (PEACOCK et al., 2007). Outra variação entre as espécies é em relação à quantidade de cromossomos: *L. amazonensis* e *L. mexicana* possuem 34, enquanto que *L. braziliensis* possui 35 e *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum* possuem 36 (REAL et al., 2013). Apesar das diferenças numéricas cromossômicas e versatilidade no tropismo tecidual, as diferentes espécies de *Leishmania* exibem em seus genomas conservação em relação ao conteúdo e arquitetura genética (CANTACESSI et al., 2015).

2.1 A Leishmaniose Tegumentar Americana

Nas Américas (ou Novo Mundo), a LT é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), possuindo casos registrados em grande parte da área compreendida entre o

sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Na América do Sul, todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile apresentam circulação do parasita *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Os fatores de risco para esta doença comumente incluem sexo (o viés sexual geralmente aponta para padrões comportamentais que aumentam a exposição vetorial), idade, acúmulo de determinados materiais domésticos e de construção, ausência de saneamento básico, e também a presença de animais na residência e/ou proximidades (DESJEUX, 2001).

Grande parte das espécies de *Leishmania* encontradas no continente americano (Quadro 1) pertencem ao subgênero *Viannia*, as quais são todas zoonóticas e coexistem em áreas endêmicas, como o Brasil (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012). A maioria das espécies, tanto do Velho Mundo como do Novo Mundo, causam apenas lesões na pele, porém a *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* podem causar também lesões em mucosas (LMC) (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Quadro 1 – Distribuição e manifestações clínicas relacionadas às espécies de *Leishmania* no Novo Mundo.

<i>Leishmania</i> spp.	Principais manifestações clínicas	Principal distribuição geográfica
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL, LMC	América do Sul Partes da América Central e México
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LCL, LMC	América do Norte e Sul Sul da América Central
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LCL	Peru
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LCL	Norte da América do Sul
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, LCD	América do Sul
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LCL, LCD	América Central, México, EUA
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Norte da América do Sul
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LCL	América do Sul

Fonte: Reithinger et al. (2007, tradução nossa).

Nota: LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada; LMC – Leishmaniose Mucocutânea; LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa.

Apenas no Brasil, sete espécies causadoras da LTA já foram identificadas, das quais seis são do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (BRASIL, 2017). As regiões Norte e Nordeste do Brasil são as localidades com maior diversidade etiológica, com destaque para o Estado do Pará, onde já foram encontradas as sete espécies circulantes no país (BRASIL, 2017).

A *L. (V.) guyanensis* possui um ciclo, aparentemente, restrito à região Norte. Nesta localidade esta espécie é responsável por diversos casos de LCL, e em situações raras há também o comprometimento mucoso. Os principais vetores deste parasita são *Lutzomia umbratilis* e *Lutzomia anduzei* (BRASIL, 2017).

A baixa frequência de casos com *L. (L.) amazonensis* se dá devido à característica pouco antropofílica de seus flebotomíneos vetores (*Lutzomia flaviscutellata*, *Lutzomia reducta* e *Lutzomia olmeca nociva*). Entretanto, a tendência desta espécie de causar anergia celular (ausência de resposta imunitária) e sua resistência ao tratamento, à torna um importante parasita (LAINSON; SHAW, 2010). A *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente no Brasil. Ela já foi isolada em todos os estados do país, e pode ser transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos tais como, *Lutzomia whitmani*, *Lutzomia intermédia*, *Lutzomia wellcomei*, entre outras (BRITO et al., 2012).

2.1.1 Manifestações clínicas da LTA

A LTA em seres humanos pode ser causada por uma ampla gama de *Leishmania* spp., sendo este, assim como idade, sexo, características genéticas e imunológicas, fatores que influenciam a diversidade de apresentações clínicas (Figura 3) demonstradas por pacientes com LTA através dos anos (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Embora a maioria das infecções possam vir a permanecer assintomáticas, havendo o aparecimento de lesões cutâneas e/ou mucosas, sua resolução se dá em um processo de cicatrização ao longo da vida, que, dependendo do tamanho e da localização, pode causar trauma substancial aos indivíduos (YANIK et al., 2004).

Na área do corpo onde o flebotomíneo realizou o repasto, geralmente se desenvolve um pequeno eritema que evolui para uma pápula, e então em um nódulo, que progressivamente úlcera durante um período de 2 semanas a 6 meses para se tornar a lesão que é característica da LCL. A cicatrização espontânea geralmente resulta em proteção ao longo da vida para esta doença (REITHINGER et al., 2007).

Considerada uma manifestação clínica rara, a LCD caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos não-ulcerativos, carregados de parasitas, que podem cobrir o corpo inteiro de um indivíduo infectado, disseminando-se a partir do local inicial de infecção. As principais espécies causadoras deste tipo de leishmaniose são a *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Quando

comparado com a LCL, a LCD possui uma maior dificuldade de tratamento e os pacientes não se curam espontaneamente (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Outra manifestação causada por disseminação parasitária através de vias linfáticas e hematogênicas é a LMC, porém o local de destino são as mucosas. Os primeiros sinais são, normalmente, inflamação e congestionamento nasal, seguidos de ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo. Em alguns casos, o palato mole, os lábios, a faringe ou laringe e as bochechas também são acometidos, gerando uma forma extremamente grave e desfigurante. Nesse tipo de apresentação clínica, assim como na LDC, nunca há a cura espontânea, e é de difícil tratamento, além de estar associado a infecções bacterianas secundárias e ser uma doença potencialmente fatal (MARSDEN, 1986; REITHINGER et al., 2007).

Apesar de haverem relatos de casos de LMC causada por *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, nas Américas, é mais comumente associado a *L. braziliensis*, e a América do Sul é o local com maior número de ocorrências (TORRES-GUERRERO et al., 2017). O acometimento da mucosa é a complicação mais grave nas infecções por *L. braziliensis*. Cerca de 5% das infecções por LCL resultam em leishmaniose mucosa, além de haver casos em que ocorrem concomitantemente (BOAVENTURA et al., 2006).

Figura 3 - Espectro clínico da leishmaniose tegumentar Americana.



Fonte: Alvar, Jiménez e Moreno (2017).

Legenda: A – Leishmaniose Cutânea Localizada; B – Leishmaniose Mucocutânea; C – Leishmaniose Cutânea Difusa.

2.1.2 Diagnóstico e Tratamento da LTA

A heterogeneidade de aspectos clínicos apresentada na LTA, a torna uma afecção de difícil diagnóstico, sendo necessário o envolvimento de outros fatores para uma determinação precisa da doença, como os dados epidemiológicos do paciente e o exame clínico realizado pelo médico assistente (anamnese) (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Além disso, doenças com um espectro clínico semelhante, como lepra, câncer de pele e micoses cutâneas são comuns em áreas endêmicas para leishmaniose, sendo assim, imprescindível o diagnóstico diferencial (ESCOBAR et al., 1992).

As análises clínicas laboratoriais que podem ser realizadas para o diagnóstico da LTA incluem testes parasitológicos, como o exame direto e o isolamento do parasito em meio de cultura; testes imunológicos, através da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por métodos sorológicos; e testes moleculares que identificam o DNA do parasita extraído diretamente das amostras biológicas (BRASIL, 2017; ELMAHALLAWY et al., 2014; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Devido à alta incidência da doença em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o exame direto continua a ser considerado como padrão-ouro por ser de relativo baixo custo, e de alta especificidade, apesar da baixa sensibilidade. Nesse exame, visualizam-se, através de microscopia óptica, formas amastigostas do parasita oriundas de procedimentos como, escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa, corados com Giemsa (BRASIL, 2017).

O cultivo de *Leishmania* permite a posterior identificação de espécies, porém exige extrema cautela em relação à contaminação do meio de cultura no qual se desenvolvem as formas promastigotas do parasita, além de ser oneroso e demandar um longo tempo para obtenção dos resultados (BRASIL, 2017; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

Abordagens moleculares baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vêm sendo extensivamente exploradas nas últimas décadas, como um método rápido, sensível e preciso para o diagnóstico da LTA (CRUZ et al., 2013). Além disso, através da localização de alvos moleculares específicos no DNA do gênero *Leishmania*, este método é capaz de associar diagnóstico, identificação e quantificação parasitária, além de monitoramento terapêutico, com a utilização de uma de suas variações: a PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) (MORAIS et al., 2016; MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2017; PAIVA-

CAVALCANTI et al., 2013; PESSOA-E-SILVA et al., 2016; TRAJANO-SILVA et al., 2017).

Após confirmação do diagnóstico por critérios laboratoriais, ou quando este não for possível de ser realizado, por critérios clínico-epidemiológicos, o tratamento da LTA poderá ser realizado dependendo da manifestação clínica e espécie. Os esquemas terapêuticos são variados, sendo a abordagem mais comum, o uso de Antimoniais pentavalentes como droga de primeira escolha. Outros medicamentos utilizados são a Anfotericina B, a Pentoxifilina e a Pentamidina, esta última recomendada como tratamento de primeira escolha para casos de LCL causada por *L. guyanensis* (BRASIL, 2017).

2.2 Identificação de *Leishmania* spp.

Os métodos clássicos para o diagnóstico da LTA, como os exames parasitológicos e imunológicos, não diferenciam *Leishmania* spp. que causam esta doença. As técnicas desenvolvidas baseadas na PCR, em sua grande maioria, são gênero-específicas, detectando apenas a presença ou ausência de DNA parasitário (AKHOUNDI et al., 2017). Entretanto, abordagens que utilizam princípios da PCR convencional associado à técnicas de biologia molecular adicionais, como a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), o sequenciamento e a qPCR, estão sendo desenvolvidas com maior frequência, e oferecem alternativas mais completas ao diagnóstico da LTA (ELMAHALLAWY et al., 2014; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015).

A PCR seguida de RFLP consiste de uma técnica em que se visualiza, através de eletroforese em gel, a variação entre padrões de fragmentos de DNA que são produzidos após digestão do produto da PCR com enzimas de restrição. Este método já foi utilizado em estudos objetivando a discriminação de *Leishmania* spp., particularmente tendo-se como alvo as regiões ITS1 e HSP70 (MONROY-OSTRIA et al., 2014; MONTALVO et al., 2012).

O sequenciamento de DNA de primeira geração, também conhecido como sequenciamento de Sanger, representa uma metodologia na qual são incorporados de forma seletiva didesoxinucleotídeos (ddNTPs) na terminação da cadeia de DNA, enquanto a mesma está em crescimento (SANGER et al., 1977).

Além disso, desde a utilização do primeiro sequenciador automático, em 1987 (Applied Biosystems 370A), até os dias atuais com os Sequenciadores de Nova Geração (SNG), o sequenciamento é uma técnica que está se aprimorando de forma rápida em relação

à sua qualidade, tamanho de sequências disponibilizadas e velocidade de leitura, além de possuir um valor de mercado cada vez mais acessível aos pesquisadores.

A segunda geração de sequenciadores trouxe consigo o chamado sequenciamento de alto rendimento que está sendo amplamente utilizado em estudos de genômica (estudo do genoma completo ou parcial de um organismo), epigenômica (estudo das modificações do genoma que não envolve mudança na sequência de DNA), transcriptômica (estudo das moléculas de RNA transcritas que determinam as proteínas a serem formadas pela célula), além de caracterização de espécies parasitárias, incluindo a *Leishmania* (CANTACESSI et al., 2015).

As plataformas de SNG podem gerar informação sobre milhões ou até mesmo bilhões de pares de bases em uma única corrida. Dentre as principais, destaca-se a Solexa (Illumina) por ser a mais utilizada, porém também estão disponíveis a 454 FLX (Roche), a Ion Torrent da Life Technologies, a SOLiD 27 (Applied Biosystems), a PacBio (Pacific Bioscience) e a Nanopore (Oxford Nanopore Technologies). Sendo as duas últimas plataformas, conhecidas como sequenciamento de terceira geração (THERMES, 2014).

Uma associação de PCR e sequenciamento foi feita para o desenvolvimento do *Multilocus Sequence Typing* (MLST), método em que vários genes *housekeeping* não vinculados, geralmente de 4 a 6, são amplificados ao mesmo tempo e posteriormente analisados por sequenciamento. Quanto maior for o quantitativo de biomarcadores, maior será o potencial de discriminação da técnica (BOITÉ et al., 2012).

Entretanto, apesar das vantagens fornecidas pelas técnicas acima descritas, o padrão-ouro estabelecido ainda nos dias atuais para a caracterização de *Leishmania* spp. é a MLEE (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). Com este procedimento, visualiza-se o padrão de mobilidade através de eletroforese em gel de diversas isoenzimas (enzimas com estrutura molecular diferente, porém com alta identidade entre si) do parasita (CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1994). As principais objeções à utilização deste método residem na necessidade de cultivo prévio do parasita, o longo e laborioso período de processamento que o mesmo demanda, além da exigência de equipamentos especializados (SCHÖNIAN; MAURICIO; CUPOLILLO, 2010).

2.3 PCR em Tempo Real

A qPCR, uma inovação da PCR convencional, é uma ferramenta da biologia molecular de grande precisão e sensibilidade, capaz de quantificar e registrar, em gráficos gerados no computador interligado ao termociclador, a carga parasitária de uma amostra durante a fase exponencial da reação de amplificação do material genético através da emissão e captação de fluorescência (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Dentre as variações da qPCR, tem-se a utilização do fluorocromo *Sybr Green*, o qual é capaz de diferenciar amostras pelas variações de temperatura de *melting* (T_m), uma vez que atua como agente intercalante inespecífico de dupla fita de DNA, onde é possível avaliar a especificidade da amplificação através da T_m (PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010). Além da utilização de *Sybr Green*, a qPCR possibilita a utilização de sondas de hibridização, através da tecnologia *TaqMan*. Esta reação apenas gera fluorescência se houver a ligação específica da sonda em uma região interna da sequência amplificada. Durante a amplificação, a Taq polimerase, pela sua atividade exonucleásica, desloca a extremidade 5' da sonda *TaqMan* (contendo o fluorocromo *reporter*) clivando a sonda. Assim, pelo fato do repórter ser liberado e não permanecer próximo ao *Quencher*, o qual é um inibidor de fluorescência, ocorre a liberação da mesma (MORTARINO et al., 2004; PAIVA-CAVALCANTI, 2008; YANG; ROTHMAN, 2004).

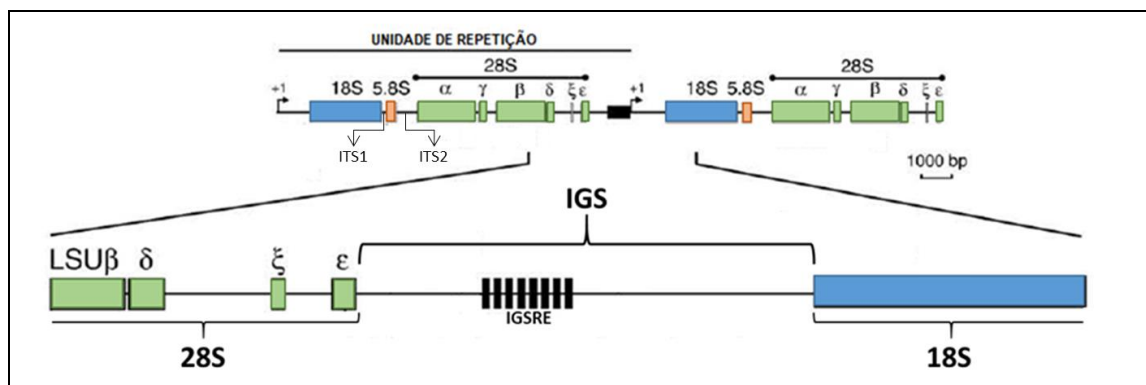
A qPCR além da alta sensibilidade e especificidade que possui, tem a vantagem de expor seus resultados de forma quantitativa, possibilitando diversas análises adicionais ao diagnóstico, dentre elas a carga parasitária presente na amostra clínica do paciente. Assim, pode ser realizado um acompanhamento do tratamento deste indivíduo e a constatação da eficácia ou falha terapêutica (ADAMS et al., 2014; MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2017). Com a utilização de sondas de hibridização, através da tecnologia *TaqMan probe*, além de se elevar a especificidade da reação, torna-se possível a amplificação de vários alvos a partir do desenho de sondas em diferentes regiões genômicas, possibilitando-se assim, a realização de ensaios multiplex (ADAMS et al., 2014; GOMES et al., 2017).

Diversos alvos moleculares já foram utilizados para caracterização de *Leishmania* spp. em ensaios de PCR e suas variações. Estes alvos estão localizados em diversas regiões do genoma do parasita, internas ou externas ao cromossomo. Os mais populares são os relacionados ao rRNA (EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013), minicírculos e maxicírculos do kDNA (JARA et al., 2013; VALENCIA et al., 2012), genes do metabolismo de carboidratos (G6PD) (GRAÇA et al., 2012) e genes de antígenos (GP63 e HSP70) (FRAGA et al., 2010; VICTOIR et al., 2003).

2.4 O rRNA como alvo para identificação de *Leishmania* spp.

O cromossomo 27 é o local onde se encontram a maior parte dos genes que codificam o RNA ribossomal (rRNA). Estes, estão arranjos *in tandem* com múltiplas cópias (Figura 4), cujo tamanho total é estimado em 12,5 Kb (YAN et al., 1999). Estes genes são compostos de unidades altamente conservadas dentro do gênero *Leishmania*, e outras que podem variar entre espécies, tornando esta região um alvo bastante estudado para o diagnóstico e identificação de *Leishmania* spp. (EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013).

Figura 4 – Organização dos genes do RNA ribossomal em eucariotos.



Fonte: Eickbush e Eickbush (2007, tradução nossa).

Legenda: Localização das subunidades componentes do rRNA no genoma de eucariotos. Unidade de Repetição – Múltiplas cópias *in tandem* do rRNA. Detalhe expandido de uma unidade típica. rRNA – RNA ribossomal; IGS – *Intergenic Spacer*; ITS – *Internal Transcribed Spacer*.

As unidades de rRNA são codificadas por uma única unidade de transcrição, nomeada de cistron ribossomal, que é transcrita pela RNA polimerase I, a fim de obter uma alta taxa de transcrição primária (45S ou pré-RNA), o qual inclui os espaçadores transcritos externos e internos (TORRES-MACHORRO et al., 2010).

Estas regiões são denominadas, assim como para a maioria dos eucariotos, de Subunidade Menor (do inglês *Small Subunit* – SSU), que codifica o 18S rRNA, e Subunidade Maior (do inglês *Large Subunit* – LSU), composta pelo 5.8S e 28S rRNAs, o LSU é fragmentado em seis moléculas (LSU α , LSU β , LSU γ , LSU δ , LSU ξ e LSU ϵ) sendo a nomenclatura baseada no tamanho das moléculas.

Separando as regiões 18S da 5.8S e esta última da 28S, estão os espaçadores transcritos internos (do inglês *Internal Transcribed Spacer* – ITS) I e II, respectivamente. Já, a separação das regiões 28S da 18S se dá através de um espaçador intergênico (do inglês *Intergenic*

Spacer – IGS) que consiste de um espaçador transcrito externo (do inglês *External Transcribed Spacer* – ETS) mais um espaçador não transcrito (do inglês *Non Transcribed Spacer* – NTS). Após o processamento dos transcritos primários, há a remoção do ITS e ETS, que são rapidamente degradados (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007).

2.4.1 *Intergenic Spacer* (IGS)

A região que separa as duas maiores subunidades codificantes do rRNA (28S e 18S) é relatada como um componente genômico com grande variabilidade entre espécies de *Leishmania* em relação a tamanho, sequência e número de repetições; em contraste com as regiões que codificam o rRNA maduro, nas quais é reconhecido sua alta conservação entre espécies (ABREU-BLANCO et al., 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2001)

Esta inconstância de tamanho na região que separa as duas maiores subunidades se dá, devido a um elemento de repetição que possui entre 16 e 275 cópias, cada uma com 62 pb em média; o que gera uma variação de 4 a 12 Kb de comprimento no DNA do parasita, conhecido como região IGSRE (região repetitiva do IGS rRNA) (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2001; ORLANDO et al., 2002). Até o momento, não está definido o significado funcional para a sequência e para as diferenças de tamanho entre o IGSRE de diferentes espécies de tripanossomatídeos. Porém acredita-se em hipóteses, tais como estimulação da transcrição do rRNA, como ocorre com os organismos *Xenopus laevis* e *Drosophila melanogaster* (GRIMALDI; DI NOCERA, 1988; LABHART; REEDER, 1984), também podem desempenhar um papel de origem de replicação ou serem locais para recombinação inter e intracromossômica (HABER, 1992). Dentro dos espaçadores intergênicos e NTS, estas sequências repetitivas estão sujeitas à “evolução em concerto”, podendo então, os espaçadores serem tratados como genes únicos visto que há grande semelhança entre os mesmos dentro de uma espécie, entretanto, pouca identidade dentre espécies próximas (EICKBUSH; EICKBUSH, 2007).

Foi observada a conservação em nível de subgênero para esta região, uma vez que ela possui o mesmo tamanho entre as espécies do subgênero *Sauroleishmania*, assim como dentre as espécies do subgênero *Leishmania*. Este espaçador é considerado adequado para mapear relações evolutivas entre espécies de *Leishmania* intimamente relacionadas, uma vez que se apresenta de maneira menos conservada do que os genes que codificam o rRNA (AKHOUNDI et al., 2017).

O ETS está localizado fora do rRNA estrutural 18S e é similar ao ITS. Estudos demonstram um tamanho de 1050 pb, 1060 pb, e 1020 pb para as espécies *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. donovani*, respectivamente. Sendo observada também a possibilidade de distinção entre subgêneros através desta região (GAY; WILSON; DONELSON, 1996; ULIANA et al., 1996; YAN et al., 1999).

A área genômica compreendida como NTS possui de 2 a 30 Kb. É nesta região que se encontra a maior quantidade dos elementos regulatórios indispensáveis à transcrição dos genes de rRNA (SOLLNER-WEBB; MOUGEY, 1991). Encontra-se na extremidade 5', o promotor da região codificante do rRNA e na extremidade 3', um ou mais terminadores, além de uma origem de replicação de DNA. Também são encontrados outros elementos de regulação, como promotores dos espaçadores e potenciadores “*enhancers*” da atividade do promotor (REEDER, 1989).

3 JUSTIFICATIVA

Devido à implicação direta entre a espécie de *Leishmania* e a manifestação clínica por ela causada (BLUM et al., 2012), além de poderem reagir diferencialmente à certas drogas ou conduta terapêutica, faz-se necessário um método que ao diagnosticar a doença também identifique a etiologia parasitária. As técnicas clássicas disponíveis não realizam essa associação, além de apresentarem limitações, tais quais, baixa sensibilidade e necessidade de microscopistas experientes para reconhecimento do parasita (ELMAHALLAWY et al., 2014).

Atualmente, muitas técnicas são capazes de discriminar esses protozoários em níveis de gênero, subgênero e complexos, porém a identificação em nível de espécie das mesmas denota uma problemática maior (KUHLIS et al., 2013; ROELFSEMA et al., 2011; WORTMANN et al., 2005). A razão por trás disso é que as espécies pertencentes ao mesmo complexo apresentam alta similaridade genômica, complicando não apenas a sua identificação, mas também dificultando uma definição incontestável da espécie (SCHÖNIAN; MAURICIO; CUPOLILLO, 2010). Portanto, é necessária a identificação de mais alvos moleculares advindos de regiões variáveis o suficiente para distinguir espécies dentro de um mesmo complexo (VAN DER AUWERA; DUJARDINA, 2015).

Os estudos para a região IGS rRNA foram conduzidos essencialmente para espécies do subgênero *Leishmania*, demonstrando alta variabilidade em relação à tamanho, sequência e número de repetições (ABREU-BLANCO et al., 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2001). Entretanto, não há estudos relativos à caracterização dessa região para espécies do subgênero *Viannia*, sendo foco do presente trabalho o estudo dessa região para fins de identificação das espécies, bem como, fornecer dados de sequências para as espécies deste subgênero.

Assim, propõe-se verificar diferenças entre as sequências de diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas com a LTA para a região IGS rRNA, objetivando a discriminação das mesmas e propondo a utilização desta região como um possível alvo a ser aplicado para caracterização de espécies através de ferramentas de biologia molecular. Sendo esta uma pesquisa de base, que visa a contribuição ao meio científico, com informações acerca de uma região pouco explorada do DNA do parasito.

4 OBJETIVO GERAL

Analisar e verificar a aplicabilidade da região IGS rRNA de *Leishmania* spp. para identificação de espécies que causam a Leishmaniose Tegumentar Americana.

4.1 Objetivos específicos

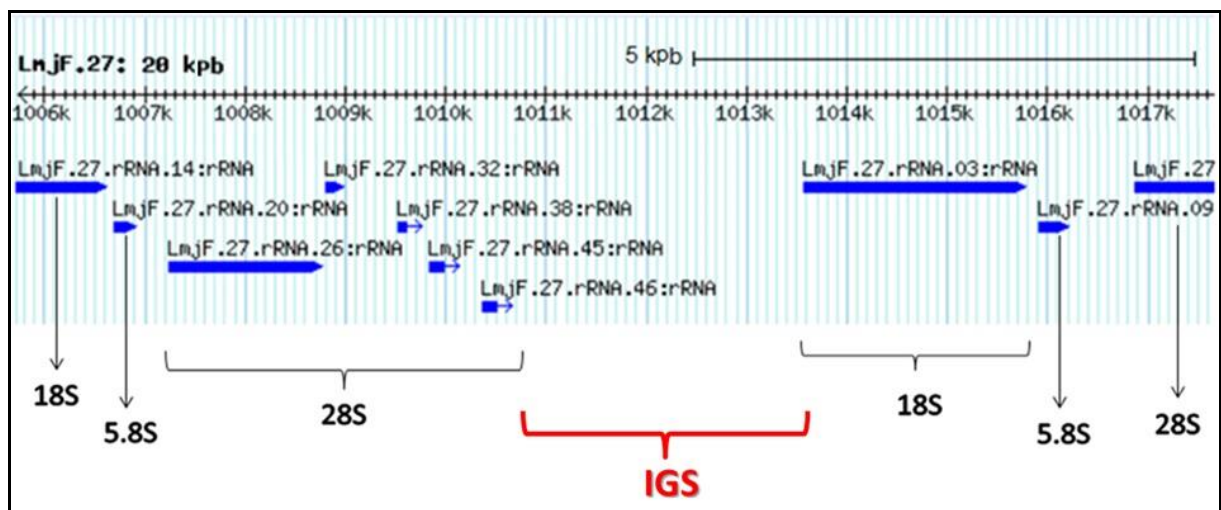
- a) Desenvolver de sistema específico para detecção da região IGS rRNA de *Leishmania* spp.;
- b) Analisar as sequências obtidas, comparando com as sequências disponíveis em bancos de dados genômicos;
- c) Disponibilizar as sequências em banco de dados genômicos;
- d) Propor ferramenta para caracterização de *Leishmania* spp.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Com base em sequências de *Leishmania major*, disponíveis no TriTrypdb (ASLETT et al., 2010), para as regiões 18S (LmjF.27.rRNA.03) e 28S (LmjF.27.rRNA.46) foram desenhados: um *primer reverse* no início da região 18S rRNA e um *primer forward* no fim da região 28S rRNA (LSUε), utilizados para amplificação completa da região IGS rRNA (Figura 5) de diferentes espécies de *Leishmania*. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do *software Primer Express* (Applied Biosystems, versão 2.0) a partir de alinhamento realizado pela ferramenta BioEdit (versão 7.2.6).

Através da distância entre as referidas sequências (LmjF.27.rRNA.03 e LmjF.27.rRNA.46), foi realizado uma estimativa do tamanho do produto a ser amplificado. Os *primers* desenhados também foram submetidos à uma busca na plataforma BLASTn (blast.ncbi.nlm.nih.gov) para que fossem encontradas as sequências isoladamente da região IGS rRNA e determinado seus tamanhos e sequências para cada espécie.

Figura 5 – Subunidades formadoras do RNA ribossomal de *Leishmania major*.



Fonte: Aslett et al. (2010).

Legenda: IGS – *Intergenic Spacer*; kpb – Mil (1000) pares de base. Cada fragmento representado pela barra azul e seta para a direita é referente à uma sequência da região apontada pelas setas pretas e chaves (18S, 5.8S, 28S e IGS). O tamanho da região acima mostrado equivale a 5 mil pares de base (5kpb). Devido à distância entre a base 1011k e 1013k, estima-se que o tamanho da região IGS possui entre 2 e 3kpb.

7.2 Teste inicial dos *primers* e otimização da reação de PCR

Para o teste inicial de funcionalidade dos *primers* e padronização da melhor enzima para a reação, foram realizados ensaios utilizando amostras de DNA genômico da cepa de referência de *L. major* (MRHO/SU/1959/P-strain), e três tipos de enzimas DNA Polimerase

(AccuPrime™ [Invitrogen], Taq DNA Polimerase *recombinant* [Invitrogen] e a GoTaq® [Promega] (Tabela 1).

Tabela 1 - Condições de reação e ciclagem para cada enzima utilizada na amplificação da região IGS rRNA de *Leishmania major*.

Condições de Reação		Condições de Ciclagem			
10X AccuPrime™ reaction mix AccuPrime (2.5 U/μL) 28S F (10 pmol/μL) 18S R (10 pmol/μL) Água MiliQ DNA de <i>L. major</i> (246,0 ng/μL) TOTAL	2,5 μL	Desnaturação inicial 94°C – 2:00 min			
	0,2 μL	10 ciclos		35 ciclos	
	1,0 μL	Desnaturação	94°C – 0:30 seg	Desnaturação	94°C – 0:30 seg
	1,0 μL	Anelamento	64°C – 0:30 seg	Anelamento	54°C – 0:30 seg
19,3 μL	Extensão	68°C – 2:30 min	Extensão	68°C – 2:30 min	
1,0 μL	25,0 μL				
10X PCR buffer Taq Polimerase Invitrogen (5U/μL) dNTPs (2 mM) MgCl₂ (25 mM) 28S F (10 pmol/μL) 18S R (10 pmol/μL) Água MiliQ DNA de <i>L. major</i> (246,0 ng/μL) TOTAL	2,5 μL	Desnaturação inicial 94°C – 2:00 min			
	0,2 μL	10 ciclos		35 ciclos	
	1,0 μL	Desnaturação	94°C – 0:30 seg	Desnaturação	94°C – 0:30 seg
	0,75 μL	Anelamento	64°C – 0:30 seg	Anelamento	54°C – 0:30 seg
1,0 μL	Extensão	68°C – 2:30 min	Extensão	72°C – 2:30 min	
17,55 μL	25,0 μL				
5X Green GoTaq® Reaction Buffer GoTaq DNA Polimerase (5U/μL) dNTPs (2 mM) MgCl₂ (25 mM) 28S F (10 pmol) 18S R (10 pmol) Água MiliQ DNA de <i>L. major</i> (246,0 ng/μL) TOTAL	5,0 μL	Desnaturação inicial 94°C – 2:00 min			
	0,13 μL	10 ciclos		35 ciclos	
	1,0 μL	Desnaturação	94°C – 0:30 seg	Desnaturação	94°C – 0:30 seg
	1,5 μL	Anelamento	64°C – 0:30 seg	Anelamento	54°C – 0:30 seg
1,0 μL	Extensão	68°C – 2:30 min	Extensão	72°C – 2:30 min	
1,0 μL	14,37 μL				
1,0 μL	25,0 μL				

Fonte: A autora.

Nota: F – Forward; R – Reverse; seg – Segundos; min – Minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose à 1,0%, corados com 5 μL de SYBR® *Safe DNA Gel Stain*, e visualizados em transluminador com luz ultravioleta, utilizando o marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Invitrogen).

7.3 PCR da região IGS rRNA para diferentes espécies de *Leishmania*

Utilizando os *primers* desenhados conforme descrito anteriormente (item 7.1) e as condições de reação e ciclagem mais adequadas após visualização do resultado do item 7.2, foi realizada uma PCR convencional utilizando amostras de DNA genômico de cepas de referências de 11 espécies de *Leishmania* (Quadro 2).

Quadro 2 – Código das diferentes cepas de referência utilizadas nos ensaios de PCR convencional e de PCR quantitativa em Tempo Real

Espécie	Código da cepa
<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147
<i>Leishmania shawi</i>	IWHI/BR/1999/M17904
<i>Leishmania naiffi</i>	MDAS/BR/1990/M5533
<i>Leishmania lainsoni</i>	MHOM/BR/1981/M6426
<i>Leishmania amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH8
<i>Leishmania mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL 21
<i>Leishmania tropica</i>	MHOM/SU/1958/Strain OD
<i>Leishmania major</i>	MRHO/SU/1959/P-strain
<i>Leishmania donovani</i>	MHOM/ET/1967/HU3
<i>Leishmania infantum/chagasi</i>	MHOM/TN/1980/IPT1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cepa Y

Fonte: A autora a partir dos Serviços de Referência em Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Aggeu Magalhães.

A reação foi realizada com um volume final de 25 μ L. Como controle negativo foi utilizado apenas a mistura de reagentes sem DNA. A ciclagem de temperaturas foi realizada no aparelho *Eppendorf Mastercycler gradiente*.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições do item anterior (7.2). As bandas com tamanho mais aproximado ao estimado pela análise *in silico* de *L. major* (item 7.1) foram excisadas do gel e submetidas à purificação e sequenciamento.

Devido à não obtenção da sequência consenso, foi necessário o desenho de novos *primers* para a complementação desta região, seguindo os mesmos parâmetros de desenho e otimização definidos nos itens 7.1 - 7.3.

7.4 Purificação e Sequenciamento de capilar da região IGS rRNA de *Leishmania* spp.

As bandas específicas extraídas do gel de agarose (item 7.3) obtidas após PCR, foram purificadas usando o *PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit* (Invitrogen, Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. As amostras purificadas foram encaminhadas ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (NPT-IAM) para realização do sequenciamento capilar utilizando o *Bio Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (versão 3.1) (Applied Biosystems) em um sequenciador automático (ABI 3500xL *Genetic Analyzer*). As sequências foram determinadas em duas direções para cada espécie, em todos os procedimentos de sequenciamento realizados.

7.5 Purificação e Sequenciamento de Nova Geração da região IGS rRNA de *Leishmania* spp.

Após repetição do ensaio do item 7.3 e purificação convencional conforme item 7.4, foi realizada uma segunda purificação do produto por *Beads* magnéticas, utilizando-se o Agencourt® AMPure® XP PCR Purification kit com auxílio do separador magnético BILATEST™ para placas de 96 poços.

O sequenciamento foi realizado em unicamente para cada amostra. As bibliotecas foram construídas usando o kit *Nextera XT Library Prep Kit* (Illumina, San Diego, CA, USA) com o *input* inicial de 2ng de DNA. Este kit possui um conjunto de transposases que foram utilizadas para fragmentar o DNA e simultaneamente adicionar os adaptadores. Posteriormente, estes adaptadores foram indexados através de reações de PCR, de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas foram processadas com indexadores únicos para cada amostra, a fim de serem sequenciadas e identificadas em um mesmo experimento, no qual o *MiSeq Reagent Kit V2* de 500 ciclos foi utilizado. Este kit possui a capacidade de produzir até 15 milhões de sequências de 500 pares de bases cada. O sequenciamento foi realizado no *MiSeq* Illumina disponível no NPT do IAM.

7.5.1 Extração e mapeamento das Sequências obtidas pelo Sequenciamento de Nova Geração

A partir de busca no *GenBank*, foram encontradas oito espécies que possuem sequências completas ou parciais disponíveis para o cromossomo 27: *L. infantum* (CP027826.1), *L. mexicana* (FR799580.1), *L. major* (FR796423.1), *L. amazonensis* (AF060493.2), *L. donovani* (CP029526.1), *L. peruviana* (LN609266.1) e *L. panamensis* (CP009396.1), *L. braziliensis* (FR799002.1). Os *primers* desenhados (item 7.1), foram localizados nestas sequências e extraiu-se apenas o produto dos mesmos, ou seja, a região IGS das espécies, as quais foram utilizadas como referência para o mapeamento das bibliotecas advindas do Sequenciamento de Nova Geração.

A extração e mapeamento das sequências obtidas do *MiSeq* Illumina foram realizadas com apoio do Núcleo de Bioinformática do IAM.

Foi utilizado o *software* Bowtie2 (versão 2.2.3) para realizar o mapeamento das sequências obtidas, contra as de referência. Além disso, também foi realizado uma montagem *denovo* com o *software* SPADES (versão 3.9.0) e conseguinte, os resultados gerados foram

submetidos ao BLAST n (versão 2.2.30) para recuperação de *contigs* similares à região IGS rRNA.

7.6 Alinhamento e análise *in silico* das sequências

Com auxílio do *software* Chromas (versão 2.6.6), verificou-se o valor de Phred das sequências obtidas pelo sequenciamento capilar, onde é atribuída a cada base uma chance de a mesma estar incorreta, então, é associado um valor de qualidade a cada uma delas. Foram consideradas as bases com valor de Phred a partir de 30, no qual a probabilidade de estar incorreta é de 1 em 1000 (EWING et al., 1998).

Consequente, as mesmas foram analisadas pelo BLAST n para verificar cobertura e identidade com sequências disponíveis no *GenBank* para a região desejada. Após, com o auxílio do algoritmo MAFFT, através da interface do *software* AliView (versão 1.18.1) foi realizado o alinhamento entre elas, e com as sequências de referência (item 7.4.3).

A partir dos alinhamentos, foi verificado a similaridade e nível de conservação entre as espécies para a região IGS rRNA. Além disso, também foi localizada a região repetitiva IGSRE de cada espécie. Nela, realizou-se uma comparação entre as espécies e subgêneros, em relação ao tamanho e quantidade de repetições.

As sequências obtidas neste trabalho tanto por Sequenciamento capilar quanto por SNG, foram depositadas no banco de dados *GenBank* através da plataforma Bankit/NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank>).

7.7 Desenvolvimento e otimização de sistema de *primers* para identificação de *L. braziliensis*

A partir do alinhamento realizado, foi desenvolvido um sistema de *primers* capazes de identificar isoladamente a espécie *L. braziliensis*. O desenho do sistema foi realizado com auxílio do *software* Primer Express (Applied Biosystems, versão 2.0), seguindo as normas estabelecidas (Quadro 3) no *TaqMan Universal PCR Master Mix protocol* (APPLIED BIOSYSTEMS®, 2010).

Quadro 3 – Diretrizes para desenho de *primers*.

- Tamanho ideal entre 15 e 30 bases
- Manter a composição com percentual de G-C no intervalo entre 20 e 80%
- Os *primers reverse* e *forward* devem possuir T_m similar
- A extremidade 3' deve conter 2 a 3 bases C e/ou G
- Não deve haver o *self-annealing* e/ou formação de *loops*
- Evitar a formação de dímeros

Fonte: Applied Biosystems®. (2010, tradução nossa).

Legenda: G – Guanina; C – Citosina; T_m – Temperatura de *melting*.

Foi efetuado um experimento preliminar com o aparelho QuantStudio™ (AppliedBiosystems®, CA, USA) em condições padrões (recomendadas pelo fabricante). Foi utilizado como padrão, 2 µl de solução de DNA genômico de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), contendo 1 ng, 100 pg e 10 pg e, controle negativo (amostra sem DNA). Todas as amostras foram produzidas em duplicata. A reação foi efetuada com 40 ciclos.

Para determinação do limite de detecção foram efetuadas diluições seriadas (fator 10) de DNA genômico de cepas de referência de *Leishmania* spp. nas concentrações de 1 fg a 1 ng. A sensibilidade (S) dos ensaios foi definida pela amplificação da menor diluição do DNA. A eficiência (ϵ) foi determinada por meio da fórmula: $\epsilon = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$. Para avaliação da especificidade (σ) foi utilizado DNA genômico de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) (Quadro 2), as quais foram cedidas pelos Serviço de Referência em Leishmaniose (SRL) e Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do Laboratório de Imunoparasitologia do IAM/FIOCRUZ-PE. A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma = (1 + \epsilon)^{\Delta C_t}$, onde ϵ significa a eficiência da amplificação e ΔC_t a diferença dos valores dos C_t s das amostras definidas como alvo e das amostras em teste (TOO, 2003).

7.8 Análise dos dados

A análise e registro dos resultados dos experimentos para avaliação do sistema de *primers* para identificação de *L. braziliensis* foram efetuados com o auxílio do QuantStudio™ *Design & Analysis software* (versão 1.4.3).

7.9 Considerações éticas

O projeto não possui implicações éticas com humanos ou animais. Está de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, inscrito no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, sob o número de Cadastro A26B8A0 (ANEXO A).

8 RESULTADOS

Os *primers* desenhados com base nas sequências de *L. major* exibiram o perfil mostrado no Quadro 4, o qual está de acordo com as especificações exigidas para um desenho de *primers* adequado.

Quadro 4 – Características dos *primers* desenhados para amplificação da região IGS rRNA de *Leishmania* spp.

Localização no genoma	Primer	Tamanho	% C/G	T _m
Final da região 28S rRNA de <i>L. major</i>	28S F 5' GAGGCCTGAAATTCATGCTC 3'	21 bases	47,62%	62 °C
Início da região 18S rRNA de <i>L. major</i>	18S R 5' GATCTGGTTGATTCTGCCAG 3'	20 bases	50%	60 °C

Fonte: A autora.

Nota: IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal; % C/G – Porcentagem de Citosina/Guanina; T_m – Temperatura de *melting*; [] – Concentração.

A busca dos oligonucleotídeos no BLAST_n demonstrou a possibilidade de isolar a região IGS rRNA de 5 espécies, nas quais foram encontrados os dois *primers*. Observou-se uma grande variedade na quantidade e tamanho das regiões entre as espécies. A média obtida para o tamanho destas sequências foi de aproximadamente 3 kb (Quadro 5).

Quadro 5 – Resultados da busca pelos *primers* 28SF e 18SR no BLAST_n.

<i>Primers</i> encontrados	Espécie / ID	Quantidade de regiões IGS rRNA encontradas	Tamanho médio das regiões IGS rRNA (kb)
28SF e 18SR	<i>Leishmania donovani</i> / CP022642	2	3,22
	<i>Leishmania peruviana</i> / LN609266	1	1,39
	<i>Leishmania mexicana</i> / FR799580	2	2,03
	<i>Leishmania major</i> / FR796423	6	4,41
	<i>Leishmania amazonensis</i> / AF060493	1	2,5
28SF	<i>Leishmania braziliensis</i> / FR799002	-	-

Fonte: A autora.

Nota: IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal; ID – Código de identificação da sequência no NCBI; kb – Kilobases; F – *Forward*; R – *Reverse*.

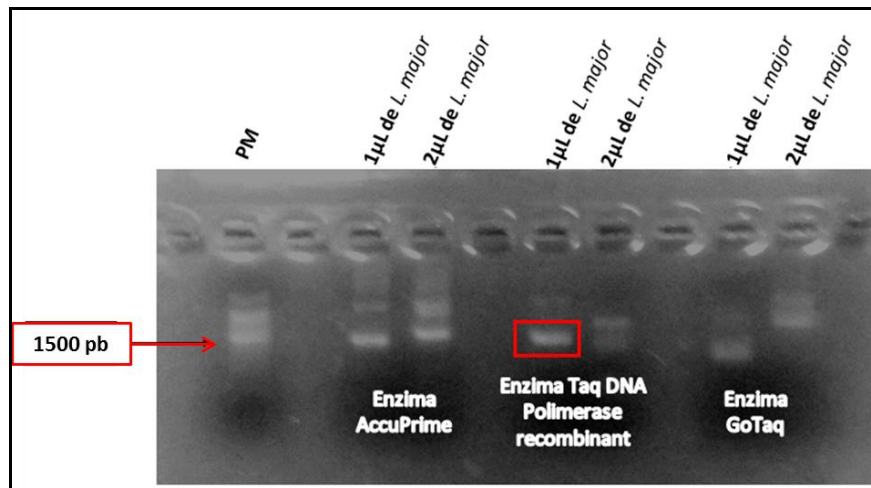
8.1 Teste inicial dos *primers* e otimização da reação de PCR

Após testes de otimização, observou-se um melhor desempenho da reação com a utilização da enzima Taq DNA Polimerase *recombinant* (Invitrogen™) (Figura 6), com ambos os *primers* em concentração de 10 pmol/μL, 10x PCR Buffer, 2 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂, 2 μL de DNA *template* na concentração de 10 ng e água tipo I completando 25 μL de volume final.

As seguintes condições de ciclagem foram estabelecidas: 94°C / 2 minutos (desnaturação inicial), 10 ciclos de 94°C / 30 segundos (desnaturação), 64°C / 30 segundos (hibridização dos *primers*), 68°C / 2 minutos e 30 segundos (extensão do DNA), seguidos de 35 ciclos de 94°C / 30 segundos (desnaturação), 54°C / 30 segundos (hibridização dos *primers*), 72°C / 2 minutos e 30 segundos (extensão do DNA).

Observou-se, após eletroforese em gel, que o DNA de *L. major* possuía cerca de 1500 pb. Tamanho incompatível com o estimado com base nos dados genômicos, pois o produto esperado dos *primers* possuía um tamanho de aproximadamente 3kb.

Figura 6 – Gel de Agarose a 1,0% mostrando resultado da otimização da reação de PCR para amplificação da região IGS rRNA de *Leishmania major*.



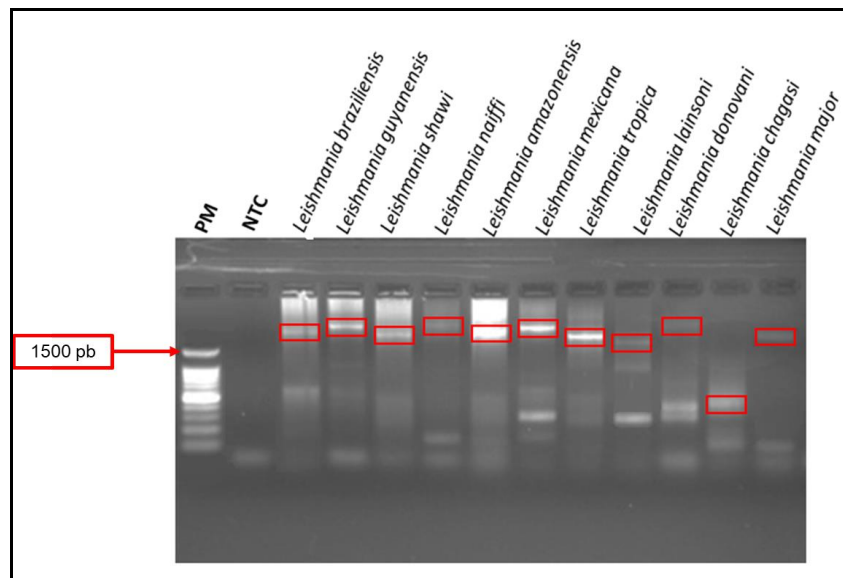
Fonte: A autora.

Legenda: pb – Pares de base; PM – Marcador de peso molecular Ladder de 100pb; *L. major* – *Leishmania major*; IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal. Em destaque, resultado da condição escolhida como ideal para a reação.

8.2 PCR da região IGS rRNA para diferentes espécies de *Leishmania*

As espécies utilizadas para o ensaio apresentaram um diversificado padrão de bandejamento (Figura 7), dos quais a maioria demonstrou pelo menos uma banda de tamanho compatível com o estimado *in silico* (3kb).

Figura 7 – Gel de Agarose a 1,0% mostrando resultado da reação de PCR para amplificação da região IGS rRNA de diferentes *Leishmania* spp.



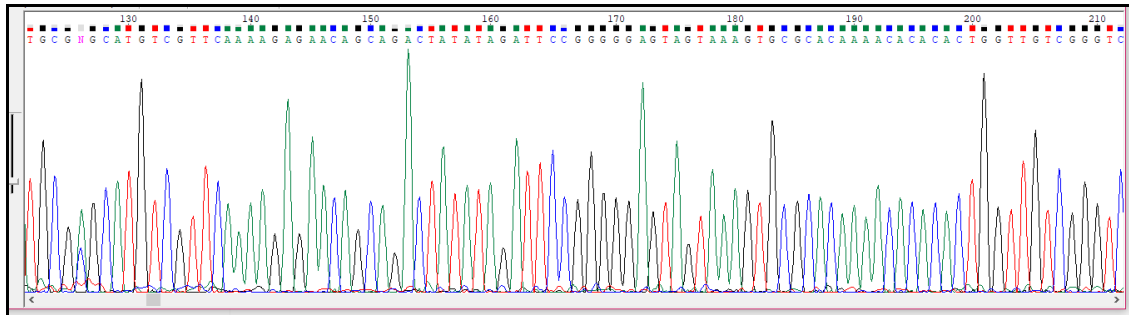
Fonte: A autora.

Legenda: IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal; pb – Pares de base; PM – Marcador de peso molecular Promega de 100pb; NTC – *Non Template Control*. Em destaque bandas extraídas para purificação.

8.3 Sequenciamento capilar da região IGS rRNA

No primeiro sequenciamento capilar obteve-se uma média de 837,3 bases para as espécies sequenciadas pelo *primer* 28SF e 846,4 bases para as espécies sequenciadas pelo *primer* 18SR. Nove das onze espécies apresentaram boa qualidade de sequências (Figura 8) para o *primer reverse* e seis para o *primer forward* (Quadro 6). Foi realizado um alinhamento para todas as espécies sequenciadas pelo *primer* 28SF e pelo 18SR separadamente, pois com os resultados obtidos não foi possível realizar uma sequência consenso, devido ao tamanho da região e limitação de leitura do sequenciamento capilar. Foi visto que espécies apresentaram grande similaridade entre elas por parte de cada *primer*. As sequências a partir do *primer* 18SR obtiveram melhor qualidade, conforme demonstrado na figura 8, onde os valores de Phred estão acima de 30, possibilitando a análise de todas pelo BLASTn (Tabela 2).

Figura 8 – Análise da qualidade de uma sequência de *Leishmania braziliensis* a partir do *primer* 18SR obtida no Sequenciamento Capilar



Fonte: A autora.

Legenda: Cromatograma demonstrando a qualidade do sequenciamento, através do valor de Phred, o qual atribui a cada base uma chance de estar incorreta e associa um valor de qualidade à cada uma delas. A – Adenina (verde), T – Timina (vermelho), C – Citosina (azul), G – guanina (preto).

Quadro 6 – Quantidade de bases sequenciadas por espécie de *Leishmania* após Sequenciamento Capilar

Espécie	Tamanho (bases)	
	28SF	18SR
<i>Leishmania braziliensis</i>	371	934
<i>Leishmania guyanensis</i>	921	524
<i>Leishmania shawi</i>	1026	942
<i>Leishmania naiiffi</i>	1008	1012
<i>Leishmania lainsoni</i>	756	763
<i>Leishmania amazonensis</i>	936	1000
<i>Leishmania mexicana</i>	-	981
<i>Leishmania tropica</i>	-	928
<i>Leishmania donovani</i>	-	541

Fonte: A autora.

Nota: F – Forward; R – Reverse.

Tabela 2 – Análise pelo BLASTn das espécies de *Leishmania* sequenciadas a partir dos *primers* 28S F e 18S R.

Espécie	BLAST da sequência por <i>primer</i>			
	Espécie com maior similaridade	28S F (cob% / id%)	Espécie com maior similaridade	18S R (cob% / id%)
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Leishmania peruviana</i>	100 / 99	<i>L. panamensis</i>	98 / 99
<i>Leishmania guyanensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>	86 / 99	<i>L. panamensis</i>	22 / 99
<i>Leishmania shawi</i>	<i>L. peruviana</i>	99 / 97	<i>L. braziliensis</i>	95 / 87
<i>Leishmania naiiffi</i>	<i>L. peruviana</i>	99 / 96	<i>L. peruviana</i>	99 / 89
<i>Leishmania lainsoni</i>	<i>L. panamensis</i>	98 / 97	<i>L. braziliensis</i>	45 / 74
<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	100 / 97	<i>L. amazonensis</i>	100 / 99
<i>Leishmania mexicana</i>	-	-	<i>L. mexicana</i>	100 / 99
<i>Leishmania tropica</i>	-	-	<i>L. donovani</i>	100 / 96
<i>Leishmania donovani</i>	-	-	<i>L. donovani</i>	63 / 100

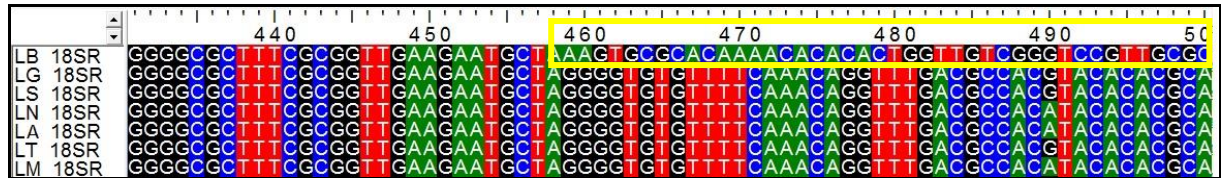
Fonte: A autora.

Nota: F – Forward; R – Reverse; BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool nucleotide; cob% – Porcentagem de cobertura; id% – Porcentagem de identidade.

A partir da base de número 458 do alinhamento de todas as espécies sequenciadas pelo *primer* 18S R, foi visto que a sequência de *L. braziliensis* apresentava-se de forma diferente

das demais (Figura 9), demonstrando uma região promissora à identificação exclusiva desta espécie.

Figura 9 – Alinhamento das espécies de *Leishmania* sequenciadas a partir do *primer* 18S R.



Fonte: A autora.

Nota: R – Reverse; LB – *Leishmania braziliensis*; LG – *Leishmania guyanensis*; LS – *Leishmania shawi*; LN – *Leishmania naiffi*; LA – *Leishmania amazonensis*; LT – *Leishmania tropica*; LM – *Leishmania mexicana*; G – Guanina; C – Citosina; T – Timina; A – Adenina. Em destaque, parte da sequência de *L. braziliensis* que se apresenta diferente das demais espécies.

8.4 Desenho de *primers* para complementação da região IGS rRNA de *Leishmania* spp.

Devido a necessidade de complementação das sequências para obtenção da região IGS de todas as espécies, foram desenhados *primers* com auxílio da ferramenta *primer* BLAST (Quadro 7), ainda tendo como base a sequência de referência de *L. major*. O *primer reverse* está localizado em uma região de alta conservação entre as espécies alinhadas, e o *forward*, no início da sequência de referência. O tamanho do produto é de 3911pb.

Quadro 7 – Sistema de *primers* para complementação da região IGS de *Leishmania* spp.

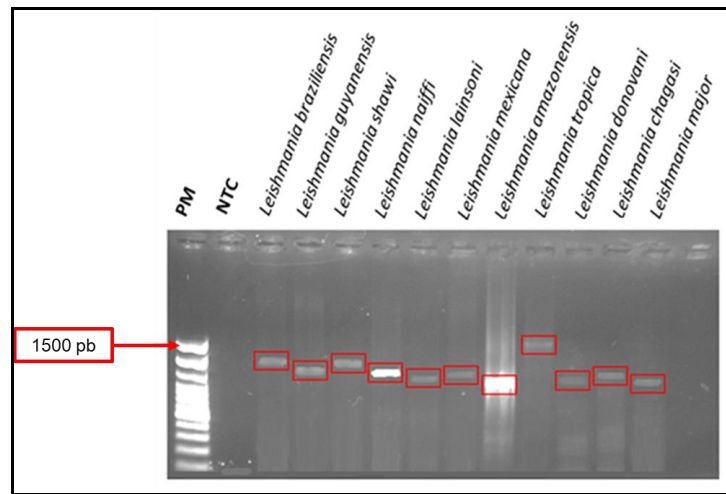
Localização no genoma	Primer	Tamanho	% C/G	T _m
IGS rRNA	IGS1 F 5'GTGTGTCTGTGTGGCGCATA 3'	20 bases	55%	60,95 °C
IGS rRNA	IGS1 R 5' CCGCATCAAAACACCACCTC 3'	20 bases	55%	59,76 °C

Fonte: A autora.

Nota: IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal; F – *Forward*; R – *Reverse*; % C/G – Porcentagem de Citosina/Guanina; T_m – Temperatura de *Melting*.

Os produtos continuaram apresentando diversificado padrão de bandejamento. Com tamanhos variando entre 900 e 1500 pb (Figura 10).

Figura 10 – Gel de Agarose a 1,0% mostrando resultado da reação de PCR para amplificação da região IGS rRNA de diferentes *Leishmania* spp (complementação).



Fonte: A autora.

Legenda: IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal; pb – Pares de base; PM – Marcador de peso molecular Promega de 100pb; NTC – *Non Template Control*. Em destaque bandas extraídas para purificação.

Apenas as espécies *L. donovani*, *L. shawi* e *L. amazonensis* obtiveram boas sequências para análise pelo BLASTn (Tabela 3). Obteve-se uma média de 502 bases para as espécies sequenciadas pelo *primer* IGS1F e 393,3 bases para as espécies sequenciadas pelo *primer* IGS1R (Quadro 8). Entretanto, destas, apenas a espécie *L. amazonensis* obteve a quantidade correta aproximada para a região IGS rRNA, com um total de 2071 bases sequenciadas.

Quadro 8 – Quantidade de bases sequenciadas por espécie de *Leishmania* após Sequenciamento Capilar para complementação.

Espécie	Tamanho (bases)	
	IGS1F	IGS1R
<i>Leishmania shawi</i>	443	447
<i>Leishmania amazonensis</i>	780	452
<i>Leishmania donovani</i>	283	281

Fonte: A autora.

Nota: F – *Forward*; R – *Reverse*.

Tabela 3 – Análise pelo BLASTn das espécies de *Leishmania* sequenciadas a partir dos *primers* IGS1F e IGS1R.

Espécie	BLAST da sequência por <i>primer</i>			
	Espécie com maior similaridade	IGS1F (cob% / id%)	Espécie com maior similaridade	IGS1R (cob% / id%)
<i>Leishmania shawi</i>	<i>L. peruviana</i>	97 / 97	<i>L. braziliensis</i>	97 / 96
<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	100 / 97	<i>L. amazonensis</i>	100 / 99
<i>Leishmania donovani</i>	<i>L. donovani</i>	86 / 65	<i>L. donovani</i>	24 / 74

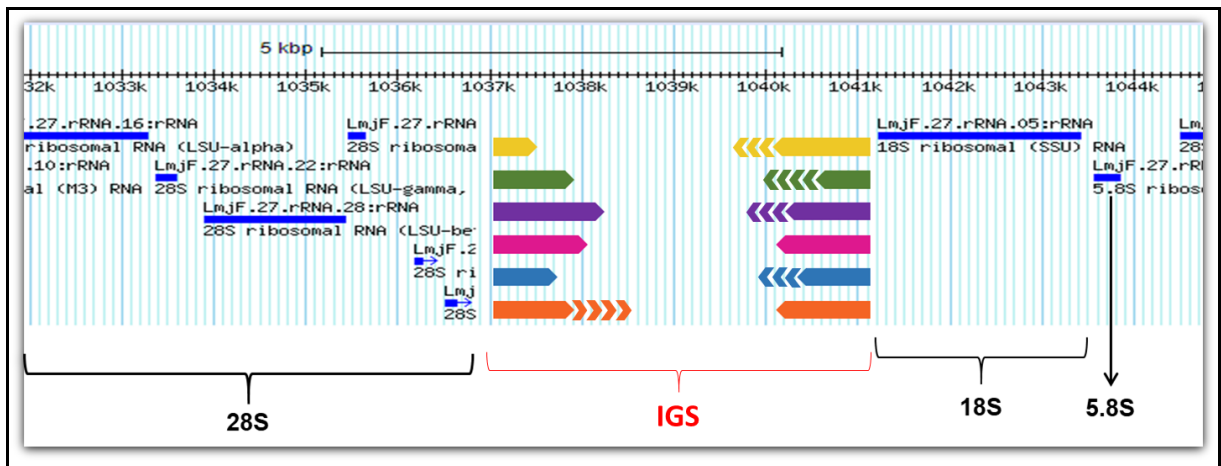
Fonte: A autora.

Nota: F – *Forward*; R – *Reverse*; BLASTn – *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*; cob% – Porcentagem de cobertura; id% – Porcentagem de identidade.

8.5 Análise das sequências obtidas no SNG

Foi visualizado após extração e mapeamento das sequências obtidas no SNG, tamanhos variados entre as espécies (Quadro 9), entretanto também não foi possível o completo sequenciamento da região IGS rRNA (Figura 11). E, após o alinhamento, verificou-se alta conservação entre as espécies para a região sequenciada (Figura 12), demonstrando que a região até então obtida, não poderia ser um alvo aplicável à distinção das espécies em estudo.

Figura 11 – Representação gráfica do tamanho das sequências de espécies causadoras da LTA obtidas após Sequenciamento Capilar e SNG.



Fonte: A autora.

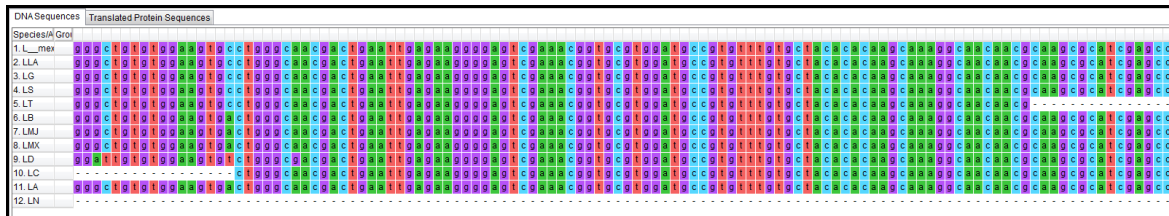
Legenda: Tamanho final das sequências obtidas após Sequenciamento Capilar e SNG, com base em uma das sequências de *Leishmania major* de referência para a região IGS rRNA. As linhas totalmente preenchidas representam o tamanho obtido após o primeiro sequenciamento Capilar e as linhas pontilhadas representam o tamanho da sequência após o sequenciamento Capilar para complementação e SNG. Vermelho escuro – Sequências de referência; Amarelo – *Leishmania braziliensis*; Verde – *Leishmania guyanensis*; Roxo – *Leishmania shawi*; Lilás – *Leishmania naiffi*; Azul – *Leishmania lainsoni*; Laranja – *Leishmania amazonensis*. LTA – Leishmaniose tegumentar Americana; SNG – Sequenciamento de Nova Geração; IGS – Intergenic Spacer; rRNA – RNA ribossomal.

Quadro 9 – Quantidade de bases sequenciadas por espécie de *Leishmania* após SNG

Espécie	Tamanho (bases)
<i>Leishmania braziliensis</i>	1234
<i>Leishmania guyanensis</i>	1027
<i>Leishmania shawi</i>	1163
<i>Leishmania naiffi</i>	732
<i>Leishmania lainsoni</i>	1082
<i>Leishmania amazonensis</i>	887
<i>Leishmania mexicana</i>	1396
<i>Leishmania tropica</i>	1071
<i>Leishmania major</i>	1396
<i>Leishmania donovani</i>	1238
<i>Leishmania chagasi</i>	1317

Fonte: A autora.

Nota: SNG – Sequenciamento de Nova Geração

Figura 12 – Parte do alinhamento das sequências de *Leishmania* spp. obtidas no SNG

Fonte: A autora.

Nota: As 11 espécies de *Leishmania* sequenciadas foram alinhadas tendo como referência a sequência de *Leishmania mexicana*, onde verificou-se alta conservação desta região entre as espécies. SNG – Sequenciamento de Nova Geração; 1. L_mex – *L. mexicana*; 2. LLA – *Leishmania lainsoni*; 3. LG – *Leishmania guyanensis*; 4. LS – *Leishmania shawi*; 5. LT – *Leishmania tropica*; 6. LB – *Leishmania braziliensis*; 7. LMJ – *Leishmania major*; 8. LMX – *L. mexicana*; 9. LD – *Leishmania donovani*; 10. LC – *Leishmania chagasi*; 11. LA – *Leishmania amazonensis*; 12. LN – *Leishmania naiffi*.

8.6 Análise *in silico* da região IGSRE

Foi possível encontrar a região repetida IGSRE, nas sequências obtidas após sequenciamento capilar e SNG das espécies *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. amazonensis*. Também foi possível encontrar essa região para as espécies *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana* analisando as sequências do cromossomo 27 completo. Foi visto que a IGSRE das espécies *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. peruviana* são iguais, assim como *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Também foi observado a variação na quantidade de repetições em diferentes regiões IGS rRNA de uma mesma espécie (Quadro 10).

Quadro 10 – Tamanho e frequência da região IGSRE de diferentes *Leishmania* spp.

Espécie	IGSRE	Tamanho (pb)	Quantidade de repetições em cada região IGS rRNA					
			1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª
LD	TTTTCGCTGCGAGGGAGACCCTCGCGGGAGCATTGCTTCGCGCCCCAGTACTGGAACATTCCCG	64	23	20	-	-	-	-
LB	CTGTGGCGGCCCCCTTGTATATGTTGTTTCAGAAGCACATCCGTCGATTCTTTTGTCTCCTTTCCGATGCC	71	6	14	39	60	-	-
LMJ	CCCCAGTAGTCGAGCATTGCGTTTCGCCACGAGGGAGGCTCTTGCAGGAGCGTTGTGTGCGCG	63	8	12	15	37	28	10
LMX	CCCAGTACTTGGACATTCCCTTTTCGTCACGCGCAGGGCCGTCGGAGGCGCACTGGTTTTCGCT	62	34	30	-	-	-	-
LP	GAAGCACCACACTGCACAGCTGCGCATCGCCACCAAGACGGGTCAAAAGCAGCGGAACGCA	61	265	-	-	-	-	-
LS	GAAGCACCACACTGCACAGCTGCGCATAGCCGCCAAGACGGGTCAAAAGCAGCGGAACGCA*	61	-	-	-	-	-	-
LN	GAAGCACCACACTGCACAGCTGCGCATAGCCGCCAGGACGGATCAAAAGCAGCGGAACGCA*	61	-	-	-	-	-	-
LA	CCCAGTACTTGGACATTCCCTTTTCGCCACGCGCAGGGCCGCTGGAGGCGCACTCCTTTCGCT	62	7	-	-	-	-	-

Fonte: A autora.

Nota: Em azul encontra-se demonstrado o número de repetições da região IGS rRNA inseridas no Cromossomo 27. Em amarelo, destaca-se a quantidade de repetições da região IGSRE para cada região IGS rRNA, por espécie de *Leishmania*. Legenda: IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal; LD – *Leishmania donovani*; LB – *Leishmania braziliensis*; LMJ – *Leishmania major*; LMX – *Leishmania mexicana*; LP – *Leishmania peruviana*; LS – *Leishmania shawi*; LN – *Leishmania naiffi*; LA – *Leishmania amazonensis*; pb – Pares de base. *Sequências inéditas.

8.7 Depósito das sequências no *GenBank*

As sequências obtidas neste trabalho, foram depositadas no banco de dados *GenBank* sob o número de acesso MK493617 e MK493618 (*L. amazonensis*), MK493607 e MK493608 (*L. braziliensis*), MK493615 e MK493616 (*L. lainsoni*), MK493613 e MK493614 (*L. guyanensis*), MK493609 e MK493610 (*L. shawi*), MK493620 (*L. tropica*), MK493619 (*L. mexicana*), MK493621 (*L. donovani*) e, MK493611 e MK493612 (*L. naiffi*).

8.8 Desenho de *primers* específicos para *L. braziliensis*

Com base na sequência de *L. braziliensis* descrita no item 8.4, foi desenhado um sistema de *primers* específico para esta espécie, a ser aplicado em qPCR *Sybr Green*. O qual demonstra as características apresentadas no Quadro 11.

Quadro 11 – Sistema de *primers* específico para *Leishmania braziliensis* tendo como alvo a região IGS rRNA.

Localização no genoma	Primer	Tamanho	% C/G	T _m
IGS rRNA	LB/IGS F 5' CGCACAAAACACACACTGGT 3'	20 bases	50%	59,8 °C
IGS rRNA	LB/IGS R 5' TTCATGCTCAGGGACACACTC 3'	21 bases	52%	60 °C

Fonte: A autora.

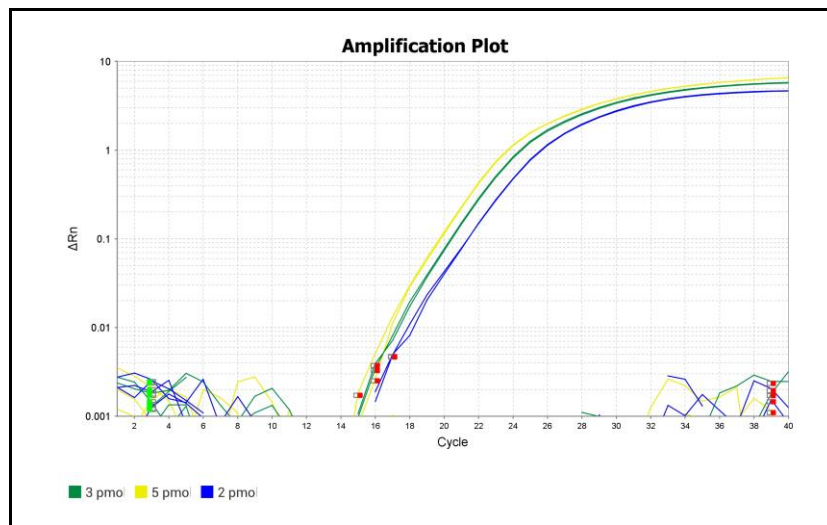
Nota: IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal; LB – *Leishmania braziliensis*; F – *Forward*; R – *Reverse*; % C/G – Porcentagem de Citosina/Guanina; T_m – Temperatura de *Melting*.

O produto de 148 pb dos *primers* LB/IGS F e R foi submetido ao BLASTn e demonstrou total cobertura e 100%, 99% e 90% de identidade para *L. braziliensis*, *L. peruviana* e *L. panamensis*, respectivamente.

8.9 Sistema específico para amplificação de *L. braziliensis* com alvo na região IGS rRNA

Após o teste de 3 concentrações distintas para o sistema de *primers* desenhado, verificou-se que com 5 pmol/μL a amplificação é mais precoce, sendo então essa, a concentração escolhida (Figura 13).

Figura 13 – Teste de concentração do sistema LB/IGS demonstrado na curva de amplificação.



Fonte: A autora.

Legenda: Amplificação de DNA genômico de *Leishmania braziliensis* (LB) tendo como alvo a região *Intergenic Spacer* do RNA ribossomal (IGS rRNA) em três diferentes concentrações de *primers*. Em amarelo: amplificação de 1ng de DNA genômico de *L. braziliensis*, *primers* na concentração de 5 pmol/μL. Em verde: amplificação de 1ng de DNA genômico de *L. braziliensis*, *primers* na concentração de 3 pmol/μL. Em azul: amplificação de 1ng de DNA genômico de *L. braziliensis*, *primers* na concentração de 2 pmol/μL.

8.9.1 Teste de Limite de detecção, eficiência e especificidade

O sistema desenhado pode amplificar o DNA de *L. braziliensis* com até 10fg, o equivalente à cerca de 0,13 parasitas, e a eficiência da reação foi de 99,735% (Figura 14). Houve reação cruzada com outras espécies apenas do subgênero *Viannia* (Figura 15), sendo então, aplicado o cálculo da especificidade (TOO, 2003), o qual demonstrou que o sistema é cerca de 10^3 , 10^4 e 10^5 vezes mais específico para *L. braziliensis* do que para *L. naiffi*, *L. guyanensis* e *L. shawi* respectivamente (Quadro 12).

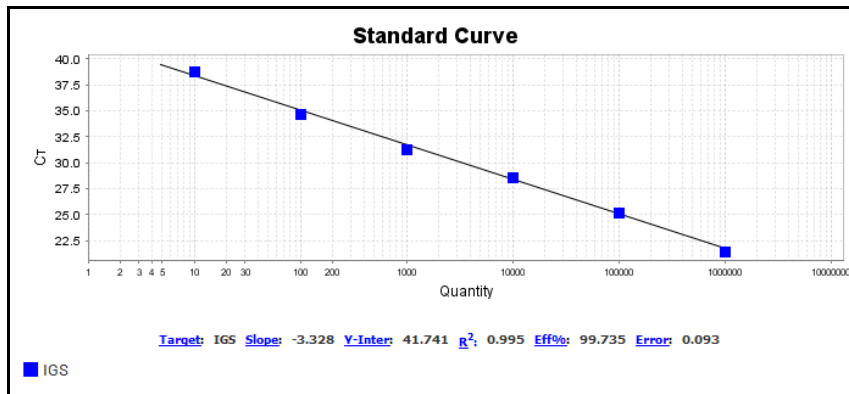
Quadro 12 – Análise logarítmica da probabilidade de reação cruzada para o sistema LB/IGS.

Espécie	σ	Log σ^*
<i>Leishmania naiffi</i>	827,4	10^3
<i>Leishmania guyanensis</i>	9.532,7	10^4
<i>Leishmania shawi</i>	67.858,4	10^5

Fonte: A autora.

Nota: IGS – *Intergenic Spacer*; σ - Resultado do cálculo da especificidade, *valor aproximado.

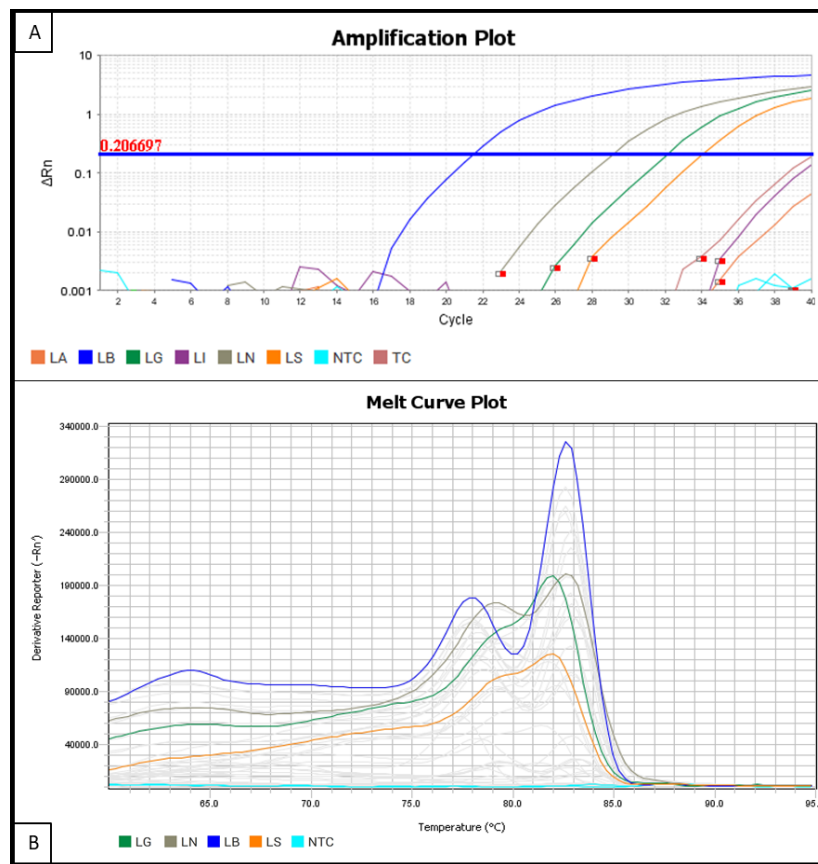
Figura 14 – Eficiência da reação com o sistema LB/IGS demonstrado em curva padrão.



Fonte: A autora.

Legenda: Curva padrão da reação de amplificação de *Leishmania braziliensis* (LB) em seis pontos, demonstrando um limite de detecção de até 10fg para esta espécie. No eixo das ordenadas encontra-se o ciclo *threshold* ou ponto de corte (Ct) e no eixo das abscissas está a concentração do DNA em fentogramas. IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal.

Figura 15 – Curvas de amplificação e *Melting* demonstrando reação cruzada entre espécies do Subgênero *Viannia* para o sistema LB/IGS.



Fonte: A autora.

Legenda: Intensidade da emissão de fluorescência pela temperatura de *Melting* para cada espécie. A - Curva de amplificação; B - Curva de *Melting*- Intensidade da emissão de fluorescência vs. temperatura de *Melting* para cada espécie. Amplificação de 1 ng DNA genômico de *Leishmania braziliensis* (LB) (em azul); amplificação de 10 ng DNA genômico de *Leishmania naiffi* (LN) (em cinza); amplificação de 10 ng DNA genômico de *Leishmania guyanensis* (LG) (em verde); amplificação de 10 ng DNA genômico de *Leishmania shawis* (LS) (em laranja); resultados negativos para a amplificação de *Leishmania infantum* (LI - em roxo), *Leishmania amazonensis* (LA - em laranja escuro) e *Trypanosoma cruzi* (TC - em rosa); *Non Template Control* (NTC - em azul claro) - Controle negativo da reação. IGS – *Intergenic Spacer*; rRNA – RNA ribossomal.

9 DISCUSSÃO

Há um grande consenso, em relação à necessidade de distinção entre as espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem. Isto se dá, devido à forte influência que as diferentes espécies possuem na manifestação clínica desenvolvida nos indivíduos. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos eficazes e da descoberta de biomarcadores adequados, capazes de detectar e caracterizar espécies para um direcionamento terapêutico espécie-específico, sendo este, um aspecto vital para melhorar os programas de controle relativos à infecção por *Leishmania* sp. (BLUM et al., 2012; MEDLEY et al., 2015).

Diante disso, o presente estudo propôs-se a analisar a região IGS rRNA de diferentes *Leishmania* spp. e verificar seu potencial como biomarcador para caracterização de espécies deste parasita, através de ferramentas da biologia molecular.

Uma maior compreensão obtida nos dias atuais, sobre o genoma de *Leishmania* sp., gerou grandes avanços, os quais foram traduzidos em novas formas de diagnóstico. Diversos alvos moleculares já foram estudados na busca do que fosse capaz de individualizar as espécies de *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2017; VAN DER AUWERA; DUJARDINA, 2015). A dificuldade na distinção dos protozoários deste gênero e a variação de resultados entre as metodologias propostas, reside na inconstância nos padrões de acordo com os marcadores utilizados, possibilidade de infecção mista, e a similaridade entre as espécies, principalmente as pertencentes ao subgênero *Viannia* (CRUZ et al., 2013; ROELFSEMA et al., 2011).

Os derivados do RNA ribossomal (rRNA) estão dentre os alvos moleculares mais analisados para detecção de *Leishmania* sp., onde destaca-se a *Small Subunit* (SSU rRNA) devido ao seu alto grau de conservação (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013). Já para a distinção de espécies, o *Internal Transcribed Spacer* (ITS) está em evidência e já se mostrou capaz de identificar as espécies *Leishmania aethiopica*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania turanica* e os complexos de *L. mexicana*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* (EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; GRAÇA et al., 2012; MAURICIO et al., 2004; ODIWUOR et al., 2011; SCHÖNIAN et al., 2001, 2003).

A região *Intergenic Spacer* do rRNA (IGS rRNA) demonstrou sequências adequadas à diferenciação entre as espécies de bactérias *Bacillus grandii* e *Bacillus atticus*, as quais são intimamente relacionadas (RICCI; SCALI; PASSAMONTI, 2008), além dos tripanossomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma congolense*. (DIETRICH et al., 1993;

DOWNEY; DONELSON, 1999; MARTÍNEZ-CALVILLO; HERNÁNDEZ, 1994). Porém, não há relatos de estudos para essa região com o objetivo de diagnóstico ou caracterização de espécies de *Leishmania* (AKHOUNDI et al., 2017), além de haver uma escassez de estudos analisando-a, sendo a mesma caracterizada apenas para as espécies *L. major* (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2001), *L. amazonensis* (ABREU-BLANCO et al., 2010), *L. tarentolae* e *L. hoogstraali* (BRIONES et al., 1992; ORLANDO et al., 2002), não havendo então, estudos para as espécies do subgênero *Viannia*.

No presente trabalho foram desenhados sistemas de *primers*, flanqueando a região IGS rRNA para amplificação total desta sequência. O tamanho da região IGS rRNA foi diferente entre as cinco espécies as quais foi possível delimitar essa região com os *primers* 28SF e 18SR, variando de 2-4 kpb, o que diverge com dados da literatura, os quais mostram que o tamanho mínimo para essa região é cerca de 4 kpb (ORLANDO et al., 2002). As regiões repetitivas IGSRE encontradas no presente estudo possuem mesmo tamanho e sequência das publicadas anteriormente para as espécies *L. major*, *L. donovani* e *L. amazonensis* (ABREU-BLANCO et al., 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2001). Além disso, destacamos a presença do IGSRE em sequências de outras cinco espécies. Com uma variação total 6-265 no número de cópias; até o momento essa variação encontrava-se entre 16 a 275 repetições (ABREU-BLANCO et al., 2010).

O sequenciamento completo de vários genomas de *Leishmania* sp. abriu uma nova era no diagnóstico e identificação de espécies causadoras das leishmanioses. Nove espécies possuem seu genoma completo publicado, porém, destas apenas duas são do Subgênero *Viannia* (COUGHLAN et al., 2017; DOWNING et al., 2011; IVENS et al., 2005; LLANES et al., 2015; PEACOCK et al., 2007; RAYMOND et al., 2012; REAL et al., 2013; ROGERS et al., 2011). No presente estudo foi sequenciada parte da região IGS rRNA de onze diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo quatro espécies do Subgênero *Viannia* e, entre as sete pertencentes ao Subgênero *Leishmania*, uma espécie incluída na análise não possui sequência publicada para esta região.

O sequenciamento utilizando uma plataforma de alto rendimento, possibilita uma análise mais abrangente por gerar uma grande quantidade de dados em uma única execução (SÁ, 2017). Entretanto, em alguns casos o uso do sequenciamento Sanger tradicional, por gerar leituras mais longas, pode ser mais adequado para análises de regiões repetitivas (LLANES et al., 2015), podendo este, ter sido o motivo da dificuldade no mapeamento das sequências obtidas no Sequenciamento de Nova Geração.

Atualmente, não existe um método único para o diagnóstico de todas as espécies de *Leishmania* patogênicas, nem para uso em campo em regiões endêmicas (AKHOUNDI et al., 2017). Técnicas derivadas do sequenciamento, como a *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e da PCR, como a PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR), vêm como uma alternativa à *Multilocus Enzyme Electrophoresis* padrão-ouro na caracterização de *Leishmania* spp., que por possuir algumas limitações, não pode ser amplamente difundida (VAN DER AUWERA; DUJARDINA, 2015).

Foi visto uma alta conservação da região IGS rRNA, demonstrando que a mesma não poderia ser um alvo aplicado à caracterização. Todavia, foi possível a distinção da espécie *L. braziliensis*, sendo esta a etiologia com maior distribuição no Brasil e nas Américas (LAINSON; SHAW, 2010). As infecções por *L. braziliensis* correspondem a lesões com escassez de parasitas. Nesse cenário, a qPCR pode ser útil para confirmação do diagnóstico, além de também avaliar a carga parasitária, trazendo benefícios uma vez que infecções por essa espécie podem evoluir para a forma mucocutânea, a qual necessita de manejo clínico e terapêutico diferenciado (PEREIRA et al., 2017).

O sistema de *primers* LB/IGS desenvolvido, apresentou bom desempenho nos testes de otimização e exibiu uma alta sensibilidade para a detecção da espécie *L. braziliensis* em ensaios com eficiência de 99,735%. Estando estes resultados em vantagem com relação aos obtidos em estudos como o de Jara (2013) (87,5%) e Pereira (2017) (96,66%). A reação cruzada obtida apenas para as espécies do Subgênero *Viannia* evidencia a alta similaridade genética que possuem, porém, visto que as concentrações detectadas para as espécies que não eram o alvo do sistema foram mais altas que a detectada para *L. braziliensis*, foi possível diferenciá-las através do cálculo de especificidade.

Por fim, a disponibilização das sequências em banco de dados genômicos, como o *GenBank*, viabiliza uma ampla visualização das informações geradas no presente trabalho, e possibilita que sejam gerados novos estudos sobre esta região pouco explorada, tendo em vista um melhor entendimento do genoma das espécies causadoras da LTA e suas peculiaridades.

10 CONCLUSÃO

As sequências adquiridas para a região IGS rRNA, juntamente com as disponíveis em bancos de dados genômicos, foram analisadas quanto à sua conservação e tamanho, além de semelhanças e diferenças entre as regiões IGSRE de cada uma. Estas sequências inéditas também foram depositadas em bancos de dados para múltiplas análises de pesquisadores no mundo.

Apesar da alta conservação para esta região, a sequência de *L. braziliensis* se apresentou de forma distinta e tornou-se alvo de um sistema de *primers* para identificação exclusiva desta espécie. E, através do protocolo baseado em PCR quantitativa em Tempo Real otimizado, o sistema pode ser utilizado para diagnóstico, identificação e quantificação, auxiliando no direcionamento para uma conduta terapêutica mais apropriada aos casos de infecção por este parasita.

REFERÊNCIAS

- ABREU-BLANCO, M. T. et al. Analysis of ribosomal RNA transcription termination and 3' end processing in *Leishmania amazonensis*. **Gene**, Amsterdam, v. 451, n. 1–2, p. 15–22, 2010.
- ADAMS, E. R. et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. **Parasitology**, London, v. 141, n. 14, p. 1891-1897, 2014.
- AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, New York, v. 57, p. 1–29, 2017.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, London, v. 11, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://www.hsj.gr/medicine/leishmaniasis-a-review-on-parasite-vector-and-reservoir-host.php?aid=20131>>. Acesso em 23 de abr. 2019.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>>. Acesso em 23 de abr. 2019.
- ALVAR, J.; JIMÉNEZ, C.; MORENO, J. **Leishmaniasis El duro camino de una enfermedad de la pobreza**. 1. ed. Spain: Instituto de Salud Carlos III, 2017.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **TaqMan Universal PCR Master Mix Amplifying custom target sequences for quantification**, California, 2010.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, n.1, p 457-462, 2010.
- BLUM, J. et al. Local or systemic treatment for New World cutaneous leishmaniasis? Re-evaluating the evidence for the risk of mucosal leishmaniasis. **International Health**, London, v. 4, n. 3, p. 153–163, 2012.
- BOAVENTURA, V. S. et al. Short report: Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 75, n. 2, p. 267–269, 2006.
- BOITÉ, M. C. et al. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania (Viannia)* Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 11, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001888>>. Acesso em 23 de abr. 2019.
- BRAGA, R. R. et al. *Leishmania (Viannia) utingensis* n. sp., a parasite from the sandfly

Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata in Amazonian Brazil. **Parasite**, Paris, v. 10, n. 2, p. 111–118, 2003.

BRASIL. Secretaria de vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BRIONES, M. R. S. et al. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 53, n. 1–2, p. 121–127, 1992.

BRITO, M. E. F. et al. Review Article / Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil : a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 425–429, 2012.

CANTACESSI, C. et al. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 100–108, 2015.

COUGHLAN, S. et al. The genome of *Leishmania adleri* from a mammalian host highlights chromosome fission in *Sauroleishmania*. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 3, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep43747>>. Acesso em 23 de abr. 2019.

CRUZ, I. et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 134, n. 3, p. 281–289, 2013.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 3, p. 296–311, 1994.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DIETRICH, P. et al. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 103–107, 1993.

DOWNEY, N.; DONELSON, J. E. Search for promoters for the GARP and rRNA genes of *Trypanosoma congolense*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 25–38, 1999.

DOWNING, T. et al. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, New York, v. 21, n. 12, p. 2143–2156, 2011.

EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. **Genetics**, Austin, v. 175, n. 2, p. 477–485, 2007.

EL-BESHBISHY, H. A.; AL-ALI, K. H.; EL-BADRY, A. A. Molecular characterization of

cutaneous leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, western Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 17, n. 5, p. 334–338, 2013.

ELDER, J. F.; TURNER, B. J. Evolution of repetitive in Eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 70, n. 3, p. 297–320, 1995.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.

ESCOBAR, M. A. et al. American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis (Tegumentary): A Diagnostic Challenge. **Tropical Doctor**, London, v. 22, n. 1, p. 69–78, 1992.

EWING, B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, London, v. 8, n. 1, p. 175–185, 1998.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 2, 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, n.1, p. 229–237, 2013.

GAY, L. S.; WILSON, M. E.; DONELSON, J. E. The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 193–200, 1996.

GOMES, C. M. et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 2, p. 526–534, 2017.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Medicina Tropical**, Madrid, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 5, p. 664–674, 2012.

GRIMALDI, G.; DI NOCERA, P. P. Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 85, n. 15, p. 5502–5506, 1988.

HABER, J. E. Exploring the pathways of homologous recombination. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 4, n. 3, p. 401–412, 1992.

IVENS, C. A.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A. et al. The Genome of the Kinetoplastid parasite *Leishmania major*. **Science**, Washington, v. 309, n. 1, p. 436–442, 2005.

JARA, M. *et al.* Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1826–1833, 2013.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 19, n. 10, p. 1443–1474, 2012.

KUHLS, K. *et al.* Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (*Viannia*). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 10, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002490>>. Acesso em 23 abr. 2019.

LABHART, P.; REEDER, R. H. Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of *Xenopus laevis*. **Cell**, Cambridge, v. 37, n. 1, p. 285–289, 1984.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: _____ **The leishmaniasis in biology and medicine**. 1. ed. London: Academic Press Inc., 1987. p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, London, 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470688618.taw0182>>. Acesso em 23 de abr. 2019.

LLANES, A. *et al.* The genome of *Leishmania panamensis*: Insights into genomics of the *L.* (*Viannia*) subgenus. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep08550>>. Acesso em 23 de abr. 2019.

LUKEŠ, J.; HASHIMI, H.; ZÍKOVÁ, A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. **Current Genetics**, New York, v. 48, n. 5, p. 277–299, 2005.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, n. 6, p. 859–876, 1986.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 147–157, 2001.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. **Gene**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 243–247, 1994.

MEDLEY, G. F. *et al.* Health-seeking behaviour, diagnostics and transmission dynamics in the control of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **Nature**, London, v. 528, n. 7580, p. 102–108, 2015.

MONROY-OSTRIA, A. et al. ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *Leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Cairo, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ipid/2014/607287>>. Acesso em 23 de abr. 2019.

MONTALVO, A. M. et al. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 31, n. 7, p. 1453–1461, 2012.

MORAIS, R. C. S. et al. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. **Experimental Parasitology**, New York, v. 165, n. 6, p. 43-50, 2016.

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. **Acta Tropica**, Basel, n. 4, p. 1–12, 2017.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR Em Tempo Real. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 33, n. 2, p. 10–13, 2004.

NOYES, H. Implications of a Neotropical Origin of the Genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, p. 657–661, 1998.

ODIWUOR, S. et al. *Leishmania* AFLP: Paving the way towards improved molecular assays and markers of diversity. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 960–967, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of the leishmaniases**, Geneva, 2010. World Health Organization technical report series. n. 949, p. 22–26.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Leishmaniose nas Américas: recomendações para o tratamento**. Brasília, 2013.

ORLANDO, T. C. et al. Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: Molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 695–701, 2002.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C.; GOMES, Y. 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**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 537–542, 2010.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**,

London, v. 27, n. 3–4, p. 122–128, 2013.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PEREIRA, L. DE O. R. et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 57, n. 1, p. 132–137, 2017.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. Evaluation of urine for *Leishmania infantum* DNA detection by real-time quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 34–41, 2016.

RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, London, v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2012.

REAL, F. et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**, Tokyo, v. 20, n. 6, p. 567–581, 2013.

REEDER, R. H. Regulatory elements of the generic ribosomal gene. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 1, n. 3, p. 466–474, 1989.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 203–211, 2007.

RICCI, A.; SCALI, V.; PASSAMONTI, M. The IGS-ETS in *Bacillus* (Insecta Phasmida): molecular characterization and the relevance of sex in ribosomal DNA evolution. **BMC evolutionary biology**, London, v. 8, n. 3, p. 278, 2008.

ROELFSEMA, J. H. et al. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. **Experimental Parasitology**, New York, v. 127, n. 1, p. 36–41, 2011.

ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, London, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 2011.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, London, v. 265, n. 5596, p. 687–695, 1977.

SCHNARE, M. N. et al. The 28S-18S rDNA intergenic spacer from *Crithidia fasciculata*: repeated sequences, length heterogeneity, putative processing sites and potential interactions between U3 small nucleolar RNA and the ribosomal RNA precursor. **Nucleic acids research**, London, v. 28, n. 18, p. 3452–3461, 2000.

SCHÖNIAN, G. et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by

different PCR-based methods. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 2, p. 217–224, 2001.

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, n. 1, p. 349–358, 2003.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 10, p. 466–469, 2010.

SOLLNER-WEBB, B.; MOUGEY, E. B. News from the nucleolus: rRNA gene expression. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 16, n. 4, p. 58–62, 1991.

STAUCH, A. et al. Model-Based Investigations of Different Vector-Related Intervention Strategies to Eliminate Visceral Leishmaniasis on the Indian Subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002810>>. Acesso em 23 abr. 2019.

THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in genetics: TIG**, Cambridge, v. 30, n. 9, p. 418–426, 2014.

TOO, H. Real time PCR quantification of GFR α -2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 114, n.1, p. 146–153, 2003.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, London, v. 6, n. 5, 2017. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/6-750/v1>>. Acesso em 23 de abr. 2019.

TORRES-MACHORRO, A. L. et al. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: Witnesses of phylogeny? **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 59–86, 2010.

TRAJANO-SILVA, L. A. M. et al. Standardization and evaluation of a duplex real-time quantitative PCR for the detection of *Leishmania infantum* DNA: A sample quality control approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, n. 3, p. 350-357, 2017.

ULIANA, S. R. et al. Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 76, n. 1–2, p. 245–255, 1996.

VALENCIA, B. M. et al. Non-Invasive Cytology Brush PCR for the Diagnosis and Causative Species Identification of American Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 11, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049738>>. Acesso em 23 de abr. 2019.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDINA, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, n. 2, p. 265–294, 2015.

VICTOIR, K. et al. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, n. 1, p. 80–87, 2003.

VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, Auckland, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

WORTMANN, G. et al. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 999–1004, 2005.

YAN, S. et al. Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 197–210, 1999.

YANIK, M. *et al.* The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical Experimental Dermatology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 464–467, 2004.

ANEXO A – CADASTRO NO CISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A26B8A0

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A26B8A0**
 Usuário: **Fiocruz**
 CPF/CNPJ: **33.781.055/0001-35**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Leishmania spp

Leishmania sp

Título da Atividade: **Inovações para o controle de patógenos**

Equipe

MILENA DE PAIVA CAVALCANTI

Fiocruz

Data do Cadastro: **18/05/2018 10:43:24**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:54 de 25/07/2018.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**