

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *Leishmania (Viannia)*  
*braziliensis* PROVENIENTES DE HOSPEDEIROS HUMANOS, CÃES  
DOMÉSTICOS E PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES E SINANTRÓPICOS DE  
MINAS GERAIS, BRASIL.**

Por

Gabriela Ribeiro Ássimos

Belo Horizonte

Fevereiro/2020

Gabriela Ribeiro Ássimos

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *Leishmania (Viannia)*  
*braziliensis* PROVENIENTES DE HOSPEDEIROS HUMANOS, CÃES  
DOMÉSTICOS E PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES E SINANTRÓPICOS DE  
MINAS GERAIS, BRASIL.**

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

Orientador: Dr. Gustavo Fontes Paz.

Coorientador: Dr. Gabriel da Rocha  
Fernandes.

Belo Horizonte

Fevereiro/2020

Catálogo na fonte  
Rede de Bibliotecas Fiocruz  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

A75c  
2020

Ássimos, Gabriela Ribeiro.

Caracterização genética de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* provenientes de hospedeiros humanos, cães domésticos e pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos de Minas Gerais, Brasil / Gabriela Ribeiro Ássimos – Belo Horizonte, 2020.

XVIII, 117 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 104-117.

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

1. Leishmaniose Tegumentar Difusa 2. Variabilidade genética 3. Técnicas de genotipagem I. Título. II. Paz, Gustavo Fontes (Orientação). III. Fernandes, Gabriel da Rocha (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Gabriela Ribeiro Ássimos

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE CEPAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* PROVENIENTES DE HOSPEDEIROS HUMANOS, CÃES DOMÉSTICOS E PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES E SINANTRÓPICOS DE MINAS GERAIS, BRASIL.**

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

Orientador: Dr. Gustavo Fontes Paz.

Coorientador: Dr. Gabriel da Rocha Fernandes.

**Banca examinadora:**

Dr. Gustavo Fontes Paz (IRR/FIOCRUZ) – Presidente.

Dr. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira (ICB/UFMG) – Titular.

Dr. Gregório Guilherme Almeida (IRR/FIOCRUZ) – Titular.

Dr. Gustavo Mayr de Lima Carvalho (IRR/FIOCRUZ) – Suplente.

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 28/02/2020.**

*“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar, a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Façamos da interrupção um caminho novo. Da queda, um passo de dança. Do medo, uma escada. Do sonho, uma ponte. Da procura, um encontro.”*

*Fernando Sabino.*

*Dedico este trabalho as meus pais, fonte de toda inspiração, e ao meu  
companheiro, pelo amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Beatriz Ribeiro e Sérgio Ássimos, e minha vó Ivan, por todo carinho, incentivo, apoio, orações e, acima de tudo, compreensão pelos meus momentos de ausência. Vocês são meus alicerces!

Ao meu namorado-esposo, Guilherme Peixoto, pela compreensão diária, pelo conforto, carinho e incentivo nos meus momentos de dificuldade, pela paciência quando eu não a tive e, acima de tudo, pelo amor incondicional! Meus sonhos somente se tornaram possíveis graças a você!

Ao meu orientador, Dr. Gustavo Fontes Paz, por confiar em mim como sua aluna durante toda minha trajetória no René Rachou, bem como por sua dedicação, paciência, ensinamentos e por sua postura humana e gentil ao lidar com as minhas dificuldades.

Ao Dr. Gabriel da Rocha Fernandes pela coorientação imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho e, principalmente, pela paciência em compartilhar seu conhecimento.

À Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo, por me receber carinhosamente no laboratório, pela paciência e ensinamentos. Será sempre minha fonte de inspiração!

À Letícia Estevam pela amizade, companhia, conselhos e todo apoio que me concedeu durante minha jornada na iniciação científica e no mestrado. Sua luz tornou meus dias no laboratório melhores! Tenho grande admiração pela pessoa incrível que é!

À Júlia Bahia e Ana Cristina (Tina), por todo suporte e ensinamento, sempre com muito carinho, sendo essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Vocês são especiais!

À Dra. Patrícia Quaresma, pelos ensinamentos, apoio no desenvolvimento dos protocolos e pelo sempre agradável convívio.

Aos queridos amigos do Grupo de Estudos em Leishmanioses, sou grata por ter oportunidade de conviver com pessoas incríveis!

À Larissa Manini, minha primeira orientação. Sou muito grata pela sua dedicação e colaboração!

À minha irmã Bárbara, que mesmo distante, sempre me apoiou e incentivou, contribuindo para que eu alcançasse meus objetivos. Você é meu exemplo!

A todos os meus amigos (principalmente à Thailine e Cinthya) que sempre foram pacientes com a minha ausência, dando-me toda a força e alegria necessárias nos momentos mais difíceis.

A todos os meus familiares que sempre me deram incondicionais incentivos e pelos momentos de descontração e carinho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou (IRR-FIOCRUZ MINAS) por todo suporte e pela oportunidade de realizar este estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do qual fui bolsista de mestrado.

A todos os pesquisadores que disponibilizaram as amostras para a realização deste estudo.

À Plataforma de Sequenciamento de DNA do IRR, pelo apoio imprescindível para desenvolvimento deste estudo.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta conquista fosse possível, auxiliando ou me apoiando durante o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é uma complexa doença parasitária zoonótica que afeta uma ampla diversidade de hospedeiros. No Brasil, o principal agente etiológico que acomete o ser humano é *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Análises que visam caracterizar geneticamente cepas de *L. braziliensis* são fundamentais para a compreensão da dinâmica entre os diferentes hospedeiros, a origem geográfica e a epidemiologia molecular do parasito. O presente estudo teve por objetivo realizar a caracterização molecular de 28 amostras de *L. braziliensis* obtidos de diferentes hospedeiros (humanos, cães domésticos e pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos), provenientes de diferentes municípios do estado de Minas Gerais, Brasil. Para alcançar o objetivo proposto, foi realizada a análise de variabilidade genética através de sequenciamento e confecção de filogramas dos marcadores: ITS1, *hsp70*, *alat*, *g6pd*, *icd*, *mpi* e *pgm*. A identificação específica de todas as amostras como *L. braziliensis* foi realizada através técnica de PCR-RFLP-ITS1 e *hsp70* seguido de sequenciamento genético onde as amostras apresentaram um percentual de identidade superior a 98% comparadas com outras cepas disponíveis no GenBank. Uma amostra apresentou perfil de restrição igual a *L. guyanensis* na PCR-RFLP-ITS1, porém o sequenciamento foi compatível com *L. braziliensis* para todas as amostras, demonstrando não ser um marcador adequado para identificação do parasito por RFLP. Além disso, o sequenciamento do gene ITS1 não apresentou qualidade suficiente para realizar as demais análises. As amostras 34 e 38 proveniente da Reserva Indígena do Xakriabá apresentaram perfil de restrição variante na PCR-RFLP-*hsp70*, o que corrobora com estudos prévios. Na análise dos filogramas, estas amostras foram agrupadas separadamente para todos os genes estudados. Todas as amostras estudadas apresentaram diferentes níveis de variações genéticas para os marcadores utilizados neste estudo. Contudo, *hsp70* e *icd* apresentaram altos valores de posições com nucleotídeos divergentes quando comparados com a referência de *L. braziliensis*, sendo pouco significativos para estudos de variabilidade genética. Observou-se nos diferentes filogramas o agrupamento de amostras provenientes de pequenos mamíferos (PM) juntamente com amostras de cães domésticos e humanos, demonstrando que cepas que circulam em PM podem estar mais adaptadas para circular em diferentes hospedeiros. Os filogramas obtidos para os genes *pgm* e *mpi* apresentaram isolamento das amostras de PM silvestres oriundos da Reserva Caraça, o mesmo foi observado para as mostras oriundas do Xakriabá (34, 38 e 71), suportando a hipótese de que ocorram populações de *L. braziliensis* diferentes de acordo com ambientes específicos em Minas Gerais. Nos filogramas para os genes *alat* e *g6pd*, as amostras de cães formaram *clusters*, separados das demais amostras, sugerindo que cepas específicas podem estar circulando nestes hospedeiros. Resumidamente, podemos concluir que o sequenciamento genético dos alvos moleculares *alat*, *g6pd*, *mpi* e *pgm* foram úteis para estudos de variabilidade genética e epidemiologia molecular, permitindo uma melhor compreensão sobre história evolutiva destes genes bem como a identificação da ampla diversidade genética de parasitos de *L. braziliensis* que circulam entre os diferentes hospedeiros nas regiões de Minas Gerais.

**Palavras-chave:** Leishmaniose tegumentar. Variabilidade genética. Técnicas de genotipagem.

## ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis is a complex zoonotic parasitic disease affecting a wide range of hosts. In Brazil, the main etiological agent that affects humans is *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Analyzes aimed at genetically characterizing strains of *L. braziliensis* are essential for understanding the dynamics between the different hosts, the geographical origin and the molecular epidemiology of the parasite. This study aimed to perform the molecular characterization of 28 samples of *L. braziliensis* obtained from different hosts (humans, domestic dogs and small wild and synanthropic mammals), from different municipalities in the state of Minas Gerais, Brazil. To achieve the proposed objective, an analysis of genetic variability was carried out by sequencing and making filograms of the markers: ITS1, *hsp70*, *alat*, *g6pd*, *icd*, *mpi* and *pgm*. The specific identification of all samples as *L. braziliensis* was performed using the PCR-RFLP-ITS1 and *hsp70* technique followed by genetic sequencing where the samples showed an identity percentage higher than 98% compared to other strains available on GenBank. One sample presented a restriction profile equal to *L. guyanensis* in PCR-RFLP-ITS1, however the sequencing was compatible with *L. braziliensis* for all samples, demonstrating that it is not an adequate marker for identification of the parasite by RFLP. In addition, the sequencing of the ITS1 gene was not of sufficient quality to perform the other analyzes. Samples 34 and 38 from the Xakriabá Indigenous Reserve presented a variant restriction profile in PCR-RFLP-*hsp70*, which corroborates with previous studies. In the analysis of the filograms, these samples were grouped separately for all the studied genes. All samples studied showed different levels of genetic variation for the markers used in this study. However, *hsp70* and *icd* showed high position values with divergent nucleotides when compared to the reference of *L. braziliensis*, being of little significance for studies of genetic variability. It was observed in the different filograms the grouping of samples from small mammals (PM) together with samples from domestic dogs and humans, demonstrating that strains that circulate in PM may be more adapted to circulate different hosts. The filograms obtained for the *pgm* and *mpi* genes showed isolation of samples of wild PM from the Caraça Reserve, the same was observed for samples from Xakriabá (34, 38 and 71), supporting the hypothesis that populations of *L. braziliensis* occur different according to specific environments in Minas Gerais. In the filograms for the *alat* and *g6pd* genes, dog samples formed clusters, separate from the other samples, suggesting that specific strains may be circulating in these hosts. In summary, we can conclude that the genetic sequencing of the molecular targets *alat*, *g6pd*, *mpi* and *pgm* were useful for studies of genetic variability and molecular epidemiology, allowing a better understanding of the evolutionary history of these genes as well as the identification of the wide genetic diversity of *L. braziliensis* that circulate between the different hosts in the regions of Minas Gerais.

**Keywords:** *Cutaneous leishmaniasis. Genetic variability. Genotyping techniques*

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Relação da identificação da amostra, tipo de amostra utilizada, hospedeiros e Município de origem.....	48
<b>Quadro 2</b> – Cepas de referência da OMS utilizadas no estudo.....	49
<b>Quadro 3</b> – Relação das espécies de pequenos mamíferos e sua localidade.....	49
<b>Quadro 4</b> – Relação da quantidade amostras, hospedeiros ao qual foi coletada e Município de origem.....	50
<b>Quadro 5</b> – Lista de iniciadores (marcadores genéticos) usados para amplificação de genes através de PCR convencional. ....	52
<b>Quadro 6</b> – Descrição dos ciclos utilizados na PCR convencional para os iniciadores ITS1 e <i>hsp70</i> . ....	53
<b>Quadro 7</b> – Descrição dos reagentes utilizados no protocolo da PCR convencional para os iniciadores <i>alat</i> , <i>pgm</i> , <i>icd</i> , <i>mpi</i> e <i>g6pd</i> .....	55
<b>Quadro 8</b> – Descrição dos ciclos utilizados na PCR convencional para os iniciadores voltados para os genes codificadores das enzimas <i>alat</i> , <i>pgm</i> , <i>icd</i> , <i>mpi</i> e <i>g6pd</i> .....	55
<b>Quadro 9</b> – Demonstração representativa das amostras analisadas quanto aos parâmetros utilizados no presente estudo.....	58

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Organização do <i>locus</i> do rDNA de tripanozomatídeos demonstrando a subunidades conservadas (SSU) e a subunidade variável (ITS1).....	37
<b>Figura 2</b> – Árvore filogenética enraizada.....	41
<b>Figura 3</b> – Mapa representativo da localização das Mesorregiões do estado de Minas Gerais, Brasil.....	45
<b>Figura 4</b> – Mapa do estado de Minas Gerais indicando a localização dos municípios onde as amostras foram coletadas.....	47
<b>Figura 5</b> – Fotografia representativa do gel de agarose a 3% do fragmento do gene ITS1 após digestão enzimática.....	59
<b>Figura 6</b> – Imagens representativas do eletroferograma de fragmentos amplificados do gene ITS1.....	60
<b>Figura 7</b> – Fotografia representativa do gel de agarose a 3% do fragmento do gene <i>hsp70</i> após digestão enzimática. ....	61
<b>Figura 8</b> – Alinhamento múltiplo representativo das sequências do gene <i>hsp70</i> das amostras estudadas.....	62
<b>Figura 9</b> – Árvore filogenética (filograma) enraizada utilizando sequências obtidas do gene <i>hsp70</i> , em conjunto com sequências de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> como referência, recuperadas do banco de dados GenBank.....	64
<b>Figura 10</b> – Fotografia do gel de agarose a 1% do fragmento do gene <i>alat</i> .....	65
<b>Figura 11</b> – Alinhamento múltiplo representativo das sequências do gene <i>alat</i> das amostras.....	66
<b>Figura 12</b> – Árvore filogenética (filograma) enraizada utilizando sequências obtidas do gene <i>alat</i> , em conjunto de sequências de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> como referência recuperadas do banco de dados GenBank.....	68
<b>Figura 13</b> – Fotografia representativas do gel de agarose a 1 % das amostras amplificadas para o gene <i>g6pd</i> .....	69

<b>Figura 14</b> – Imagem representativa do alinhamento múltiplo do fragmento amplificado do gene <i>g6pd</i> .....	70
<b>Figura 15</b> – Árvore filogenética (filograma) enraizada utilizando sequências obtidas do gene <i>g6pd</i> , em conjunto de sequências de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> como referência recuperadas do banco de dados GenBank.....	72
<b>Figura 16</b> – Fotografia do gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados do gene <i>icd</i> .....	73
<b>Figura 17</b> – Fotografia do gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados do gene <i>icd</i> .....	73
<b>Figura 18</b> – Imagem representativa do alinhamento múltiplo do fragmento amplificado do gene <i>icd</i> .....	74
<b>Figura 19</b> – Árvore filogenética (filograma) enraizada utilizando sequências obtidas do gene <i>icd</i> , em conjunto de sequências de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> como referência recuperadas do banco de dados GenBank.....	76
<b>Figura 20</b> – Imagem representativa das fotografias obtidas do gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados para o alvo <i>mpi</i> . ....	77
<b>Figura 21</b> – Imagem representativa do alinhamento múltiplo das sequencias obtidas para o fragmento do gene <i>mpi</i> . ....	78
<b>Figura 22</b> – Filograma obtido das sequências da amplificação do gene <i>mpi</i> .....	80
<b>Figura 23</b> – Resultado representativo da PCR- <i>pgm</i> a partir de amostras estudadas. ....	81
<b>Figura 24</b> – Alinhamento representativo das sequências do gene <i>pgm</i> para as amostras estudadas obtidas no software UGene.....	82
<b>Figura 25</b> – Filograma obtido das sequências da amplificação do alvo <i>pgm</i> .....	85

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** - Notificações Confirmadas de LTA em Minas Gerais de 2013 a 2017.....22

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Principais espécies de *Leishmania* que acometem o homem, suas manifestações clínicas e distribuição geográfica nas Américas\* .....9
- Tabela 2** - Quantidade de posições com nucleotídeos variantes e ambíguos por amostra estudada, através da análise do alinhamento múltiplo do gene *hsp70*.....63
- Tabela 3** – Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas quanto ao gene *alat*.....67
- Tabela 4** – Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas na análise do alinhamento múltiplo do fragmento do gene *g6pd*.....71
- Tabela 5** – Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades por amostra estudada no sequenciamento do alvo *icd*.....76
- Tabela 6** - Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas e amplificadas para o alvo *mpi*.....80
- Tabela 7** - Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas e amplificadas para o alvo *pgm*. .....83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**°C:** graus Celsius

**μL:** microlitro

**μg:** microgramas

**AIDS:** “*Acquired Immunodeficiency Syndrome*” - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**Alat:** Alanina aminotransferase

**Amb.:** ambiguidade

**C:** cão

**CDC:** “*Centers for Disease Control and Prevention*” - Centros de Controle e Prevenção de Doenças

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais

**CN:** Controle Negativo

**CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**CONEP:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

**CP:** Controle positivo

**D:** didelfídeo

**DATASUS:** Departamento de Informática do SUS

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**DNTP:** “*deoxyribonucleotide triphosphate*” - Deoxinucleotídeos tri fosfatados

**EDTA:** “*Ethylenediaminetetraacetic acid*” - Ácido etilendiaminotetraacético

**F:** “*Forward*” – senso

**FUNAI:** Fundação Nacional do Índio

**g:** grama(s)

**g6pd:** glicose-6-fosfato-desidrogenase

**H:** humano

**HIV:** “*Human Immunodeficiency Virus*” - Vírus da Imunodeficiência Humana

**hsp70:** proteína de choque térmico de 70 kilodáltons

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**icd:** Isocitrato dehydrogenase

**ID:** identificação

**IRR:** Instituto René Rachou

**ITS:** “*Internal Transcribed Spacer*” - Espaçadores transcritos internos

**km:** quilometro

**La:** *Leishmania amazonensis*

**Lb:** *Leishmania braziliensis*

**Li:** *Leishmania infantum*

**Lg:** *Leishmania guyanensis*

**LT:** Leishmaniose Tegumentar

**LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana

**LV:** Leishmaniose Visceral

**Lu:** Lutzomyia

**mg:** miligramas

**MG:** Minas Gerais

**min:** minuto(s)

**mL:** mililitro

**MLEE:** “*Multilocus Enzyme Electrophoresis*” - Eletroforese de Isoenzimas Multilocus

**MLST:** “*Multilocus Sequencing Typing*” - Tipificação por Sequências de Multilocus

**MLMT:** “*Multilocus microsatellite typing*” - Tipagem de Microsatélites Multilocus

**mM:** milimolar

**mpi:** Isomerase manose fosfato

**mRNA:** RNA mensageiro

**MS:** Ministério da Saúde

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P

**NC:** nível de confiança

**ng:** nanogramas

**ng/μl:** nanogramas por microlitro

**nm:** nanomoles

**NNN:** Neal, Novy, Nicolle

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**pb:** pares de bases

**PCR:** “*Polymerase Chain Reaction*” - Reação em Cadeia da Polimerase

**PGM:** Fosfoglicomutase

**pm:** peso molecular

**PM:** pequenos mamíferos

**pmol:** picomolar

**R:** roedor

**R:** “Reverse” – reverso ou anti-senso

**RFLP:** Polimorfismo de Tamanho no Fragmento de Restrição

**RMBH:** Região Metropolitana de Belo Horizonte.

**RPPNSC:** Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça

**rpm:** rotações por minuto

**SE:** Sudeste

**seg:** segundos

**SNP:** polimorfismo de nucleotídeo simples ou único

**SUS:** Sistema Único de Saúde

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**V.:** *Viannia*

**VOL.:** volume

**WHO:** *World Health Organization*

**X:** quantidade de vezes.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	22
1.1.1	LTA em Minas Gerais.....	23
1.1.2	Etiologia.....	24
1.1.3	Transmissão e ciclo biológico.....	26
1.1.4	Hospedeiros mamíferos .....	27
1.1.5	Tratamento .....	29
1.2	Aspectos moleculares e diversidade genética do gênero <i>Leishmania</i> .....	30
1.3	Genoma e reprodução .....	30
1.4	Relação da diversidade genética com os ciclos de transmissão (vetores e reservatórios).....	33
1.5	Epidemiologia molecular e ferramentas moleculares aplicadas na caracterização das Leishmanioses.....	35
1.5.1	Marcadores e/ou alvos moleculares para caracterização genética ....	37
1.5.2	Estudos filogenéticos do gênero <i>Leishmania</i> .....	41
2	JUSTIFICATIVAS .....	44
3	OBJETIVOS.....	46
3.1	Objetivo Geral .....	46
3.2	Objetivos Específicos .....	46
4	MATERIAL E METODOS .....	47
4.1	Locais do estudo .....	47
4.2	Seleção das amostras de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .....	48
4.3	Origem das amostras .....	49
4.4	Considerações éticas .....	52
4.5	Análises moleculares .....	53
4.5.1	PCR ITS1 e HSP70.....	55
4.5.2	Gel de Agarose dos produtos amplificados por PCR .....	55

4.5.3	RFLP hsp70 e ITS1 .....	56
4.5.4	PCR direcionada aos alvos <i>alat</i> , <i>pgm</i> , <i>icd</i> , <i>mpi</i> e <i>g6pd</i> .....	56
4.6	Sequenciamento .....	57
4.7	Análise das sequências.....	58
4.8	Construção e análise dos filogramas .....	59
5	RESULTADOS .....	60
5.1	Avaliação da qualidade e identificação específica das amostras estudadas	60
5.1.1	PCR-RFLP ITS1 .....	61
5.1.2	PCR-RFLP-hsp70.....	62
5.2	Análise do gene <i>hsp70</i> .....	63
5.2.1	Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene <i>hsp70</i> ....	64
5.3	Análises do gene <i>alat</i> .....	67
5.3.1	PCR-Alat .....	67
5.3.2	Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene <i>alat</i> .....	67
5.4	Análises do gene <i>g6pd</i> .....	70
5.4.1	PCR-G6pd.....	70
5.4.2	Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene <i>g6pd</i> .....	71
5.5	Análises do gene <i>icd</i> .....	74
5.5.1	PCR-Icd.....	74
5.5.2	Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene <i>icd</i> .....	76
5.6	Análises do gene <i>mpi</i> .....	79
5.6.1	PCR-Mpi.....	79
5.6.2	Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene <i>Mpi</i> .....	79
5.7	Análises do gene <i>pgm</i> .....	82
5.7.1	PCR-Pgm .....	82
5.7.2	Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene <i>pgm</i> .....	83

5.8	Variabilidade genética e ambiguidades apresentadas nas amostras estudadas .....	86
6	DISCUSSÃO.....	88
6.1	Recuperação das amostras.....	88
6.2	Identificação das amostras como <i>L. braziliensis</i> .....	88
6.3	Caracterização molecular e diversidade genética .....	91
6.4	Análise dos filogramas das amostras de <i>L. braziliensis</i> de Minas Gerais ....	96
7	CONCLUSÕES.....	103
8	REFERÊNCIAS .....	104

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias transmitidas por vetores, não contagiosas, caracterizadas por gravidade variada e de alta complexidade quanto à epidemiologia, diagnóstico, tratamento e controle. Os agentes etiológicos das leishmanioses são parasitos da família Trypanosomatidae pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que ocasionam um complexo de doenças que apresentam caráter crônico e afetam diversos mamíferos silvestres, domésticos, e o ser humano. Atualmente 53 espécies de *Leishmania* foram reconhecidas, das quais 20 são consideradas infecciosas para humanos (AKHOUNDI et al, 2016b; ASHFORD, 2000; LAINSON & SHAW 1973;)

A classificação clássica das espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* era feita considerando a morfologia, a patogenia e a distribuição geográfica (LAINSON & SHAW 1973; LAINSON & SHAW 1987). Na classificação atual, os parasitos são divididos em quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia*, nestes dos primeiros subgêneros estão inclusas as espécies de importância médica, sendo classificados de acordo com os estágios de desenvolvimento no inseto vetor e com base em marcadores moleculares filogenéticos (BOITÉ et al. 2012, ESPINOSA et al, 2016; SHAW et al. 1991).

As leishmanioses podem ser divididas de acordo com duas apresentações clínicas principais: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT; ou cutânea – LC) (ASHFORD, 2000; LAINSON & SHAW 1987; WHO, 2010). Essa classificação se baseia no tropismo que as espécies de *Leishmania* têm pelo tegumento, enquanto outras possuem por vísceras. Apesar dessa classificação simples, estudos tem demonstrado a ocorrência de um amplo espectro de manifestações clínicas, determinado por diversos fatores, principalmente considerando a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e a resposta imune do hospedeiro (CDC, 2019; QUARESMA et al 2011; WHO, 2019;). Deste modo a identificação da espécie de *Leishmania* no diagnóstico da infecção é crucial para estabelecendo correto do diagnóstico e prognóstico, bem como apoiar tomada de decisões sobre o tratamento adequado e controle epidemiológico do parasito (TSOKANA et al., 2014). Na **Tabela 1** observa-se a classificação e a nomenclatura das principais espécies de *Leishmania* que acometem o homem e que estão

presentes nas Américas (Novo Mundo), considerando a distribuição geográfica e no tipo de lesões que causam ao ser humano.

**Tabela 1** – Principais espécies de *Leishmania* que acometem o homem, suas manifestações clínicas e distribuição geográfica nas Américas\*. Fonte: dados segundo Marzochi, Schubach & Marzochi

<b>Agente Etiológico</b>	<b>Apresentação clínica principal no homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Cutâneas e mucosas	América Central e do Sul até o norte da Argentina
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	Predominantemente cutâneas	Altos vales andinos e encosta ocidental dos Andes
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Predominantemente cutâneas	Noroeste e Norte da América do Sul até o rio Amazonas
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	Predominantemente cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>Leishmania (Viannia) colombiensis</i>	Cutâneas e mucosas	Colômbia Panamá e Venezuela
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	Cutâneas eventualmente mucosas difusas	México e América Central
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	América Central, Norte, Nordeste, Centro Oeste <sup>2</sup> ; Sudeste <sup>3</sup> e Sul do Brasil.
<i>Leishmania (Leishmania) pifanoi</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	Venezuela
<i>Leishmania (Leishmania) venezuelensis</i>	Cutâneas	Venezuela
<i>Leishmania (Leishmania) garnhami</i>	Predominantemente cutâneas	Andes Venezuelanos
<i>Leishmania (Leishmania) infantum (L. chagasi)</i>	Lesões viscerais (calazar)	Sul do México ao Norte da Argentina, Brasil.

(1999) e Lainson (2010).

As leishmanioses ocorrem em 98 países, de clima subtropical ou tropical, em ciclos antroponóticos e zoonóticos e são estimados de 20.000 a 40.000 mortes por ano, sendo, dentre as doenças parasitárias, a segunda em número de óbitos, superada apenas pela malária (ALVAR et al., 2012; DESJEUX, 2004; WHO, 2019). Estima-se que por volta de 350 milhões de pessoas em todo o mundo estejam sob o risco de infectar-se, com um número de pessoas afetadas pela doença cerca de 12 milhões (WHO, 2019). Além disso, estão entre as seis doenças mais negligenciadas do mundo, pois ocorrem principalmente em países em desenvolvimento, afetando a população socioeconomicamente mais vulnerável, contribuindo para o

estabelecimento e manutenção de desigualdades sociais (CATTAND et al., 2006; CDC, 2019; WHO, 2010; LAINSON & SHAW 1987). Contudo, a prevalência das leishmanioses pode estar subestimada, pois a doença pode apresentar formas clínicas semelhantes a outras patologias que dificultam o diagnóstico ou mesmo ser assintomática, o que dificulta a compreensão real do número de indivíduos infectados (WHO, 2019).

Das formas clínicas das leishmanioses, a LT é mais amplamente distribuída, com cerca de um terço dos casos ocorrendo nas regiões tropicais das Américas, sendo denominada de Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA, onde o Brasil é o país com as maiores incidências estimadas de LTA, principalmente nas duas últimas décadas, apresentando expansão geográfica alarmante (ALVAR et al., 2012; RANGEL et al., 2003).

### 1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma zoonose que pode ser causada por várias espécies de *Leishmania*. Além disso, possui uma alta diversidade de vetores (flebotomíneos) e hospedeiros ou reservatórios (mamíferos de várias ordens) envolvidos em seus ciclos de transmissão, aumentando a complexidade da sua epidemiologia e propiciando a ocorrência de variações nas apresentações clínicas (WHO, 2010).

A LTA é uma doença que remota ao século I d.C. (LAINSON, 1988). Contudo, a primeira identificação de formas de *Leishmania* no Brasil ocorreu em 1909, quase simultaneamente, por Lindenberg e Carini & Paranhos ao estudarem indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo e que apresentavam úlceras cutâneas e naso-buco-faríngeas denominadas de “úlceras de Bauru” (VALE & FURTADO, 2005).

Desde então foi considerada doença primariamente de ambientes silvestre e rural e, portanto, de característica predominantemente ocupacional. Contudo, a LTA tem passado por mudanças epidemiológicas relacionadas ao seu processo de urbanização. As modificações na epidemiologia do parasito e a aproximação do ambiente silvestre com o urbano favoreceram o aumento no número de indivíduos afetados e a disseminação da LTA para diversos municípios (BRASIL, 2017).

Portanto, atualmente a ocorrência de LTA não mais se restringe a pessoas que entram em contato com o ambiente silvestre (SHIMABUKURO et al., 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), são três as apresentações principais da doença: cutânea, crônica disseminada e mucocutânea. Entretanto, casos humanos vêm ocorrendo com diferentes formas clínicas, incluindo apresentações atípicas. Quaresma e colaboradores (2011) demonstraram que populações de parasitos causadores de LTA presentes no Xakriabá (Minas Gerais, Brasil) podem induzir lesões atípicas, o que dificulta o diagnóstico do paciente e consequentemente contribui com a subnotificação da doença.

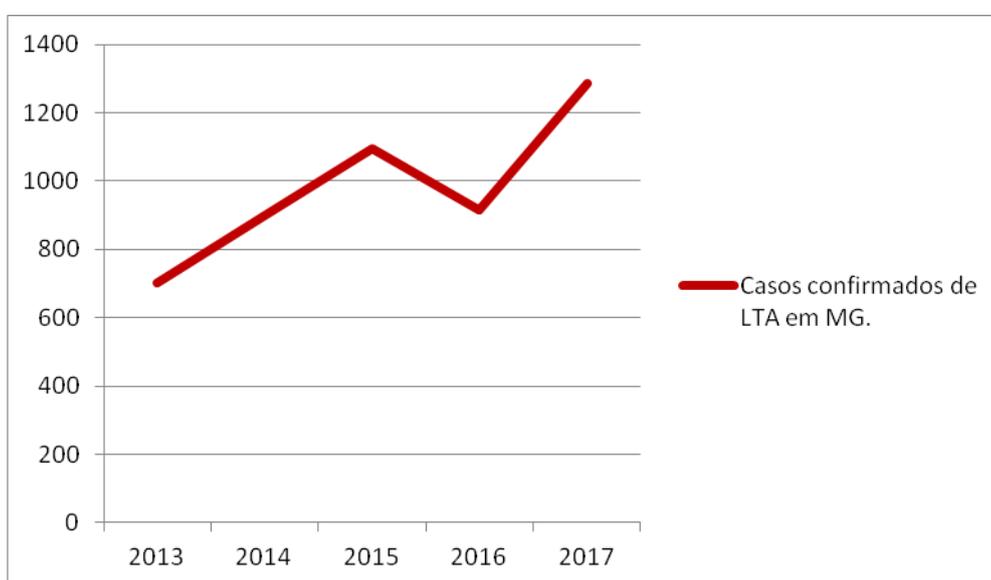
A LTA possui grande diversidade de agentes etiológicos, bem como diferentes espécies de vetores e reservatórios e, consequentemente, padrões epidemiológicos de transmissão distintos. Deste modo, a epidemiologia está sujeita às condições específicas de cada foco. A presença de várias espécies causadoras de LTA em algumas regiões endêmicas associado ao fato de cada espécie apresenta um perfil epidemiológico específico e diferentes formas de resposta ao tratamento torna a LTA ainda mais complexa, tanto do ponto de vista ecológico, genético e filogenético (BUIRAGO et al., 2011). Portanto, a caracterização e o estudo da evolução gênica destes parasitos constitui uma etapa fundamental para a compreensão da epidemiologia e correta adequação de medidas de controle.

### *1.1.1 LTA em Minas Gerais*

No período de 1995 a 2014, verificou-se uma média anual de 25.763 casos novos registrados de LTA no Brasil (BRASIL, 2017). No estado de Minas Gerais (MG), Brasil, considerado o estado de maior extensão geográfica da região sudeste do Brasil, foram relatados anualmente, em média, 10,5 novos casos de LTA por 100.000 habitantes, durante o período 1990-2006 (MIRANDA et al., 2011). MG também se destaca com maior registro da doença entre os estados da região Sudeste (SE), com um percentual geral de 72% dos casos para o período de 2017 (**gráfico 1**) (DATASUS, 2019). Na região metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), capital de MG, casos autóctones de LTA são registrados por instituições oficiais de saúde desde 1987, e somente no ano de 2017, foram registrados 27 casos confirmados de LTA (PASSOS et al., 1993; DATASUS, 2019).

O aumento significativo de casos de LTA pode estar relacionando com a melhoria nos métodos de diagnóstico, aumento no conhecimento dos profissionais a cerca da doença e consequentemente aumento de notificação de casos confirmados. Todavia, também constituem como fatores importantes para crescente número de casos de LTA o aumento da exploração de áreas silvestres, controle inadequado dos vetores e reservatórios, do aumento de LTA associada coinfeccções por doenças oportunistas tal como o HIV/AIDS e o aumento de resistência dos parasitos às drogas anti-*Leishmania* (REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

**GRÁFICO 1** - Notificações Confirmadas de LTA em Minas Gerais de 2013 a 2017.



Fonte: Construído pelo próprio autor a partir de dados do DATASUS/Sinan, 2019.

No entanto, muitos estudos em MG não relatam ou não caracterizaram as espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção, o que dificulta a associação das formas clínicas, bem como a possibilidade adequada de manejo epidemiológico dos surtos .

### 1.1.2 Etiologia

Atualmente, nas Américas, são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadoras de LTA humana e oito espécies descritas, exclusivamente em animais. No Brasil, os agentes etiológicos da LTA podem ser protozoários tanto do subgênero *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*, complexo

*Leishmania mexicana*) quanto do subgênero *Viannia* (*Leishmania guyanensis*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania shawi*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania lindenbergi* e *Leishmania braziliensis*) (BRASIL, 2017).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie de *Leishmania* responsável pela LTA no Brasil (LAINSON, 2010). Apesar de ser uma doença predominante em meio silvestre, a *L.(V.) braziliensis* adaptou-se à ação antrópica e a vetores e hospedeiros-reservatórios em áreas rurais e urbanas, sendo crescente o número de casos nestas áreas (WHO, 2010). Devido a sua ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina, é considerada a espécie mais importante causadora da LTA em toda América Latina. No Brasil, *L. braziliensis* encontra-se amplamente distribuída (BRASIL, 2017). Considerando o estado de MG, a espécie *L. braziliensis* é mais predominante nas infecções humanas (BRASIL, 2017).

A infecção por *L. braziliensis*, pode apresentar um período de incubação que varia de duas semanas a vários meses. A apresentação clínica consiste em lesões cutâneas com úlceras rasas, circulares, com bordas elevadas e bem definidas e com assoalho da úlcera de aspecto granular (MARZOCHI, SCHUBACH & MARZOCHI, 1999). A linfadenopatia regional normalmente antecede ao surgimento de ulcerações por uma a 12 semanas (COSTA, 2007; GONTIJO & CARVALHO, 2003). Além dos sinais clínicos clássicos, Quaresma e colaboradores (2011) encontrou lesões atípicas que formavam pápulas, placas, nódulos, vegetante, verrucosa e ulcerocrostosas em pacientes diagnosticados com *L. braziliensis* na reserva indígena do Xakriabá (MG).

O diagnóstico definitivo depende da identificação de amastigotas em tecido ou promastigotas em meio de cultura (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Porém, as ferramentas de biologia molecular têm se mostrado extremamente úteis, não apenas para o diagnóstico, mas também para a caracterização das espécies de *Leishmania* e verificação da diversidade genética do parasito (REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

### 1.1.3 Transmissão e ciclo biológico

De forma breve, o ciclo de transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* ocorre principalmente quando insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) do gênero *Phlebotomus* (na Europa, África e Ásia – Velho Mundo) e *Lutzomyia* (do sudeste dos EUA ao norte da Argentina – Novo Mundo) infectados regurgitam formas flageladas (promastigotas) do parasito na pele do hospedeiro durante repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK, 1999; MARZOCHI, SCHUBACH & MARZOCHI, 1999). As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e/ou outros tipos de células fagocíticas mononucleares, onde se transformam em formas não-móveis, intracelulares obrigatórias e divisíveis, denominadas amastigota, e replicam, resultando no rompimento da célula hospedeira, disseminando a infecção para outras células monocíticas fagocitárias. Os flebotomíneos se infectam ao ingerirem células contendo as formas amastigotas que, no intestino do inseto, se transformam novamente em promastigotas e migram para a probóscide, propiciando a infecção de novos hospedeiros (KILLICK-KENDRICK, 1999; YOUNG & DUNCAN, 1994).

Os hospedeiros invertebrados vetores dos agentes etiológicos da LTA são fêmeas de flebotomíneos pertencentes a ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Dependendo da região geográfica, podem receber nomes populares, como: mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado (CAMARGO & BARCINSKI, 2003). No Brasil, as cinco principais espécies de vetores da *L. (V.) braziliensis* são *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, *Lutzomyia (N.) neivai*, *Lutzomyia (N.) whitmani*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia (Pintomya) pessoai*. Estudos indicam que *Lutzomyia (P.) fischeri* também pode possuir capacidade vetorial (SHIMABUKURO et al., 2010). No ambiente rural, *L. whitmani* e *L. migonei* são os principais vetores. (CAMARGO-NEVES et al., 2002). Atualmente, *L. intermedia* é o vetor mais importante de *L. (V.) braziliensis* por estar presente no ambiente peridomiciliar. Esta espécie sofreu adaptação e tornou-se abundante em ambientes que sofreram antropização, com redução total ou parcial de cobertura vegetal original e demonstram alta afinidade nas áreas que compreendem o intra e peridomicílio (SILVA & GOMES., 2001).

#### 1.1.4 Hospedeiros mamíferos

O ciclo biológico da LTA pode estar associado a uma enorme diversidade de hospedeiros mamíferos que podem atuar como reservatórios. Os pequenos mamíferos são considerados os principais reservatórios da LTA (ASHFORD et al., 1998, TONELLI et al., 2017) por serem abundantes nos diversos biomas, tolerarem bem infecção por *L. braziliensis* e possuem alto potencial biótico.

Diversos estudos demonstraram a prevalência de infecção por espécies de *Leishmania* entre pequenos mamíferos de áreas endêmicas e não endêmicas (ASHFORD et al., 1998; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; LIMA et al., 2013; QUARESMA et al., 2011). Apesar da complexidade em determinar se um hospedeiro pode atuar como reservatório, algumas espécies de pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos já foram encontrados naturalmente infectados, tais como *Rattus rattus* (PEREIRA et al., 2017; BRANDÃO-FILHO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005), *Oryzomys capito* (FORATTINI et al., 1976), *Oryzomys subflavus* (OLIVEIRA et al., 2005), *Bolomys lasiurus* (BRANDÃO-FILHO et al., 2006), *Nectomys squamipes*, (BRANDÃO-FILHO et al., 2003), *Didelphis albiventris* (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; SCHALLIG et al., 2007), *Thrichomys apereoides* (QUARESMA et al., 2011) *Cerradomys subflavus*, *Gracilinanus agilis*, *Oxymycterus dasytrichus* e *Akodon cursor* (TONELLI et al., 2017). Em Belo Horizonte, Melo (2008) demonstrou alto número de animais positivos (29%), para *Leishmania* subgênero *Viannia*, sendo 89% destes, infectados por *L. braziliensis* e pela primeira vez foi detectada a infecção natural em *Didelphis aurita* (marsupial), *Galictis sp.* (carnívoro), *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* (roedores sinantrópicos).

Apesar da grande diversidade de animais vertebrados encontrados infectados naturalmente por *L. braziliensis*, são necessários mais estudos a fim de obter maior compreensão da competência dessas espécies como reservatórios da *L. braziliensis* (ANDRADE et al., 2015). Contudo, sabe-se que algumas espécies de pequenos mamíferos sinantrópicos, além de contribuírem para a manutenção do parasito na enzootia silvestre, são também importantes na conexão entre os ciclos silvestre, rural e urbano (CABRERA et al., 2003). Um estudo conduzido por Tonelli et al. (2017), isolou pela primeira vez *L. braziliensis* em pequenos mamíferos silvestres (*Akodon cursor*, *Cerradomys subflavus* e *Oxymycterus dasytrichus*) em

Minas Gerais e demonstrou que a infecção apresentou um padrão diferente do observado em humanos, infectando outros tecidos além da pele. Essas diferenças na apresentação clínica da doença estão relacionadas a diversos fatores que influenciam na apresentação clínica e na gravidade da doença, tal como as características genóticas e de patogenicidade de cepas de *L. braziliensis*, bem como fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro, como por exemplo seu estado imunológico, genético e nutricional (CDC, 2019; QUARESMA et al, 2011; WHO, 2019;).

Além dos animais silvestres, também se sabe pouco sobre a importância dos animais domésticos na epidemiologia da *L. braziliensis* (CASTRO et al., 2007). Os cães são animais domésticos de maior importância neste contexto, por muitos deles fazerem conexão com ambiente peridoméstico e doméstico, ou mesmo transitando entre os ambientes silvestres e pelo convívio intenso com o homem. Contudo, seu papel como reservatório ainda é controverso. Madeira et al. (2005) e Padilla et al. (2002) na Argentina, demonstraram que os cães apresentaram poucas lesões e estas estavam com poucos parasitos, sugerindo que estes animais não atuam como reservatórios, sendo hospedeiros eventuais. Entretanto, Gontijo et al. (2002) isolou *L. braziliensis* de cães, sugerindo que estes animais também podem contribuir para a manutenção do ciclo do parasito no ambiente peridoméstico. Falqueto et al. (2003) verificou que a ocorrência de casos humanos de LTA é mais frequente na presença de cães infectados com *L. braziliensis*. Deste modo, demonstra-se a importância do correto diagnóstico baseado na caracterização das espécies de *Leishmania* nos cães infectados, para melhor compreender o papel destes hospedeiros na epidemiologia da LTA.

Devido à urbanização acentuada da leishmaniose, outras espécies de animais domésticos podem estar envolvidas na epidemiologia da *L. braziliensis*. No Brasil, equinos, suínos e gatos já foram encontrados infectados por *L. braziliensis* (PASSOS et al., 1996; SIMÕES et al., 2005). A leishmaniose felina é um achado incomum, sugerindo que a doença é rara em gatos. Porém, Schubach (2004) isolou *L. braziliensis* em dois gatos que apresentavam sinais clínicos de LTA em um surto domiciliar no Rio de Janeiro. Apesar da proximidade dos gatos com os humanos e o

aumento no número destes animais domiciliados, ainda são escassos os estudos sobre a infecção por *Leishmania* nessa espécie.

O papel do homem na manutenção da epidemiologia da LTA também ainda é discutido. Sabroza (1981) identificou maior número de infecção entre indivíduos que moravam em residências com mais de seis moradores. O autor sugere que o achado seria um indicativo de transmissão peridomiciliar. Além disso, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde, do inglês WHO – *World Health Organization*), (2010) nos focos de LTA a transmissão pode ocorrer com a picada de flebótomos somente entre humanos. Infecções subclínicas ou inaparentes, demora na procura de assistência médica e falhas no diagnóstico, podem favorecer a manutenção do parasito e a transmissão antroponótica (DU et al., 2016)

Portanto, percebe-se que ainda são insuficientes os conhecimentos quanto ao papel dos hospedeiros na cadeia de transmissão da LTA nos diferentes cenários, bem como sobre as modificações gênicas do parasito que podem favorecer sua propagação. Contudo, considerando o aumento nas espécies de animais identificadas como hospedeiras, bem como as diversas defesas antiparasitárias que cada espécie apresenta, supõe-se que está ocorrendo alterações gênicas adaptativas na *L. braziliensis* (VICKERMAN, 1994; ROUGERON et al., 2010).

Ao longo do tempo a *L. braziliensis* desenvolveu diversos recursos para sobreviver aos diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados e assim ter sucesso na sua propagação. Considerando o processo de urbanização um fenômeno recente, demonstra a necessidade de entender esse processo adaptação é de primordial relevância para um melhor conhecimento de sua epidemiologia e potencial evolutivo.

#### 1.1.5 Tratamento

No Brasil, o tratamento das leishmanioses para humanos é fornecido de forma gratuita pelo SUS (Sistema Único de Saúde) e, de acordo com o Ministério da Saúde (MS), a droga de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina - Glucantime®), e como segunda escolha a

anfotericina B e derivados (BRASIL, 2017). O tratamento é desafiador e longo, sendo necessário monitoramento e hospitalização do paciente. Além disso, as drogas disponíveis apresentam alta toxicidade e, algumas, teratogenicidade, (GOTO & LINDOSO, 2010) fatores que podem induzir muitos pacientes a abandonarem o tratamento.

Apesar da resposta ao tratamento apresentar diferença entre espécies de *Leishmania*, as drogas utilizadas ainda são as mesmas, independente da espécie diagnosticada. No Brasil, Romero e colaboradores (2001) observaram que a falha da terapia com antimônio foi maior nos pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis* (73,7%) do que naqueles infectados com *L. (V.) braziliensis* (49,2%). Essa diferença pode ser explicada pelas diferenças gênicas entre as linhagens de *Leishmania*. Portanto, não considerar a espécie de *Leishmania* ao conduzir uma terapia, pode propiciar não somente na falha terapêutica, como também pode contribuir com a resistência do parasito.

Ao longo dos últimos anos tem se observado aumento na resistência aos medicamentos existentes (GOTO & LINDOSO, 2014), portanto é necessário mais estudos a fim de melhorar o uso dos medicamentos já disponíveis, busca de novos alvos terapêuticos, maior conhecimento acerca da evolução do parasito e assim promover o desenvolvimento de novos medicamentos mais apropriados. Em contra partida, há pouco interesse dos governos e da indústria farmacêutica no investimento em pesquisas e desenvolvimento de novas drogas, dificultando o controle da doença e favorecendo aparecimento de cepas geneticamente variantes e mais resistentes (RANGEL et al., 2014).

## 1.2 Aspectos moleculares e diversidade genética do gênero *Leishmania*

### 1.3 Genoma e reprodução

Diversos estudos tem demonstrado a ampla diversidade genética do gênero *Leishmania*, principalmente considerando *L. braziliensis* (CUPPOLILO et al., 2003; PACHECO et al., 1990) onde características do seu genoma contribuem com essa diversidade. O genoma nuclear desses protozoários apresenta grande plasticidade inter e intraespécie, apresentando variação no tamanho e número dos cromossomos

e no genoma mitocondrial, que varia em tamanho e organização dos maxicírculos (PACHECO et al., 1990).

O genoma haploide de *L. braziliensis* é arranjado em 35 cromossomos, como resultado de um evento de fusão envolvendo cromossomos 20 e 34, enquanto espécies viscerotrópicas (*L. infantum* e *L. donavani*) possuem 36 cromossomos (BRITTO et al., 1998; ROGERS et al., 2011). A análise genômica comparativa dessas espécies de *Leishmania* demonstrou um número pequeno de genes específicos, sendo apenas 19 genes para *L. infantum* e 67 para *L. braziliensis* (RAYMOND et al., 2012). Além disso, estudos recentes demonstram grande grau de aneuploidia, através do sequenciamento e da análise integral do genoma desses parasitos (ROGERS et al., 2011; RAYMOND et al., 2012).

Rogers e colaboradores (2011) demonstraram que, durante a amplificação do cromossomo, o aumento do número de cópias de genes pode contribuir para alterações na expressão gênica. Supõe-se que essas alterações ocorram em resposta às condições ambientais e do hospedeiro, fornecendo uma base genética para o tropismo do parasito. Além disso, evidenciaram que as alterações complexas no número de cópias cromossômicas podem ser bem toleradas em espécies de *Leishmania* e que aneuploidia é instável entre cepas, principalmente devido às distintas pressões ambientais.

Ademais, a estrutura do genoma de *Leishmania* apresenta matrizes em *tandem* de genes duplicados (IVENS et al., 2005). A maioria desses genes codificam proteínas, cuja função ainda é desconhecida. Estudos sugerem que possam contribuir para o tropismo parasitário e patologia associada às diferentes formas da doença (PEACOCK et al., 2007). Assim, são necessários mais estudos para determinar a funcionalidade desses genes na biologia do parasito e como podem influenciar na sua propagação e patogenia.

A forma como ocorre a reprodução de espécies de *Leishmania* também influencia na diversidade genética do parasito. Atualmente sabe-se que podem ocorrer duas formas reprodutivas: clonalidade (assexuada) e sexualidade (ROUGERON et al., 2010). Acredita-se que a maioria das espécies do gênero *Leishmania* apresenta processo de perpetuação clonal como principal meio de

reprodução (TIBAYRENC & AYALA, 2002). Na reprodução exclusivamente clonal não ocorre segregação e recombinação, o que gera clones estáveis. A hipótese de clonalidade não impossibilita a ocorrência de recombinação genética esporádica. Já a reprodução sexual gera segregação e recombinação. A segregação trata de alelos em único *locus*, já a recombinação relaciona alelos em *locus* distintos (TIBAYRENC & AYLA, 2002).

Existem diversos relatos de evidências que há troca genética entre diferentes espécies de *Leishmania* em populações naturais durante sua passagem pelo vetor (MAURÍCIO et al., 2006; ROUGERON et al., 2010; VICKERMAN, 1994). Acredita-se que a troca genética intraespécie de *Leishmania* tem implicações para a heterose. A heterozigose pode ser desencadeada pelas mutações em um alelo ou pela permuta genética entre cepas com diferentes alelos (MAURÍCIO et. al. 2006). As mutações são mais prováveis para sítios heterozigotos únicos, porém a recombinação é uma explicação mais aceita para mais de dois sítios. A recombinação entre espécies ou mesmo entre grupos genéticos pode contribuir com aumento de virulência das cepas circulantes, resistência a quimioterápicos e maior capacidade de infectar diferentes hospedeiros e vetores, sendo uma estratégia reprodutiva natural desses parasitos e que confere uma vantagem seletiva (MAURÍCIO et. al. 2006; TESFAYE et al., 2014).

A organização dos genes de espécies de *Leishmania* apresentam sintenia. Contudo, há um alto nível de polimorfismos nas sequencias de DNA entre as diversas espécies (RAVEL et al., 2006; ROUGERON et. al., 2010).

Em populações naturais de diferentes espécies de *Leishmania* é possível encontrar polimorfismos (ou SNPs - polimorfismo de nucleotídeo simples ou único, do inglês *single nucleotide polymorphism*) o que pode elucidar as adaptações destes parasitos às alterações ambientais. Estudos analisando a diversidade genética de *L. infantum* no Velho Mundo contribuíram para o entendimento da epidemiologia do parasito, incluindo a distribuição geográfica dos diferentes genótipos e as associações entre genótipos específicos e diferentes apresentações clínicas da doença (ZEMANOVÁ, 2004).

Entre as diversas espécies de *Leishmania*, observa-se uma variação fenotípica ocasionada por polimorfismos que também ocorre intraespécie, alterando

os níveis de virulência entre clones (GARIN et al., 2001). Consequentemente, essas variações podem afetar a resposta imunológica do hospedeiro, contribuindo para apresentações clínicas atípicas da doença além de afetar a eficiência das terapias utilizadas (CUPOLLILLO et al., 2003; QUARESMA et al., 2011). Cupollilo et al. (2003) observaram polimorfismos em *L. braziliensis* de diferentes regiões e hospedeiros, principalmente na Amazônia, demonstrando 15 zimodemas diferentes, utilizando a técnica de isoenzimas.

#### 1.4 Relação da diversidade genética com os ciclos de transmissão (vetores e reservatórios)

A plasticidade do genoma de espécies de *Leishmania* permite que esse gênero se adapte a diferentes ambientes, incluindo a capacidade de sobreviver em uma variedade de hospedeiros mamíferos e resistir a uma variedade de medicamentos (LEPROHON et al., 2009). A ampla diversidade genética desse parasito pode estar relacionada aos aspectos epidemiológicos, tal como modo de transmissão e a grande variedade de ambientes e hospedeiros, que causam grande pressão seletiva ao parasito, induzindo-o a adaptar rapidamente.

Considerando a diversidade genética intraespecífica e a grande variedade de ambientes, vetores e reservatórios, acredita-se que subpopulações heterogêneas circulem em áreas endêmicas (TIBAYRENC et al., 1990). Reservatórios e vetores podem atuar como “filtros biológicos” para clones, através de pressão imune, induzindo a formação de polimorfismos, e consequentemente cepas geneticamente variantes. O mecanismo adaptativo de seleção clonal, explica a circulação de subpopulações heterogêneas na natureza (LEE, TARN & CHANG, 1993; PACHECO et al., 1990). Deste modo, situações epidemiológicas mais simples ou mais complexas podem ser resultado da capacidade que determinados clones teriam, ou não, para propagar-se em áreas endêmicas específicas (PACHECO et al., 1986).

Estudos em diferentes áreas e diferentes hospedeiros podem revelar características interessantes que auxiliam na compreensão da história natural do parasito, da evolução e do manejo epidemiológico (FERREIRA et al., 2012). Acredita-se que a existência de diferentes ciclos de transmissão para *L. braziliensis* contribua para a ocorrência e manutenção da diversidade intraespecífica

(CUPOLILLO et al., 2003). Pacheco e colaboradores (1990) demonstraram em amostras de *L. braziliensis* isoladas da região amazônica alta heterogeneidade genética. Essa diversidade genética está relacionada ao grande número de espécies de vetores e hospedeiros-reservatórios que compõem os ciclos de transmissão do parasito nesta região, diferente do que ocorre em regiões mais ao sul do Brasil onde não há tanta diversidade de indivíduos no ciclo, apresentando baixo nível de heterogeneidade genética. No entanto, ainda são escassos estudos sobre a divergência intraespécie e distribuição geográfica dos isolados de *L. braziliensis*, sendo necessárias mais pesquisas, a fim de elucidar como diferentes vetores, reservatórios e ambiente moldam a variabilidade nas populações.

Por fim, observa-se que diversos fatores, que vão desde fatores intrínsecos do parasito até o *background* genético e imunológico do hospedeiro, precisam atuar de forma sinérgica para que ocorra propagação do parasito e para que um indivíduo adoça (DESJEUX, 2001). Contudo, observa-se através de estudos do genoma, que algumas espécies de *Leishmania* ou mesmo subpopulações específicas dentro de uma espécie podem ser dotadas de mecanismos genéticos de resistência ao hospedeiro e a drogas, bem como capacidade de gerar patogenia de formas distintas (CHANG & MCGWIRE, 2002). Estudos demonstram a apresentação de formas clínicas específicas, causadas por *L. braziliensis*, restritas a determinadas regiões geográficas, como por exemplo, casos de leishmaniose muco-cutânea (LMC) e disseminada no estado da Bahia (Brasil), e casos de lesões atípicas na reserva indígena do Xakriabá em MG (QUARESMA et al, 2011; SCHRIEFER et al., 2009). Estes dados sugerem que grupos de genótipos contribuam para a ocorrência das formas clínicas da LTA (BOITÉ, 2014; SCHRIEFER et al., 2009). Embora a capacidade de virulência e resistência possa ser modulada por fatores ambientais e genéticos de seus hospedeiros, aspectos moleculares das espécies de *Leishmania* são elementos-chave para compreensão da diversidade genética e evolução da LTA.

## 1.5 Epidemiologia molecular e ferramentas moleculares aplicadas na caracterização das Leishmanioses

As modificações na dinâmica epidemiológica da LTA têm sido alarmantes nas últimas décadas, desafiando o sistema de saúde pública. Os avanços nas técnicas de caracterização molecular estão auxiliando na compreensão da ecopidemiologia dos parasitos do gênero *Leishmania* (FERREIRA et. al., 2012). O termo “epidemiologia molecular” vem sendo amplamente utilizado na comunidade científica. A definição de epidemiologia molecular ainda é bem discutida, contudo consiste no uso de técnicas moleculares aplicadas ao estudo da distribuição e determinantes de doença em populações ( FOXMAN & RILEY, 2001; SCHULTE & PERERA, 1993). A taxonomia, a filogenia e a genética constituem ferramentas essenciais que possibilitam a resolução de muitos questionamentos epidemiológicos, sendo imprescindível para um melhor detalhamento das mudanças epidemiológicas que ocorrem com o protozoário em questão (BAÑULS, HIDE & TIBAYRENC, 1999; FOXMAN & RILEY, 2001). Deste modo, a epidemiologia molecular apresenta-se como uma ferramenta importante que vêm proporcionando maior conhecimento sobre história natural da doença e auxiliado assim estudos epidemiológicos (FERREIRA et. al., 2012).

Atualmente existem diversas técnicas e ferramentas de biologia molecular disponíveis para análises da epidemiologia das leishmanioses, porém escolher o método mais adequado para cada estudo é ainda um desafio (SCHÖNIAN et. al., 2011). Diferentes metodologias têm sido empregadas na caracterização e estudos da evolução e a variabilidade genética em *Leishmania*. Apesar disso, considerando estudos em nível intraespécie, a identificação de variações genéticas (ou híbridos) entre populações naturais é complexa. Estas variações podem estar associadas a genes que possuem polimorfismos diretamente relacionados ao tipo de hospedeiro/reservatório em que o parasito está adaptado ou mesmo àqueles em que o parasito está em processo de adaptação.

Eletroforese de enzimas multilocus (MLEE, do inglês *Multi Locus Enzyme Electrophoresis*) é o estudo de polimorfismos em enzimas que atuam em vias metabólicas. Foi a primeira metodologia empregada para caracterizar isolados de

*Leishmania* e ainda é a técnica considerada por muitos como padrão ouro para estudos moleculares de taxonomia (MOMEN, 1984; SCHÖNIAN et al., 2010a). Entretanto, apresenta limitações quanto à utilização da técnica, tal como necessidade de se isolar e cultivar os parasitos, além da observação de um mesmo zimodema que pode incluir genótipos diferentes (MAURICIO et al., 2006; SCHÖNIAN et al., 2010a).

Além da MLEE, existem diversas ferramentas disponíveis para identificação de espécies e análise filogenética incluindo técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e sequenciamento do DNA, bem como métodos inovadores, como tipagem de sequências multilocus (MLST - *Multilocus sequence typing*) e tipagem de microssatélites multilocus (MLMT - *Multilocus microsatellite typing*). O MLST é considerado atualmente a técnica mais promissora (LAUTHIER et al., 2019).

Vários estudos mostraram que as mesmas regiões genômicas alvo podem ser usadas para comparar distâncias entre as espécies, mas também para avaliar a diversidade genética dentro das espécies. Além da capacidade de distinguir espécies de *Leishmania*, a técnica MLST tem-se demonstrado eficiente para identificar variabilidade genética, possibilitando análise da dinâmica populacional do parasito (BAÑULS, HIDE & PRUGNOLLE, 2007). Atualmente a técnica conta com dez marcadores descritos e testados para o complexo de *L. donovani* (ZEMANOVA et al., 2007) e quatro alvos propostos para *L. (Viannia) spp.* (TSUKAYAMA et al., 2009). Porém, as bases de dados para *Leishmania* (número de cepas digitalizadas e publicadas) ainda é relativamente pequena, configurando uma desvantagem da técnica atualmente (BOITÉ et al., 2012).

A análise de mais *loci* (quatro ou mais) forneceria mais segurança na discriminação das cepas (BOITÉ et al., 2012; MAURÍCO et al., 2006; VOLPINI et al., 2004). Mauricio e colaboradores (2006) propuseram o primeiro esquema de alvos para *Leishmania spp.*, e desde então outras combinações de alvos de MLST foram desenvolvidos. A escolha dos genes alvo pode variar de acordo com o questionamento de cada pesquisa, pois genes mais polimórficos podem fornecer

informações importantes para distinção de espécies mais próximas, ou intraespécie, como cepas. Em contra partida, genes mais conservados são úteis na estruturação em níveis taxonômicos mais elevados (BOITÉ, 2014). Contudo, até o presente momento não há ainda um consenso para padronização sobre qual a melhor combinação de alvos a serem utilizados (LAUTHIER et al., 2019).

Assim como já é proposto para outros microrganismos patogênicos, o MLST representa uma excelente ferramenta que tem características para tornar o novo padrão ouro em genotipagem de *Leishmania*, incluindo estudos filogenéticos e epidemiológicos, principalmente considerando aqueles que analisam grande número de isolados de diferentes áreas geográficas, hospedeiros e vetores. Entretanto, para tornar a técnica referência, são necessários mais estudos para aumentar o banco de dados de MLST para *L. braziliensis* e aumentar o número de sequências de cepas publicadas.

Nos próximos tópicos, serão descritos os alvos moleculares escolhidos baseados, principalmente, nos alvos propostos para a técnica de MLST para a caracterização molecular.

#### 1.5.1 Marcadores e/ou alvos moleculares para caracterização genética

Diversos marcadores genéticos, que apresentam particularidades e níveis variáveis de detecção de diversidade genética intra e interespecíficas, tem sido empregados a fim de elucidar questões taxonômicas, evolutivas, epidemiológicas e resistência a drogas.

Os principais marcadores utilizados para *L. braziliensis* são específicos para fragmentos de genes que codificam enzimas metabólicas, sendo essenciais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro. Entretanto, algumas enzimas são importantes na virulência e resistência do parasito, tal como a glucose-6-fosfato dehydrogenase (*g6pd*) e manose fosfato isomerase (*mpi*). Outro marcador comumente utilizado é o gene codificador da enzima de choque térmico (*hsp70*) sendo eficiente em demonstrar níveis de polimorfismo para *L. braziliensis* (SILVA et al., 2010).

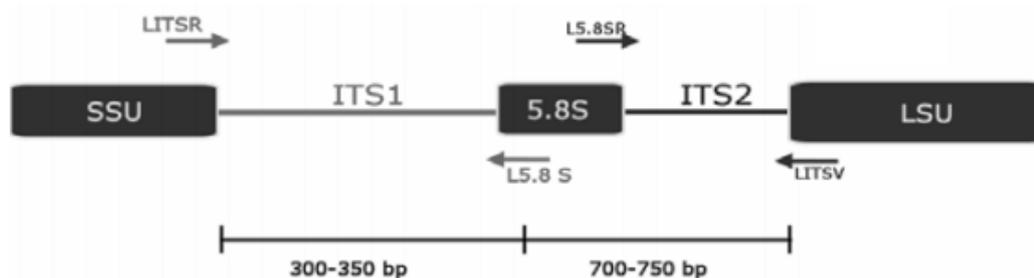
#### 1.5.1.1 Proteína de Choque térmico 70 kilodaltons (*hsp70*)

Os organismos eucariotos, quando sofrem aumentos repentinos de temperatura, expressam proteínas de choque térmico (*HSPs* – do inglês *heat-shock proteins*). Estas proteínas compõem um mecanismo primordial para proteção de proteínas precursoras e são essenciais para a desagregação dos complexos proteicos formados durante o período de estresse térmico (PELHAM, 1986). Os tripanossomatídeos são capazes de se adaptar às modificações drásticas de temperatura, pois parasitam insetos e mamíferos que possuem diferentes temperaturas. Portanto as *HSPs* compõe um mecanismo essencial para sobrevivência e manutenção do ciclo destes parasitos.

Dentre todos os genes de *HSPs*, a *hsp70* é o gene mais altamente conservado em sequência e função (GARCIA et al., 2004; FRAGA et al., 2010). Este gene permite analisar a variabilidade genética, sendo um alvo adequado para tipagem de espécies de *Leishmania* neotropicais (SILVA et. al., 2010). A proteína *hsp70* está envolvida na imunopatologia das leishmanioses, fornecendo informações importantes sobre resistência e virulência do parasito (FOLGUEIRA & REQUENA, 2007). Variação no gene de *hsp70* tem sido associada à resistência ao antimônio em *L. donovani* e *L. infantum* (AKHOUNDI et al., 2016a).

#### 1.5.1.2 Espaçadores transcritos internos (*ITS1*)

Centenas de genes ribossomais nucleares, repetidos em tandem (rDNA) estão presentes na células da *Leishmania* (HILLS et.al., 1991). No interior de cada cópia repetida de rDNA, encontra-se dois espaçadores transcritos internos, (ITS) localizados entre os genes de pequena subunidade (SSU) e de grande subunidade (LSU) do rRNA. ITS-1 e ITS-2 estão separados pelo gene rRNA 5.8S (**figura 1**), e ambos são marcadores de sequências espécie-específica (CUPOLILLO et. al., 1995). A PCR-ITS1, localizado entre os genes 18S e rRNA 5.8S, tem apresentado excelente sensibilidade e especificidade (NASEREDDIN et. al., 2008).



**Figura 1** – Organização do *locus* do rDNA de tripanozomatídeos demonstrando a subunidades conservadas (SSU) e a subunidade variável (ITS1).

O ITS1 é um alvo de fácil amplificação, mesmo quando há baixa quantidade de DNA (VAN-EYS et. al., 1992). O produto amplificado pode ser digerido, com a utilização das enzimas de restrição (RFLP), também permite a identificação e caracterização do patógeno (SCHÖNIAN et. al., 2003).

Kuhls e colaboradores (2005), utilizando sequências de ITS 1 e 2, de cepas do complexo *Leishmania donovani* provenientes da América Central e do Sul, Europa, Ásia e África, identificaram a existência de diferentes grupos filogenéticos, sendo que estas diferenças foram corroboradas por algumas diferenças na biologia e comportamento clínico das cepas viscerotrópicas.

#### 1.5.1.3 Manose-6-fosfato isomerase (*mpi*)

A manose-6-fosfato isomerase (*mpi*) é uma enzima metabólica que participa da via das pentoses no metabolismo da glicose, atuando como catalisador do metabolismo de diversos monossacarídeos (YOON et. al., 2009). Em organismos procariotas e eucariotas, participa da biossíntese dos ativadores doadores de manose, que são base para a biossíntese de vários glicoconjugados (NUNES, 2016). Os parasitos do gênero *Leishmania* sintetizam grandes quantidades de glicoproteínas e glicolípideos contendo manose, que estão presentes em moléculas de superfície envolvidas na virulência (ZHANGL et. al., 2006).

Além disto, a enzima *mpi* é o único marcador enzimático que permite a distinção entre as cepas das espécies *L. peruviana* e *L. braziliensis*, ambas, espécies intimamente relacionadas e pertencentes ao subgênero *Viannia* (ARANA et. al., 1990).

#### 1.5.1.4 Glucose-6-fosfato dehidrogenase (*g6pd*)

A glicose-6-fosfato desidrogenase (*g6pd*) é uma das enzimas amplamente empregadas na MLEE para identificar zimodemas de *Leishmania* (WHO, 2010). A *g6pd* também age na via das pentoses, onde são produzidos produtos essenciais, por exemplo, para a síntese de nucleotídeos, proteínas, e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P (NADPH), importantes na defesa contra o estresse oxidativo em que o parasito está exposto no interior da célula hospedeira (GHOSH et al. 2017).

Além disso, marcadores para *g6pd* discriminam entre diferentes espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, distinguindo *L. (V.) braziliensis* de outras espécies do subgênero *Viannia* (CASTILHO et al., 2003). Cupolillo et. al. (1994) demonstrou que existem oito isoformas da *g6pd* para *Leishmania*, possibilitando diferenciar as espécies pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* e identificou que a isoforma G6PD-7 é exclusiva para *L. (V.) braziliensis*.

#### 1.5.1.5 Isocitrato desidrogenase (*ICD*)

Icd (isocitrato desidrogenase) é uma enzima chave do ciclo de Krebs que regula a transição para a gliconeogênese (RODRIGUEZ-CONTRERAS & HAMILTON, 2014). Diversos estudos tem utilizado o marcador genético para a enzima *icd* em estudos de variabilidade genética. Brandão-Filho et al. (2003) ao caracterizar e estudar a variabilidade genética, de diversas cepas, verificou perfil de variante de *L. (V.) braziliensis*, através da utilização do marcador ICD, identificando a ocorrência de 10 zimodemes diferentes, com nove (de 72 isolados) correspondentes a *L. braziliensis* e um zimodema correspondente a *L. shawi*.

#### 1.5.1.6 Fosfoglicomutase (*PGM*)

A fosfoglicomutase (PGM) é uma enzima que participa do processo e interconversão de glucose-1-fosfato e glucose-6-fosfato, propiciando a glicogênese e a glicogênólise. Herrera et al., (2017) ao utilizar o PGM verificou que isolados de *L. braziliensis* apresentaram maior diversidade genética que *L. panamensis* e maior número de tipos de sequências diplóides (DSTs). O uso do gene PGM permitiu distinguir as cepas de *L. tropica* de diferentes zimodemas e mostraram-se útil na identificação de espécies de *Leishmania* em amostras clínicas sem recurso à cultura e ao MLEE (AZMI et al., 2014).

#### 1.5.1.7 Alanina aminotransferase (ALAT)

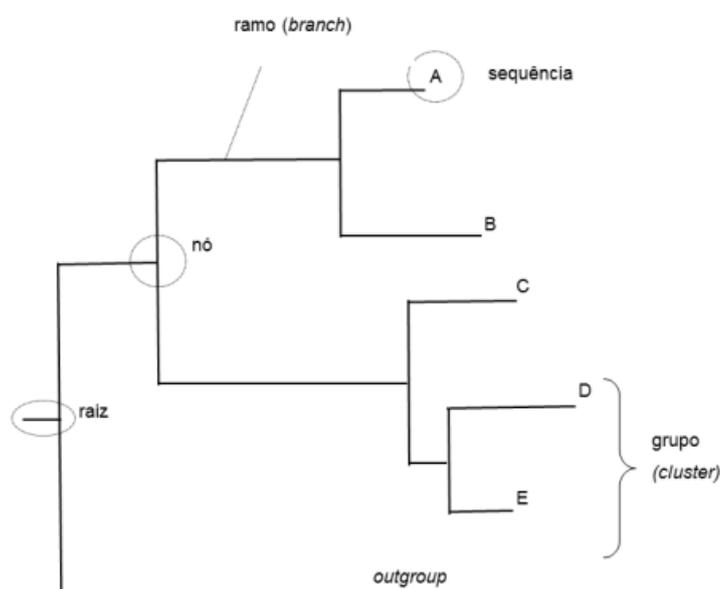
A alanina aminotransferase (ALAT) é um das enzimas transaminase mais relevantes na caracterização de cepas de *Leishmania* descritas até o momento. Está presente em dois compartimentos subcelulares, no citosol e na matriz mitocondrial (MARCIANO et al., 2009). São altamente específicas e cumprem papel importante, fornecendo cadeias de carbono para gliconeogênese, em amastigotas e promastigotas (RODRIGUEZ-CONTRERAS & LANDFEAR, 2006). Contudo, suas demais funções ainda não estão bem esclarecidas.

#### 1.5.2 Estudos filogenéticos do gênero *Leishmania*

As divergências na variabilidade genética que os organismos do gênero *Leishmania* apresentam é um fator que aumenta complexidade da análise evolutiva de populações deste parasito. Mais recentemente, o surgimento de alto número de marcadores moleculares, aliado à bioinformática com construções de árvores filogenéticas, tem sido proposto como ferramentas importantes para resolver diferenças filogenéticas em nível de espécie e para abordar questões epidemiológicas e genéticas populacionais importantes de organismos patogênicos (MAURÍCIO, 2018; VAN DER AUWERA & DUJARDIN, 2015).

As árvores evolutivas (filogenéticas) constituem ferramentas básicas necessárias para a filogenia e taxonomia, sendo uma representação gráfica de relações ancestral-descendente entre organismos ou sequências genéticas e deve ser considerada como uma hipótese de um relacionamento evolutivo entre um grupo de organismos (HOLDER & LEWIS 2003; FELSENSTEIN 2004). Hoje, a maioria das árvores filogenéticas é construída a partir de dados moleculares, sendo sequências de DNA ou proteínas. Originalmente, o objetivo da maioria das árvores filogenéticas moleculares era estimar as relações entre as espécies representadas por essas sequências, mas hoje os propósitos se expandiram para incluir o entendimento das relações interespecíficas, bem como entre as próprias sequências, independentemente da espécie hospedeira, inferindo as funções dos genes que não foram estudados experimentalmente e mecanismos elucidativos que levam a surtos de microrganismos patogênicos (HALL & BARLOW 2006).

Nas árvores de filogenia molecular (**figura 2**), as sequências de nucleotídeos ou proteínas estão nas pontas (*tips*) das árvores, enquanto que os ramos (*branch*) conectam as sequências aos seus ancestrais (CALDART et al, 2016; HOLDER & LEWIS 2003;). Árvores podem ser enraizadas ou não: quando possuem raiz consideram uma sequência chamada grupo externo (*outgroup*), cujo objetivo é dar à árvore uma direção (polaridade) evolutiva, determinando quem são as sequências mais ancestrais. Quando as árvores não são enraizadas, estas não indicam de qual nó representa o ancestral comum das demais sequências (VANDAMME, 2009). Os ancestrais hipotéticos são representados pelos nós, formando diferentes disposições dos ramos da árvore, dando origem a diferentes agrupamentos (*clusters*), onde podem estar inseridos números que representam valores do *bootstrap*. Estes valores representam o número de vezes em que ocorreu o nó nas réplicas realizadas, podendo ser representado em porcentagem, portanto, é uma técnica estatística que testa a confiabilidade estimada. Por fim, a distância evolucionária entre duas sequências é representada pela distância dos ramos da árvore (HOLDER & LEWIS 2003).



**Figura 2** – Árvore filogenética enraizada. Fonte: CALDART et al,2016.

Uma das dificuldades em propor inferências filogenéticas é agrupar organismos em grupos monofiléticos que reflitam ancestralidade comum, considerando que diferentes genes podem apresentar diferentes taxas evolutivas

que, por definição, é o número de substituições de nucleotídeos por sítio, por ano ou milhões de anos (HOLDER & LEWIS 2003; VANDAMME, 2009).

## 2 JUSTIFICATIVAS

As mudanças recentes na epidemiologia da LTA têm apresentado fatores que aumentam a preocupação quanto à contínua propagação no Brasil. O caráter emergente e re-emergente da LTA, especialmente de *L. braziliensis*, bem como a resistência do parasito ao limitado arsenal terapêutico, e adaptação a novos ambientes e hospedeiros sugerem que estão ocorrendo variações genéticas no parasito.

Atualmente dispomos de metodologias de estudos genéticos que permitem a caracterização e principalmente a identificação de variabilidade genética, esta que pode influenciar em fatores que são epidemiologicamente relevantes no parasito, tal como virulência, infectividade, patogenicidade, imunogenicidade e resistência a drogas. Tal variabilidade genética pode se apresentar não somente inter, mas também e intraespécie. Entretanto, estas características podem ser selecionadas no parasito de maneiras distintas nos diferentes hospedeiros.

A complexa relação entre o parasito e seus hospedeiros mamíferos ainda é pouco elucidada. Os hospedeiros podem proporcionar a manutenção e propagação no ciclo epidemiológico da *L. braziliensis*. Por isso, estudos genéticos de populações de *L. braziliensis* em diferentes hospedeiros poderão auxiliar na identificação de variações espécie-específicas, contribuindo para elucidar as modificações na relação entre parasito-hospedeiro e fornecendo dados para a compreensão da epidemiologia da LTA.

As diferentes apresentações clínicas das leishmanioses causada por *L. braziliensis* sugerem a existência de variantes intraespécie, podendo modificar a capacidade do parasito em causar lesões no hospedeiro. A busca pela identificação de variações genéticas, principalmente relacionadas à virulência e infectividade é necessária para melhor compreender os mecanismos pelos quais esses parasitos causam danos aos hospedeiros e reservatório. Tais conhecimentos contribuem para a descoberta de novas ferramentas terapêuticas e de controle da LTA.

Minas Gerais é um estado significativamente afetado pela LTA, especialmente por *L. braziliensis*. Contudo, a caracterização molecular bem como estudos sobre a diversidade genética de cepas de *L. braziliensis* em MG, ainda são escassos

evidenciando a necessidade de pesquisas em diferentes áreas geográficas e diferentes hospedeiros para uma melhor compreensão sobre a genética do parasito.

Por meio de estudos de caracterização e diversidade genética de populações é possível obter dados que elucidem correlações entre populações específicas de *L. braziliensis* e fornecer informações ecoepidemiológicas importante que contribuirão com prognóstico da LTA no Brasil.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* provenientes de hospedeiros humanos, cães domésticos e pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos de Minas Gerais, Brasil.

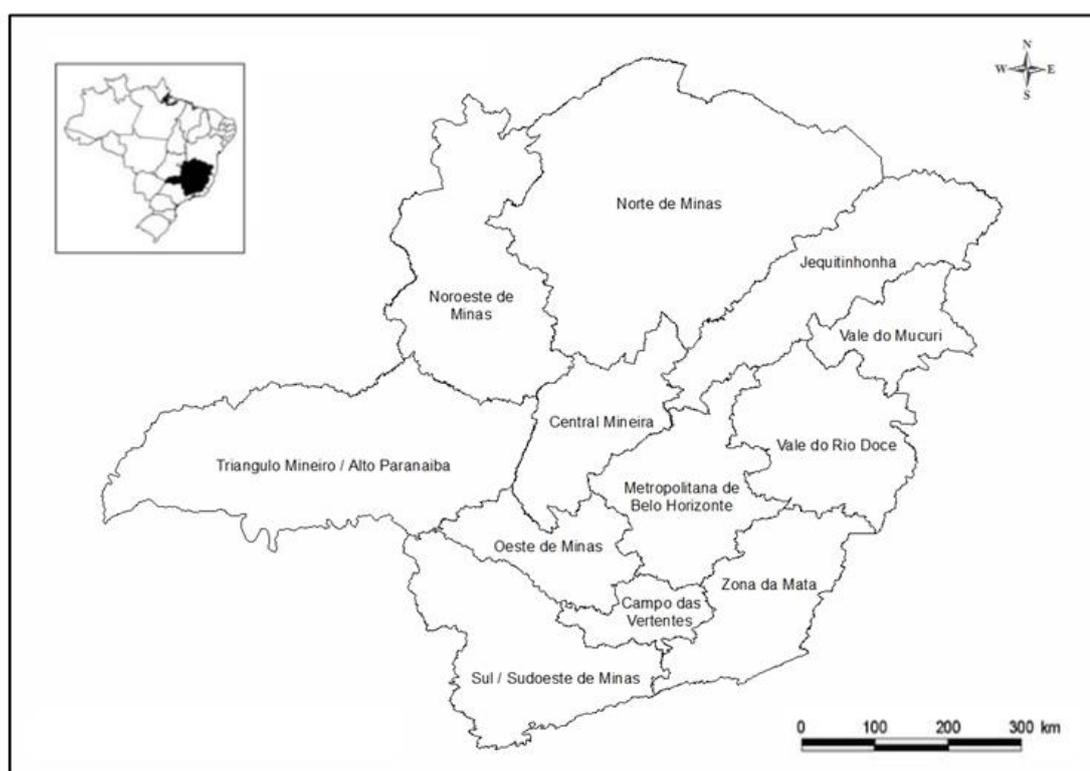
#### 3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar e avaliar a qualidade do DNA de *Leishmania braziliensis* do banco de cepas do Grupo de Estudo em Leishmanioses - IRR;
2. Analisar possíveis variantes genéticas através de sequenciamento dos marcadores voltados para os genes ITS1, *hsp70*, *alat*, *g6pd icd*, *mpi*, e *pgm*;
3. Avaliar a aplicabilidade dos diferentes marcadores genéticos para análises de variabilidade genética;
4. Investigar a relação entre as amostras de diferentes hospedeiros estudados e as diferentes regiões geográficas, através de filogramas.
5. Enriquecer o banco de dados para a compreensão da diversidade genética de *L. braziliensis* no Brasil.

## 4 MATERIAL E METODOS

### 4.1 Locais do estudo

As amostras utilizadas neste estudo são oriundas do estado de Minas Gerais, que está localizado na região sudeste do Brasil. O estado possui 853 municípios delimitados em uma área de 586.521,121 km<sup>2</sup> (IBGE, 2019), inseridos em 12 mesorregiões, conforme mostra a **figura 3**. A população estimada de 21.168.791 habitantes, e densidade demográfica de 33,41 habitantes/km<sup>2</sup>, tendo como capital o município de Belo Horizonte (IBGE, 2019).



**Figura 3** – Mapa representativo da localização das Mesorregiões do estado de Minas Gerais, Brasil. Fonte dos dados: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2016.

Por estar localizado na parte central do território nacional e pela sua grande extensão territorial, Minas Gerais faz fronteira com seis outros estados (Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Mato, Grosso do Sul e Bahia). Contudo, apesar destas características territoriais favorecerem o desenvolvimento da economia do estado, elas são importantes na manutenção de disparidades socioeconômicas entre as diferentes regiões do estado. A porção sul, considerada

mais industrializada e desenvolvida economicamente, possui maior riqueza e apresenta bons indicadores sociais. Já a porção norte, é afetada economicamente, persistindo os mesmos problemas do Nordeste do Brasil: déficit nos serviços de saneamento ambiental, elevada taxa de mortalidade infantil e alto índice de analfabetismo. Problemas que são ocasionados pela ausência políticas públicas eficientes, sendo considerada uma das áreas mais pobres do país (IBGE, 2016).

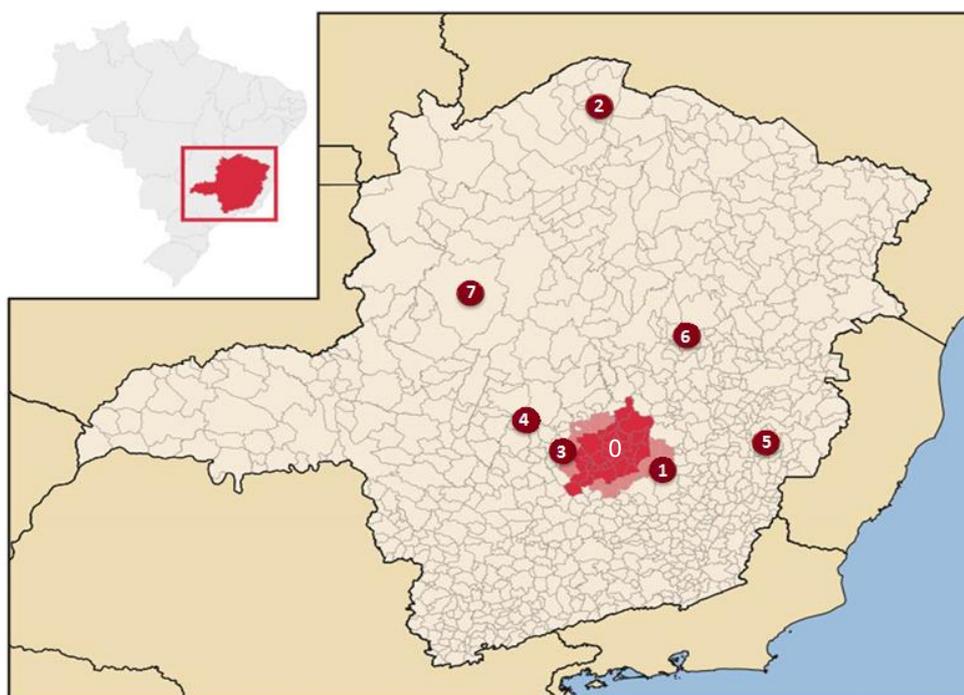
No relevo, identifica-se uma grande proporção de terras altas, bem como chapadas e planícies, sendo característico por possuir área bastante acidentadas, que influencia no seu clima, apresentando variações principalmente entre tropical de altitude e tropical úmido. Em especial, no extremo norte mineiro, devido à baixa pluviosidade, apresenta clima semiárido, com secas prolongadas. No centro-sul, o clima é o tropical semi-úmido, com verões chuvosos. A cobertura vegetal de Minas Gerais pode ser resumida em quatro biomas principais: Cerrado, mais abundante destacando-se nas bacias dos rios São Francisco e Jequitinhonha; Mata Atlântica, segundo mais presente; Campos de Altitude ou Rupestres, presentes nos pontos mais altos do estado; e Mata Seca, no extremo norte. O estado conta também com áreas especiais, como as cinco reservas indígenas, onde residem aproximadamente 6.000 índios, e áreas de preservação ambiental, sobretudo parques nacionais, estaduais e municipais (CBMM. 2013).

#### 4.2 Seleção das amostras de *Leishmania (V.) braziliensis*

Para o presente estudo foram inicialmente analisadas 447 amostras de tecido, cultura ou DNA (previamente extraído) provenientes de diferentes hospedeiros mamíferos. Contudo, somente 28 amostras apresentaram os requisitos mínimos para participação no estudo, tais como concentração de DNA acima de 50ng/ul, juntamente com volume compatível para realização de todos os experimentos (mínimo de 60ul), amplificação em todas as técnicas de PCR utilizadas neste estudo e identificação na técnica de PCR-RFLP ITS-1 como *Leishmania braziliensis*. A quantificação do DNA presente nas amostras foi realizada por meio de espectrofotômetro NanoDrop – ND100 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) utilizando 2 µL das amostras.

### 4.3 Origem das amostras

As amostras selecionadas foram coletadas em 17 municípios do estado de Minas Gerais, Brasil, por estudos anteriores, e estão depositadas no Banco de Cepas do Grupo de Estudos em Leishmanioses - GEL (Instituto René Rachou – Fiocruz Minas) (**figura 4 e quadro 1**). O DNA de todas as amostras estava previamente extraído, obtido de tecido ou cultura, onde algumas amostras possuíam o tecido ou cultura original. Estas amostras foram caracterizadas previamente como *L. braziliensis* através das técnicas MLEE, PCR-RFLP *Hsp70*, e sequenciamento genético do mesmo *amplicon*, por estudos anteriores (LIMA, 2010; PEREIRA et al., 2017; QUARESMA et al, 2011; TONELLI et al, 2017;). As amostras estavam criopreservadas sob temperatura de -20°C e -80°C. Todas as amostras foram coletadas a campo, obtidas diretamente de hospedeiros, e não foram expostas a sucessivas passagens em meio de cultura. Foram utilizadas cepas de referência da OMS como parâmetro de comparação interespecíes nas várias técnicas moleculares (**quadro 2**). As cepas padrão *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* foram utilizadas como *outgroup* na construção dos filograma.



**Figura 4** – Mapa do estado de Minas Gerais indicando a localização dos municípios onde as amostras foram coletadas. Legenda: 0 - Região em vermelho escuro corresponde a RMBH (Região Metropolitana de Belo Horizonte); 1 - Caraça (RPPNSC - pertencente aos Municípios Catas Altas, Barão de Cocais e Santa Bárbara); 2 – Xakriabá (Comunidade indígena pertencente ao Município

São João das Missões); 3 – Pará de Minas; 4 -Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; 7 - João Pinheiro.

ID	Hospedeiro	Local	DNA
53	<i>Homo sapiens sapiens</i>	BELO HORIZONTE <sup>0</sup>	CULTURA
64	<i>Canis lupus familiaris</i>		CULTURA
31	<i>Canis lupus familiaris</i>	BETIM <sup>0</sup>	CULTURA
33	<i>Canis lupus familiaris</i>		CULTURA
19	<i>Rattus rattus</i>	BRUMADINHO <sup>0</sup>	TECIDO
21	<i>Cerradomys subflavus</i>	RESERVA PARTICULAR DO PATRIMÔNIO NACIONAL SANTUÁRIO DO CARAÇA (RPPNSC) <sup>1</sup>	CULTURA
23	<i>Akodon cursor</i>		CULTURA
25	<i>Akodon cursor</i>		CULTURA
22	<i>Akodon cursor</i>		CULTURA
26	<i>Oxymycterus dasytrichus</i>		CULTURA
38	<i>Homo sapiens sapiens</i>	XAKRIABÁ <sup>2</sup>	CULTURA
34	<i>Homo sapiens sapiens</i>		CULTURA
35	<i>Homo sapiens sapiens</i>		CULTURA
71	<i>Trychomys apereoides</i>		TECIDO
76	<i>Gracilinanus agilis</i>		TECIDO
43	<i>Homo sapiens sapiens</i>	LAGOA SANTA <sup>0</sup>	CULTURA
56	<i>Homo sapiens sapiens</i>		CULTURA
44	<i>Homo sapiens sapiens</i>	PARÁ DE MINAS	CULTURA
45	<i>Homo sapiens sapiens</i>	JABOTICATUBA <sup>0</sup>	CULTURA
46	<i>Homo sapiens sapiens</i>	MARTINHO CAMPOS	CULTURA
47	<i>Homo sapiens sapiens</i>	CARATINGA	CULTURA
48	<i>Homo sapiens sapiens</i>	SARZEDO <sup>0</sup>	CULTURA
49	<i>Homo sapiens sapiens</i>	RIO VERMELHO	CULTURA
51	<i>Homo sapiens sapiens</i>	JOÃO PINHEIRO	CULTURA
52	<i>Homo sapiens sapiens</i>	SANTA LUZIA <sup>0</sup>	CULTURA
55	<i>Homo sapiens sapiens</i>		CULTURA
54	<i>Homo sapiens sapiens</i>	SABARÁ <sup>0</sup>	CULTURA
57	<i>Homo sapiens sapiens</i>	RIBEIRÃO DAS NEVES <sup>0</sup>	CULTURA

**Quadro 1** – Relação da identificação da amostra, tipo de amostra utilizada, hospedeiros e Município de origem. Legenda: ID - Identificação da amostra; <sup>0</sup> Municípios pertencentes à Região Metropolitana de Belo Horizonte, <sup>1</sup> Pertencente aos Municípios Santa Bárbara, Barão de Cocais e Catas Altas; <sup>2</sup> Reserva Indígena do Xakriabá pertencente ao Município São João das Missões.

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

**Quadro 2** - Cepas de referência da OMS utilizadas no estudo. Legenda: LC – leishmaniose tegumentar; LV – leishmaniose visceral.

Durante os experimentos, as amostras foram identificadas de acordo com a identificação numérica, o hospedeiro ao qual foi extraída (H - humano, C – cão R – roedor e D - didelídeo) e quanto a localidade. A relação das espécies de pequenos mamíferos e origem da amostra encontram-se na **quadro 3**.

<b>Município</b>	<b>Ordem</b>	<b>Espécie</b>	<b>Amostra</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Brumadinho (RMBH)</b>	Rodentia	<i>Rattus rattus</i>	19	01
<b>Caraça</b>	Rodentia	<i>Cerradomys subflavus</i>	21	01
		<i>Akodon cursor</i>	22, 23 e 25	03
		<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	26	01
<b>Xakriabá</b>	Rodentia	<i>Thrichomys apereoides</i>	71	01
	Didelphimorphia	<i>Gracilinanus agilis</i>	76	01

**Quadro 3** – Relação das espécies de pequenos mamíferos e sua localidade.

A localidade foi identificada com numeração sequencial, onde iniciará com número 0, sendo os municípios pertencentes Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), que inclui os municípios: Belo Horizonte, Betim, Brumadinho, Lagoa Santa, Jaboticatubas, Sarzedo, Santa Luzia, Sabará e Ribeirão das Neves; será identificado como 1 as amostras provenientes da Reserva Particular Do Patrimônio Nacional Santuário do Caraça (RPPNSC, aqui será denominado somente como Caraça) que, apesar de estar inserido nos municípios Santa Bárbara, Barão de Cocais e Catas Altas, pertencentes a RMBH, constitui uma região distinta, preservada ecologicamente e distante de regiões urbanas, predominando o ambiente silvestre. As amostras oriundas da Reserva Indígena do Xakriabá

pertencente ao município São João das Missões, foram identificadas como 2. Os demais municípios receberam o código de numeração de acordo com o apresentado na **quadro 4**.

LOCALIDADE	CÓDIGO	CÃO <sup>1</sup>	PM <sup>2</sup>	HUMANO <sup>3</sup>	Total
Região Metropolitana de Belo Horizonte	0	03	01	09	13
Caraça	1	-	05	-	05
Xakriabá (São João Das Missões)	2	-	02	03	05
Pará de Minas	3	-	-	01	01
Martinho Campos	4	-	-	01	01
Caratinga	5	-	-	01	01
Rio Vermelho	6	-	-	01	01
João Pinheiro	7	-	-	01	01
TOTAL		03	08	17	28

**Quadro 4** – Relação da quantidade amostras, hospedeiros ao qual foi coletada e Município de origem. Legenda: <sup>1</sup> *Canis lupus familiaris*; <sup>2</sup> PM – pequenos mamíferos das ordens Rodentia e Didelphimorphia; <sup>3</sup> *Homo sapiens sapiens*.

#### 4.4 Considerações éticas

As amostras de indivíduos humanos e reservatórios silvestres (pequenos mamíferos) isoladas na terra indígena Xakriabá, pertencente ao município de São João das Missões/MG foram coletadas dos indivíduos entre o período de 2008 a 2010 (QUARESMA et al, 2011) aprovado no Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o registro nº 355/2008 e com autorização para entrada em terra indígena junto à Fundação Nacional do Índio (FUNAI) sob o registro nº 149/CGEP/08, bem como foi autorizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) nº 12989-1. As coletas das amostras provenientes dos pequenos mamíferos oriundos da RPPNSC foram realizadas entre julho de 2013 a maio de 2014 (TONELLI et al, 2017) aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/Fiocruz) tendo protocolo registrado sob o número 14/16-3 e sob licença do IBAMA nº 40191-2. As amostras oriundas de humanos das demais áreas endêmicas de Minas Gerais foram obtidas a partir de atendimento ambulatorial no Centro de Referência em Leishmanioses – Fiocruz MG durante período compreendido entre 1993 e 1998. As amostras oriundas

de cães da RMBH foram coletadas no ano de 2012, sob aprovação pelo CEUA/Fiocruz sobre o número de protocolo LW-76/12 (PAZ et al, 2018).

#### 4.5 Análises moleculares

As amostras de DNA que apresentaram baixa concentração deste e que continha o tecido original, foram novamente submetidas à extração de DNA, sendo realizada com kit Gentra® Puregene® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo o protocolo do fabricante.

Para a técnica de PCR convencional foram utilizados iniciadores (*primers*) considerados importantes marcadores para caracterização e verificação de diversidade genética para subgênero *Viannia*, baseados na técnica MLST. Os iniciadores utilizados são específicos para fragmentos de genes que codificam enzimas metabólicas como a glicose-6-fosfato desidrogenase (*g6pdh*), fosfoglucomutase (*pgm*), manose fosfato isomerase (*mpi*), alaninotransferase (*alat*), e isocitrato desidrogenase (*icd*) e um iniciador para fragmento do gene conservado que codifica proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons (*heat shock proteins - hsp70*) da *Leishmania* spp. A descrição dos iniciadores bem como as referências utilizadas encontram-se na o **quadro 5**.

Gene alvo	Localização no cromossomo	Comprimento do gene (pb)	Tamanho do amplicon (pb)	Sequência do primer 5'-3'	Referência
<i>g6pd</i>	20 e 34a <sup>a</sup>	1686	881	F: ATGGAAGCGTGTGATCGAAT R: GGCTCAACACACTTCAGCAA	BOITE et al., 2012.
<i>Pgm</i>	21	1770	529	F: CAGAGAAGCTGACGTCCCAG R: GACGGGTTACGAAGAAGCG	MARCO et al., 2015.
<i>Mpi</i>	32	1287	681	F: GGCAAGATGTATGCGGAGTT R: CTCCCAGGAACCATCTGTA	BOITE et al., 2012.
<i>Alat</i>	12	1494	589	F: GTGTGCATCAACCCMGGGAA R: CGTTCAGCTCCTCGTTCCGC	MARCO et al., 2015.
<i>Icd</i>	33	1278	1022	F: GAATCGGGAAGGAGATCACA R: CATCATAGCCCCAGAGAGGA	BOITE et al., 2012.
Hsp70	26, 28, 30 e 35	1770	1300	F: GACGGTGCCTGCCTACTTCAA R: CCGCCCATGCTCTGGTACATC	GARCIA et al., 2004.
ITS1	SSU e 5.8S	-	300-350	F: CTGGATCATTTCGGATG R: TGATACCACTTATCGCACTT	CUPOLLILO et al. 1995.

**Quadro 5** - Lista de iniciadores (marcadores genéticos) usados para amplificação de genes através de PCR convencional. <sup>a</sup>*g6pdh* está presente nos cromossomos 20 e 34a somente em *L. braziliensis*. Pb: pares de base. F: *forward*; R: *reverse*.

#### 4.5.1 PCR ITS1 e HSP70

Para confirmar novamente as espécies de *Leishmania*, foi realizada a técnica de PCR seguida de RFLP, onde, inicialmente fez-se a PCR convencional direcionado ao alvo específico para a região de ITS1 e ao alvo dos genes codificadores da *hsp70*, estes que são arranjados *in tandem*. A descrição dos alvos consta no **quadro 5** (página 52). As reações de PCR foram realizadas conforme protocolo descrito por Cupollilo et al (1995) para ITS1 e por Garcia et al. (2004) para *hsp70*, adaptados para um volume final de 25 µL. A amplificação do DNA para ITS1 e *hsp70* foram realizadas no termociclador automático de DNA (Veriti Thermal Cycler - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) segundo os ciclos que se encontram no **quadro 6**. O resultado da amplificação foi verificado por meio de gel de agarose a 1%, segundo a metodologia descrita no tem 4.5.2

Fase	Temp. ITS1	Temp. Hsp70	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	95°C	94°C	30 seg.	} 35x
Anelamento	53°C	60°C	01 min.	
Extensão	72°C	72°C	1:30 min.	
Extensão Final	72°C	72°C	10 min.	1x

**Quadro 6** – Descrição dos ciclos utilizados na PCR convencional para os iniciadores ITS1 e *hsp70*.

#### 4.5.2 Gel de Agarose dos produtos amplificados por PCR

A amplificação e tamanho do fragmento das técnicas de PCR realizadas foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com 5 µl de brometo de etídio (0,5µg/mL) e um marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100pb (Thermo Fisher Scientific) adicionado na primeira canaleta. Nas demais canaletas foram adicionados, separadamente, 10 µl de cada amostra, homogeneizadas com 2 µl de tampão 10x *BlueJuice Gel Loading Buffer* (Invitrogen, Thermo Fisher). As amostras amplificadas foram comparadas com cepas referências de *Leishmania* (**quadro 2**, página 49). O gel foi visualizado e fotodocumentado com transluminador (L-PIX, Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) sob luz ultravioleta.

#### 4.5.3 RFLP *hsp70* e *ITS1*

Para confirmar novamente as espécies de *Leishmania*, os produtos da amplificação pela PCR-*hsp70* e PCR-ITS1 foram submetidas, separadamente, à digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, utilizando 10 µl do produto da PCR-Hsp70 e PCR-ITS1, 1,5 µl de tampão 10x, 0,15 µl BSA, 0,5 de enzima HAEIII, 2,85 µl de água Milli-Q, e incubando em termobloco (Bioplus – IT 2002) à 37° por duas horas. Os padrões de restrição foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 3% com 05 µl de brometo de etídio e um marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100pb adicionando todo o produto da PCR-HSP70 acrescido de 2 µl de tampão 10x *BlueJuice Gel Loading Buffer* (Invitrogen, Thermo Fisher), comparados com padrões de referências das cepas de *Leishmania* (**quadro 2**, página 49). Para visualização e análise da amplificação e restrição por enzima, foi utilizado fotodocumentador para gel de eletroforese - PIX EX (Loccus, Biotechnology, Cotia, SP).

#### 4.5.4 PCR direcionada aos alvos *alat*, *pgm*, *icd*, *mpi* e *g6pd*

As amostras foram submetidas a PCR com o par de iniciadores direcionados para genes codificadores das enzimas *alat*, *pgm*, *icd*, *mpi* e *g6pd* onde as descrições dos alvos encontram-se no **quadro 5** (página 52). As reações de PCR foram conduzidas conforme protocolo descrito no **quadro 7**, utilizando-se alíquotas de 5,0 µL de DNA de cada amostra. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático de DNA (Veriti Thermal Cycler - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) alternando 35 ciclos conforme pode ser observado no **quadro 8**. O resultado da amplificação foi verificado por meio de gel de agarose, onde a metodologia está descrita no item 4.5.2 (página 53).

Reagente	Concentração	Volume
Tampão ( <i>Buffer 10x</i> )	15mM	2,5µL
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0,75 µL
dNTP mix	10mM	0,5 µL
DMSO	5%	1,2µL
Água Milli-Q (H <sub>2</sub> O livre de DNA e RNA)	-	1,75µL
Tag Polimerase	10u/ul	0,25µL

**Quadro 7** – Descrição dos reagentes utilizados no protocolo da PCR convencional para os iniciadores *alat*, *pgm*, *icd*, *mpi* e *g6pd*.

Fase	Temperatura		Tempo	Temperatura		Tempo	Nº de ciclos
	<i>Alat</i>	<i>Pgm</i>		<i>Mpi</i>	<i>Icd e g6pd</i>		
<b>Desnaturação</b>	95°C	95°C	30 seg.	94°C	94°C	30 seg.	} 35x
<b>Anelamento</b>	60°C	56°C	01 min.	58°C	55°C	01 min.	
<b>Extensão</b>	72°C	72°C	01:30 min.	68°C	68°C	01 min.	
<b>Extensão Final</b>	72°C	72°C	10 min.	68°C	68°C	05 min.	1x

**Quadro 8** – Descrição dos ciclos utilizados na PCR convencional para os iniciadores voltados para os genes codificadores das enzimas *alat*, *pgm*, *icd*, *mpi* e *g6pd*.

#### 4.6 Sequenciamento

Os fragmentos de DNA de aproximadamente 881 pb do *g6pd*, 529 pb do *pgm*, 681 pb do *mpi*, 589 pb do *alat*, 1020 pb do *icd* e de 1300pb do *hsp70*, foram sequenciados através da metodologia empregada por Sanger (1975) pela Plataforma de Sequenciamento de DNA – Unidade Belo Horizonte (Fiocruz/Minas), a fim de identificar possíveis polimorfismos de base única (SNPs), para análise da diversidade genética de *L. braziliensis*. Os produtos de PCR que apresentaram bandas compatíveis com cada iniciador foram purificados com o kit QIAquick® PCR purification kit (Qiagen) segundo instruções do fabricante. Em seguida foi preparada uma mistura contendo 1µL de cada iniciador na concentração de 5,0 pmol/µL, senso e anti-senso, em tubos separados, acrescido de 1µL dos produtos purificados e 6µ de água destilada, totalizando um volume final de 8µL. O programa utilizado foi temperatura inicial de 96° C por 1 minuto, alternando 35 ciclos de desnaturação a 96° C por 15 segundos, anelamento em temperaturas crescentes a partir de 50° C aumentando 1° C por segundo, seguido por passo de extensão a 60° C por 4 minutos. As sequências foram determinadas pelo sequenciador automático de DNA

Sequenciador de DNA - ABI 3730 (Life Technologies - Califórnia, EUA) na Plataforma de Sequenciamento de DNA – BH (Centro De Pesquisa Renné Rachou – Fiocruz Minas).

#### 4.7 Análise das sequências

As sequencias obtidas foram analisadas por meio dos softwares FinchTV 1.4.0 (Geospiza) utilizando conjuntamente o algoritmo online BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) utilizando o parâmetro para sequências altamente similares (*megablast*) onde as sequencias obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). A qualidade das sequências de cada iniciador foram filtradas com índice 10 de qualidade utilizando o algoritmo *Phred* (EWING & GREEN, 1998) para remover regiões de baixa qualidade e de difícil alinhamento, que poderiam prejudicar as análises. Posteriormente, as sequências foram analisadas considerando o índice de identidade quando comparadas a sequências depositadas no banco de dados GenBank, através dos parâmetros utilizados pelo algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), que busca por sequências semelhantes (*hit*). Realizou-se uma filtragem, onde foram mantidas para as análises somente as sequências que apresentaram valores iguais ou superiores a 98% de identidade com o melhor *hit*, em relação a sequências depositadas de *L. braziliensis*, a fim de se obter maior confiabilidade das análises, impossibilitando que as variações observadas não sejam oriundas de degradação de DNA. Além disso, sequências que apresentaram menos de 25% do comprimento do *amplicon* esperado para cada gene, bem como parâmetros de baixa qualidade no eletroferograma (picos mal definidos e pequenos, linha de base indistinguível e distância entre picos anterior e posterior inconstante) não foram incluídas nas análises para que não ocorressem erros de confiabilidade ao serem alinhadas e analisadas.

As sequências de cada amostra/gene que apresentaram os parâmetros de qualidade que foram mencionados anteriormente foram alinhadas localmente, senso e consenso, utilizando o programa Bioedit (*Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP*, [www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit)). Posteriormente as sequencias consenso obtidas foram submetidas a um alinhamento múltiplo utilizando o algoritmo ClustalW (LARKIN et al., 2007) e MUSCLE v3.8 (EDGAR,

2004) através do software UGene UGENE (OKONECHNIKOV, GOLOSOVA & FURSOV, 2012). Foram recuperadas as sequências equivalentes a cada gene referente à *L. Infantum* para serem adicionadas na análise de variabilidade, cujo genoma já foi sequenciado e possui informações disponíveis publicamente.

#### 4.8 Construção e análise dos filogramas

As árvores em formato de filograma foram construídas a partir do alinhamento múltiplo, onde a história evolutiva de cada gene foi inferida pelo método de estimativas de máxima parsimonia (MP), utilizando o algoritmo *Subtree-Pruning-Rerafting* (SPR) (NEI & KUMAR, 2000), através do software MEGA X (KUMAR et al., 2018). Utilizou-se o teste de *bootstrap* para 500 repetições, para observar a porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam. As árvores foram reconstruídas gene por gene para verificar as topologias individuais. Todas as árvores foram editadas pelo programa ITOL (MORARIU et al., 2008) para facilitar a visualização as amostras de cães recebeu a cor azul, de pequenos mamíferos recebeu a cor verde, as amostras de humanos a cor preta, e por fim, as amostras de perfil variante recebe a cor vermelha. Definiu-se como parâmetro para estabelecimento dos *clusters* valores de *bootstrap* superiores a 50%, pois pretende-se observar possíveis relações entre as amostras, afim de estabelecer uma hipótese de diferenciação evolutiva para os diferentes genes estudados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da qualidade e identificação específica das amostras estudadas

Foram obtidas 447 (**quadro 9**) amostras de DNA previamente extraído e identificado como *Leishmania braziliensis*. Apesar do grande número de amostras, somente, 43 (9,62%) amplificaram DNA compatível com *L. braziliensis* através da análise preliminar por PCR-RFLP ITS1. Nove amostras de tecido que inicialmente demonstraram-se negativas para *L. braziliensis* tiveram seu DNA novamente extraído, entretanto, continuaram não amplificando DNA na PCR-RFLP ITS1. Por fim, somente 28 (6,26% em relação ao total de amostras iniciais) se adequaram aos parâmetros mínimos de qualidade estabelecidos para ingresso no estudo.

ID	Hospedeiro	Local	VOL.	ng/ $\mu$ l
58	<i>Canis lupus familiaris</i>	BELO HORIZONTE	0	3,4
59	<i>Canis lupus familiaris</i>	BELO HORIZONTE	0	<0.010
53	<i>Homo sapiens sapiens</i>	BELO HORIZONTE	<60 $\mu$ l	103,07
60	<i>Canis lupus familiaris</i>	BELO HORIZONTE	<60 $\mu$ l	6,93
61	<i>Canis lupus familiaris</i>	BELO HORIZONTE	<60 $\mu$ l	13,75
15	<i>Canis lupus familiaris</i>	BETIM	Ok	107,24
31	<i>Canis lupus familiaris</i>	BETIM	Ok	263
14	<i>Canis lupus familiaris</i>	BETIM	Ok	15,43
33	<i>Canis lupus familiaris</i>	BETIM	Ok	185
32	<i>Canis lupus familiaris</i>	BETIM	Ok	179
19	<i>Rattus rattus</i>	BRUMADINHO	Ok	270,74
20	<i>Rattus rattus</i>	BRUMADINHO	Ok	6,17
29	<i>Rattus rattus</i>	BRUMADINHO	<60 $\mu$ l	61,1
30	<i>Rattus rattus</i>	BRUMADINHO	Ok	66,7
62	<i>Homo sapiens sapiens</i>	BRUMADINHO	<60 $\mu$ l	36,91
4	<i>Cerradomys subflavus</i>	CARAÇA	Ok	17,22
21	<i>Cerradomys subflavus</i>	CARAÇA	OK	400,63
5	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	<60 $\mu$ l	<0.010
9	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	Ok	9,4
23	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	<60 $\mu$ l	59
24	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	<60 $\mu$ l	788,88
6	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	Ok	7,4
25	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	<60 $\mu$ l	453,45
7	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	Ok	22,8
22	<i>Akodon cursor</i>	CARAÇA	Ok	55,7
8	<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	CARAÇA	Ok	8,92
26	<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	CARAÇA	<60 $\mu$ l	804,76
40	<i>Didelphis albiventris</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	109
41	<i>Trychomys apereoides</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	49,89
42	<i>Trychomys apereoides</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	0,95
10	<i>Trychomys apereoides</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	3,87
11	<i>Trychomys apereoides</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	15,6
12	<i>Trychomys apereoides</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	4,31
13	<i>Trychomys apereoides</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	34,36
27	<i>Homo sapiens sapiens</i>	XAKRIABÁ	<60 $\mu$ l	44,31
36	<i>Homo sapiens sapiens</i>	XAKRIABÁ	Ok	12,98

**Quadro 9** – Demonstração representativa das amostras analisadas quanto aos parâmetros utilizados no presente estudo. Legenda: ID – identificação da amostra; VOL. – volume. < - inferior ao

valor/volume descrito juntamente do símbolo; Ok – amostras com volume igual ou superior ao mínimo estabelecido (60 µl).

As amostras utilizadas neste estudo foram caracterizadas como *L. braziliensis* em estudos prévios através da técnica de PCR-RFLP utilizando o alvo *hsp70* ou através da técnica de MLEE. Para fins de confiabilidade, todas as amostras foram novamente submetidas à PCR-RFLP dirigida ao alvo ITS1 e ao alvo *hsp70*, com iniciadores específicos descrito na metodologia.

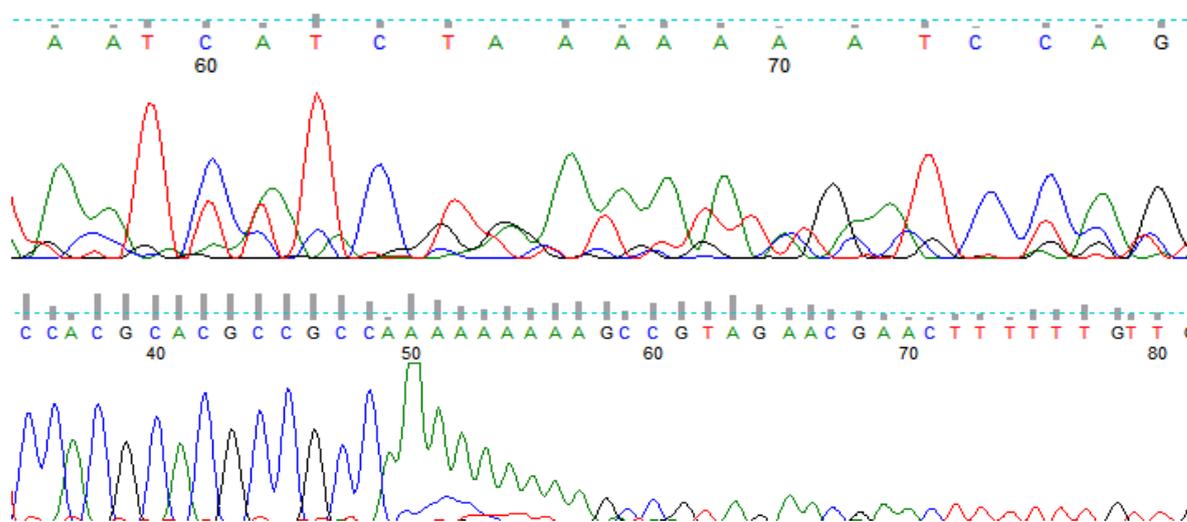
### 5.1.1 PCR-RFLP ITS1

As 447 amostras foram inicialmente submetidas à técnica de PCR dirigida ao alvo da região não-codificante ITS1, onde somente 28 amostras foram amplificadas gerando um fragmento de aproximadamente 300-350pb e apresentaram qualidade mínima compatível com os requisitos para participação no estudo, descrita na metodologia. Posteriormente estas amostras foram submetidas RFLP, utilizando a enzima *HaeIII*, onde os resultados obtidos foram observados através de eletroforese em gel agarose à 3%. Todas as amostras apresentaram perfil de restrição semelhante ao perfil de *L. braziliensis*, enquanto, excepcionalmente, a amostra 34 apresentou perfil semelhante ao de *L. guyanensis* (**figura 5**).



**Figura 5** – Fotografia representativa do gel de agarose a 3% do fragmento do gene ITS1 após digestão enzimática. Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; 30 a 38 – cepas do grupo amostral; cepa referência L.b - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); cepa referência L.i - *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência L.a - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); cepa referência L.g - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CN– controle negativo.

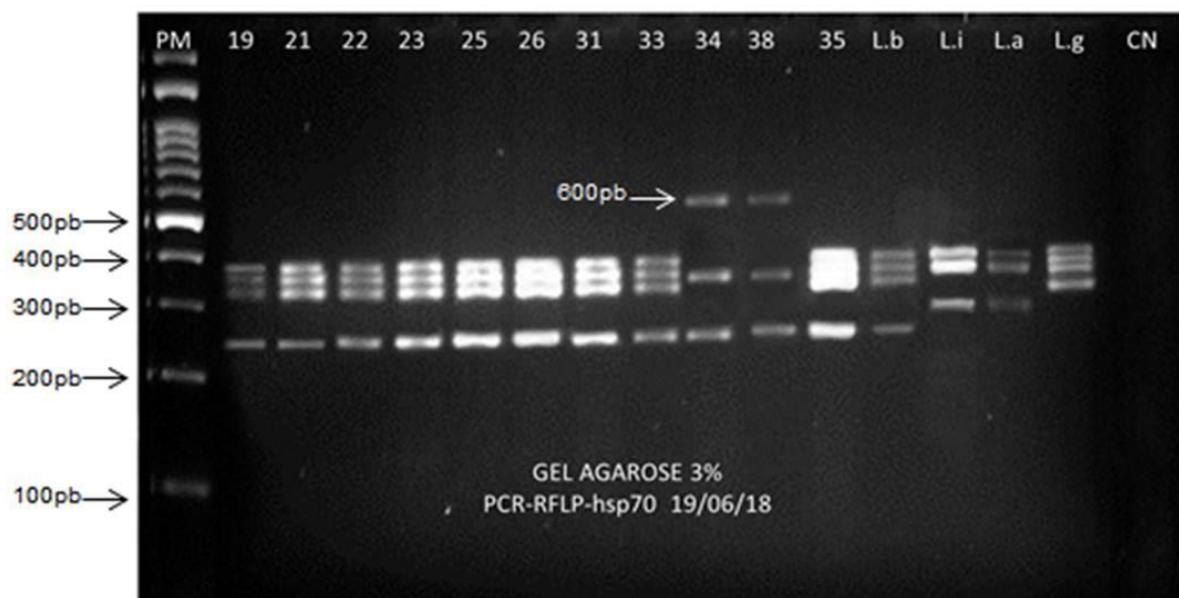
O fragmento gerado na PCR do ITS1 foi sequenciado a fim de auxiliar na caracterização genética deste parasito. Todas as sequências obtidas foram editadas, analisadas, e identificadas a partir da ferramenta online BLASTn como *L. braziliensis*, inclusive a amostra 34. No entanto, ao analisarmos os eletroferogramas (figura 6) e o comprimento das sequências, as mesmas apresentaram baixo índice de qualidade, o que as tornaram inadequadas para serem utilizadas nas análises posteriores, como pesquisa de variabilidade e análise da história evolutiva do gene por filograma.



**Figura 6** - Imagens representativas do eletroferograma de fragmentos amplificados do gene ITS1.

### 5.1.2 PCR-RFLP-*hsp70*

Os iniciadores voltados para o gene *hsp70* amplificaram um fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases (pb) em todas as 28 amostras incluídas no estudo. Posteriormente, os produtos amplificados foram submetidos à restrição enzimática pela enzima *HaeIII*. Os resultados obtidos da PCR-RFLP-*hsp70* observado através de eletroforese em gel agarose 3% das amostras utilizadas neste estudo encontram-se na **figura 7**.



**Figura 7** – Fotografia representativa do gel de agarose a 3% do fragmento do gene *hsp70* após digestão enzimática. Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; 19 a 38 – cepas do grupo amostral; cepa referência L.b - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); cepa referência L.i - *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência L.a - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); cepa referência L.g - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CN– controle negativo.

Os perfis de restrição apresentados das amostras originárias de diferentes regiões de Minas Gerais foram idênticos àquele observado para a cepa de referência da espécie *L. braziliensis*. Entretanto, as amostras 34 e 38 (**figura 7**), provenientes da Terra Indígena Xakriabá exibiram perfis variantes, com três bandas, onde a primeira apresenta aproximadamente 620pb, diferentes do esperado para a espécie *L. braziliensis* como também para outras espécies de *Leishmania* utilizadas como controle.

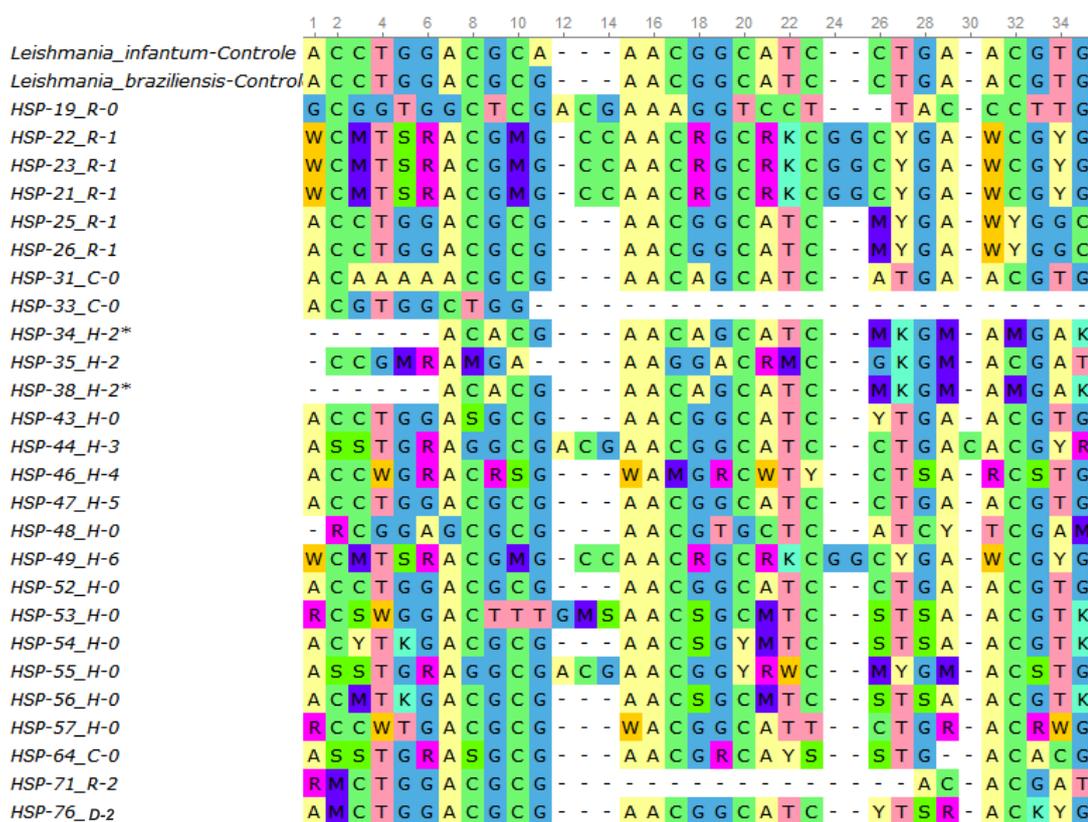
## 5.2 Análise do gene *hsp70*

Os produtos da PCR-*hsp70* de aproximadamente 1300pb de todas as amostras foram sequenciados, com intuito de identificar a presença de regiões variantes ao longo do mesmo, bem como para compor o filograma. As sequências apresentaram, em média, 500pb o equivalente a 38,46% de cobertura do *amplicon* esperado para o gene (1300pb). Estas foram comparadas frente às sequências depositadas no GenBank a partir do algoritmo BLASTn, sendo confirmadas novamente a identificação como *L. braziliensis* e obtendo-se identidade igual ou superior a 98%

com outras sequências depositadas em outros estudos, para a espécie *L. braziliensis*.

### 5.2.1 Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene *hsp70*

As sequências obtidas para *hsp70* foram alinhadas no software UGene para identificar posições variantes do conjunto de sequências em relação as cepas referência de *L. braziliensis* e *L. infantum* e avaliar a relação evolutiva das amostras para o gene *hsp70*. O alinhamento representativo das amostras pode ser observado na **figura 8**. Das 28 amostras, foram incluídos na análise 26. A amostra 51, oriunda de um humano proveniente de João Pinheiro, e 45, amostra de humano de oriunda de Jaboticatubas (RMBH) foram excluídas das análises para este gene, pois não apresentaram comprimento e qualidade da sequência suficiente para ser alinhada com as demais amostras.



**Figura 8** - Alinhamento múltiplo representativo das sequências do gene *hsp70* das amostras estudadas. Legenda: HSP – *hsp70*; H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

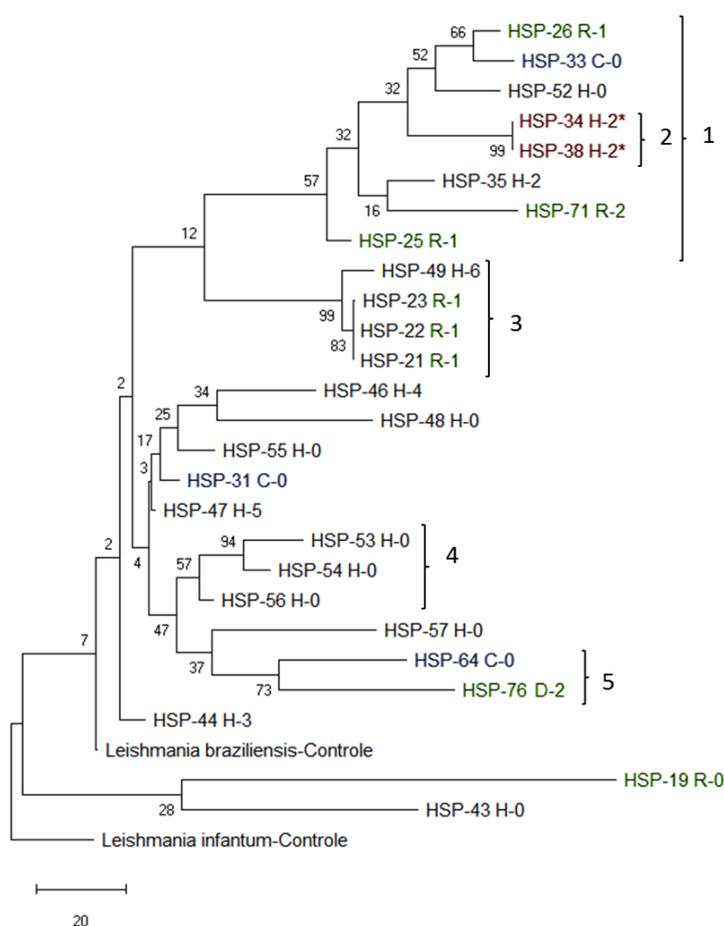
No alinhamento das sequências foi observado alto número de divergências entre as amostras, com diversas posições apresentando nucleotídeos variantes e ambiguidades ao longo de todas as sequências analisadas, apresentando uma média de 82 posições com nucleotídeos variantes e 32 posições com ambiguidades de nucleotídeos, como pode ser observado na **tabela 2**.

Amostras	Variantes	Amb.
HSP-19	77	44
HSP-22	84	34
HSP-21	80	38
HSP-23	84	34
HSP-25	81	29
HSP-26	74	40
HSP-31	106	0
HSP-33	74	40
HSP-34	77	36
HSP-35	77	36
HSP-38	78	36
HSP-43	74	37
HSP-44	81	35
HSP-46	81	39
HSP-47	106	0
HSP-48	77	39
HSP-49	84	34
HSP-52	74	40
HSP-53	84	31
HSP-54	78	31
HSP-55	91	16
HSP-56	96	13
HSP-57	82	31
HSP-64	77	42
HSP-71	79	33
HSP-76	82	36
Total	2138	824
Média	82	32

**Tabela 2** - Quantidade de posições com nucleotídeos variantes e ambíguos por amostra estudada, através da análise do alinhamento múltiplo do gene *hsp70*. Legenda: Amb. – ambiguidade; Variantes – quantidade de posições que apresentaram nucleotídeos variantes em comparação com a sequência de *L. braziliensis*.

A árvore filogenética para gene *hsp70* foi construída com o intuito de compreender as dinâmicas evolutivas deste gene entre os diferentes hospedeiros e localidades das amostras, podendo ser analisada na **figura 9**. Observa-se que os ramos principais apresentaram baixo valor de suporte, onde as amostras foram distribuídas em cinco grupos. O primeiro grupo reuniu as amostras independentes dos hospedeiros bem como das áreas de origem (Caraça, RMBH e Xakriabá). Dentro deste grupo, formou-se um *cluster* das amostras de perfil variante (34 e 38) oriundas de humanos do Xakriabá, com valor de suporte (*bootstrap*) de 99%. Além

disso, *cluster* 4 agrupou algumas amostras de humanos oriundas RMBH. Já o *cluster* 5 agrupou hospedeiros não humanos 64 e 76, de regiões geográficas distintas, RMBH e Xakriabá, respectivamente. Contudo, o *cluster* 3, apesar de agrupar 3 pequenos mamíferos silvestres, de mesma localidade (Caraça), também incluiu um indivíduo humano de uma localidade distinta (Rio Vermelho). As amostras 43 e 19, oriundas de humano e roedor, respectivamente, da RMBH, ficaram isoladas das demais amostras, mais próximas do *outgroup* *L. infantum*.

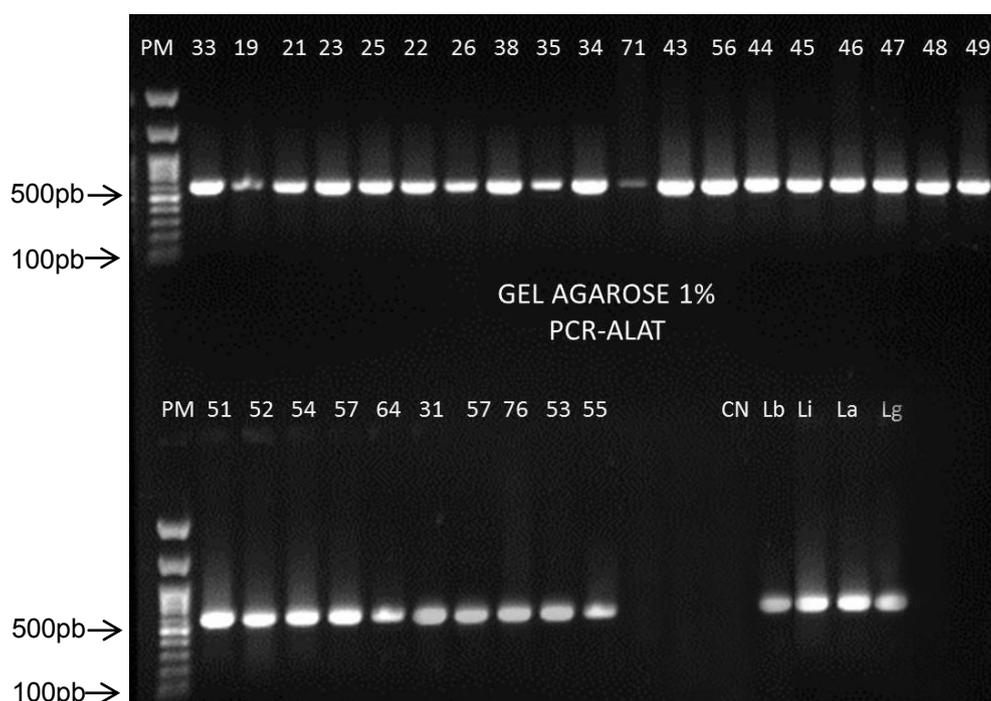


**Figura 9** - Árvore filogenética enraizada utilizando seqüências obtidas do marcador *hsp70*, em conjunto com seqüências de *L. braziliensis* e *L. infantum* como referência, recuperadas do banco de dados GenBank. Legenda: HSP – *hsp70*; H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

### 5.3 Análises do gene *alat*

#### 5.3.1 PCR-*Alat*

A amplificação do gene *alat* através de PCR foi seguida de posterior corrida em gel de agarose a 1%, onde foi avaliada a capacidade de amplificação do gene para as amostras e as espécies de *Leishmania* referência utilizadas como controle (**figura 10**). Observou-se que todas amostras foram amplificadas gerando um produto de aproximadamente 600pb.



**Figura 10** – Fotografia do gel de agarose a 1% do fragmento do gene *alat*. Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; 19 a 76 – cepas do grupo amostral; cepa referência Lb - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); cepa referência Li - *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência L. - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); cepa referência Lg - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CN– controle negativo.

#### 5.3.2 Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene *alat*

O produto da PCR-*Alat* foi destinado a sequenciamento genético a fim de avaliar a existência de nucleotídeos variantes e relação evolutiva das amostras. As sequências apresentaram, em média, 580pb o equivalente a 98,47% de cobertura do *amplicon* esperado para o gene (589pb). As sequências obtidas foram alinhadas no software UGene, e comparadas com sequências depositadas no GenBank a

partir do algoritmo BLASTn, sendo confirmadas novamente a identificação como *L. braziliensis* para todas as amostras e obtendo identidade/similaridade igual ou superior a 98% com as sequências depositadas em outros estudos.



**Figura 11** – Alinhamento múltiplo representativo das sequências do gene *alat* das amostras. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante. As setas em vermelho representa exemplo de posições onde ocorreram variações em nucleotídeos em comparação a amostra de *L. braziliensis* utilizada como referência.

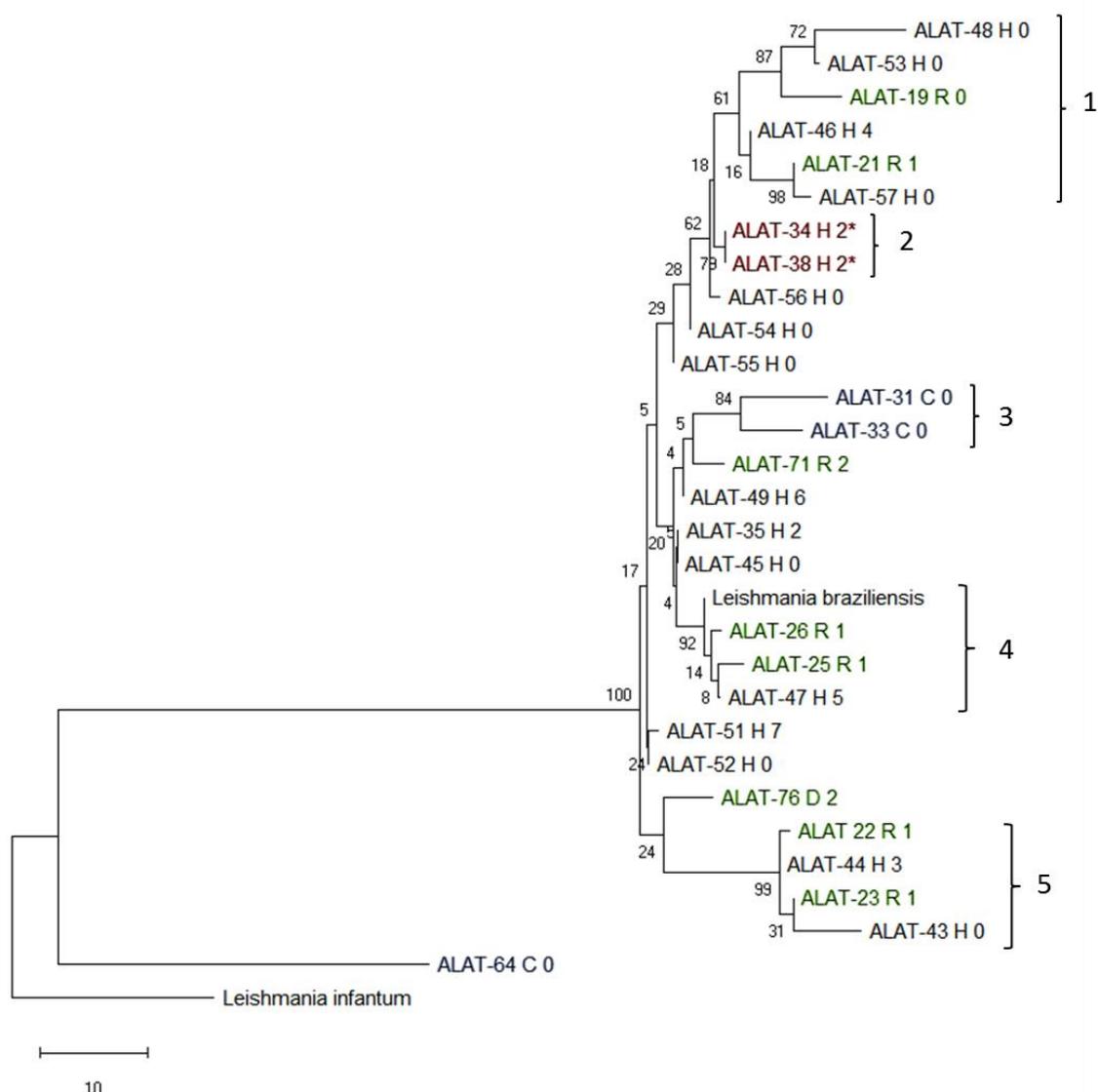
Na análise do alinhamento múltiplo verificou-se a existência de, pelo menos uma, variabilidade de nucleotídeos ao comparar com a cepa referência de *L. braziliensis* em todas as amostras analisadas para o fragmento de gene *alat*. Ao todo, foram contabilizados 188 variações em posições distintas do sequenciamento genético, contudo, de forma mais homogênea entre as amostras, com uma média de sete nucleotídeos variantes por amostra, como pode ser avaliado na **figura 11**. Além disso, foram verificados 137 posições com ambiguidades (média de cinco por

amostra) em posições diversas em 15 das 28 amostras (**tabela 3**). A ocorrência de ambiguidades foi homogenia ao longo de todas as sequências.

Amostras	Variante	Amb.
19 R0	14	8
21 R1	8	4
22 R1	11	2
23 R1	11	1
25 R1	7	3
26 R1	6	6
31 C0	12	7
33 C0	10	9
34 H2*	4	3
35 H2	3	2
38 H2*	4	3
43 H0	15	2
44 H3	10	1
45 H0	3	2
46 H4	5	3
47 H5	6	1
48 H0	16	1
49 H6	3	1
51 H7	2	22
52 H0	2	2
53 H0	6	4
54 H0	2	2
55 H0	3	2
56 H0	5	3
57 H0	7	1
64 C0	3	28
71 R2	4	5
76 D2	6	9
Total	188	137
Média	7	5

**Tabela 3** – Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas quanto ao gene *alat*. Legenda: Amb. – ambiguidade ; Variantes – posições onde ocorreram nucleotídeos variantes; H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

Para a análise da relação evolutiva entre as amostras amplificadas para o gene *alat*, foi confeccionada uma árvore filogenética no formato de filograma, através do software MEGA X. As amostras analisadas foram agrupadas juntamente com o controle de *L. braziliensis*, com suporte de 100%, onde somente a amostra 64 apresentou-se isolada das demais, juntamente com *outgroup* de controle, *L. infantum* (**figura 12**). Para este gene, ocorreu a formação de 5 *clusters*. No primeiro *cluster*, no quarto e quinto, a amostras foram agrupadas sem distinção da localidade de origem, contendo amostras oriundas de roedores e de humanos. Do mesmo modo como ocorreu na árvore para o gene *hsp70*, as amostras 34 e 38 ficaram agrupadas em um clado distinto (2). Contudo, observa-se que o *cluster* 3 agrupou somente hospedeiros caninos, pertencentes de uma mesma localidade.



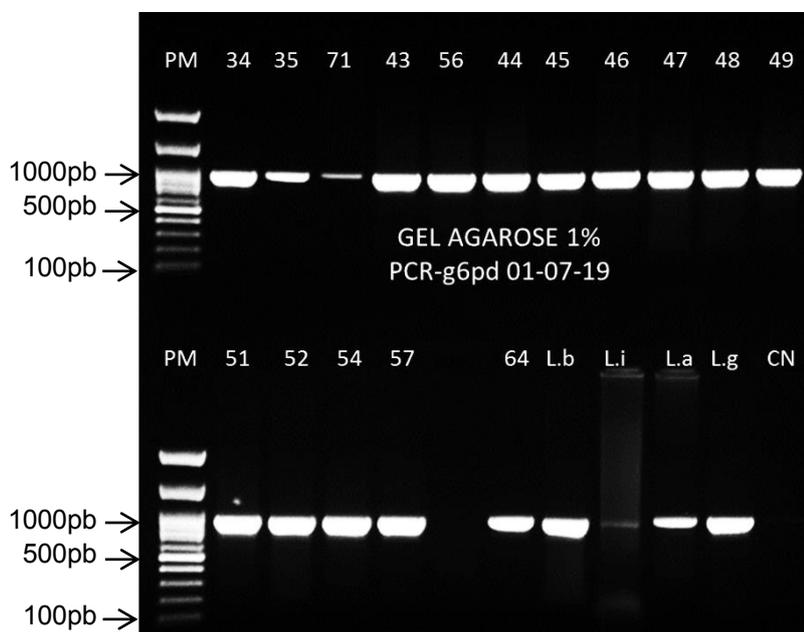
**Figura 12** - Árvore filogenética (filograma) enraizada utilizando sequências obtidas do marcador *alat*, em conjunto de sequências de *L. braziliensis* e *L. infantum* como referência recuperadas do banco de dados GenBank. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

## 5.4 Análises do gene *g6pd*

### 5.4.1 PCR-G6pd

Na reação de PCR dirigida ao alvo *g6pd*, os perfis do produto da amplificação obtidos nas amostras, originárias de diferentes regiões de Minas Gerais, foram

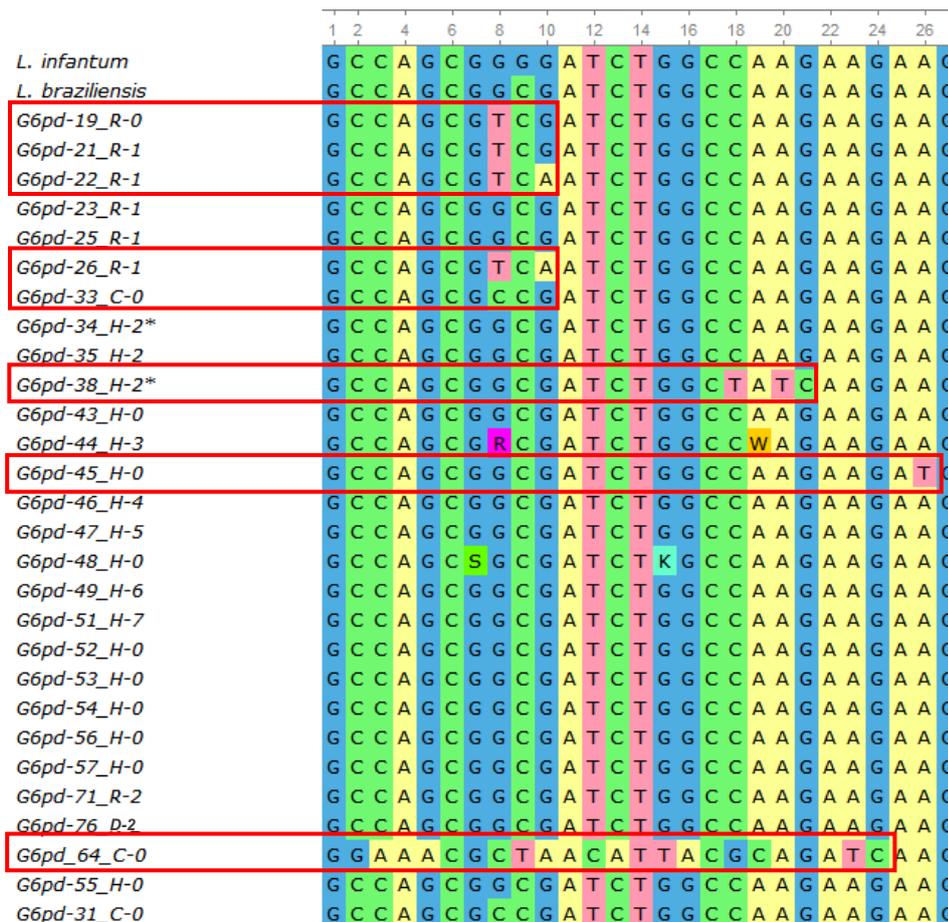
idênticos àquele observado para a cepa de referência da espécie *L. braziliensis* (**figura 13**), com aproximadamente 900pb.



**Figura 13** – Fotografia representativas do gel de agarose a 1 % das amostras amplificadas para o gene *g6pd*. Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100pb; 34 a 57 – cepas do grupo amostral; cepa referência L.b - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); cepa referência Li - *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência L.a - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); cepa referência L.g - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CN– controle negativo.

#### 5.4.2 Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene *g6pd*

O produto da PCR-G6pd foi utilizado para sequenciamento genético com intuito de verificar a ocorrência de nucleotídeos variantes e relação evolutiva das amostras. As sequências obtidas apresentaram, em média, 700pb, cobrindo 79,45% do *amplicon* esperado para o gene (881pb). Todas as amostras estudadas foram sequenciadas e alinhadas no software UGene, e comparadas com sequências depositadas no GenBank a partir do algoritmo BLASTn, sendo confirmadas novamente a identificação como *L. braziliensis* para todas as amostras e obtendo identidade/similaridade igual ou superior a 98% com as sequências depositadas. A imagem representativa do alinhamento pode ser observada na **figura 14**.



**Figura 14** – Imagem representativa do alinhamento múltiplo do fragmento amplificado do gene *g6pd*.  
 Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.  
 As amostras destacadas com retângulo vermelho são representações das amostras que demonstram a ocorrência de nucleotídeos variantes em posições variadas.

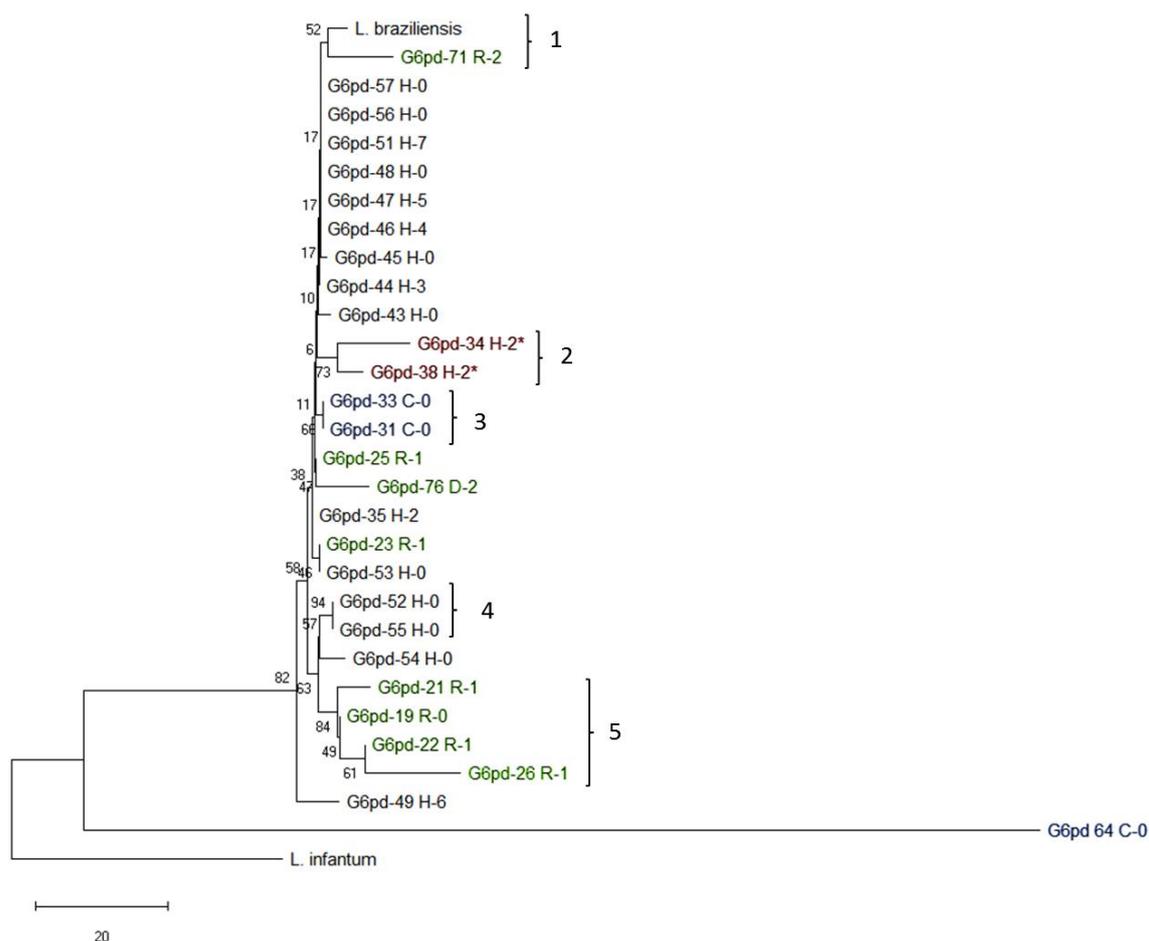
Na análise do alinhamento múltiplo verificou-se a existência de, pelo menos um nucleotídeo variante em todas as amostras analisadas para o fragmento de gene *G6pd*. Ao todo, foram identificados 204 nucleotídeos variantes em posições diversas das sequências, com uma média sete por amostra (**tabela 4**). Além disso, foi identificado um alto número de ambiguidades em posições diversas em todas as amostras, com uma média de 25 por amostra, onde o somatório de todas as ambiguidades totalizou 710.

Amostras	Variante	Amb.
G6pd19 R0	3	7
G6pd21 R1	8	9
G6PD-22 R1	5	9
G6PD-23 R1	1	13
G6PD-25 R1	0	16
G6PD-26 R1	21	2

G6PD-33 C 0	0	17
G6PD-34 H2*	7	92
G6PD-35 H2	0	60
G6PD-38 H2*	3	11
G6PD-43 H0	2	50
G6PD-44 H3	0	54
G6PD-45 H0	1	19
G6PD-46 H4	0	21
G6PD-47 H5	0	17
G6PD-48 H0	0	17
G6PD-49 H6	1	5
G6PD-51 H7	0	27
G6PD-52 H0	4	24
G6PD-53 H0	1	22
G6PD-54 H0	2	51
G6PD-56 H0	0	23
G6PD-57 H0	0	9
G6PD-71 R2	9	42
G6PD-76 D2	5	30
G6PD- 64 C0	113	26
G6PD-55 H0	18	13
G6PD-31 C0	0	24
<b>Total</b>	<b>204</b>	<b>710</b>
<b>Média</b>	<b>7</b>	<b>25</b>

**Tabela 4** – Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas na análise do alinhamento múltiplo do fragmento do gene *g6pd*. Legenda: Amb. – ambiguidade ; Variantes – posições onde ocorreram nucleotídeos variantes; H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante

Para a análise da relação evolutiva entre as amostras amplificadas para o gene *g6pd*, foi confeccionado um filograma. Para este gene foram formados 4 *clusters*, reunidos em um grupo em comum juntamente com a referência de *L. braziliensis*, com suporte de 82% (**figura 15**). Da mesma forma como foi observado no filograma do gene *alat*, a amostra 64 permaneceu isolada das demais juntamente com o *outgroup*. No *cluster 1* a amostra 71 de roedor proveniente da Reserva Indígena do Xakriabá foi agrupada com a amostra controle de *L. braziliensis*. Os *clusters 2* e 4 agruparam apenas duas amostras oriundas de humanos em cada um deles, onde o *cluster 2* novamente permaneceu agrupadas as amostras variantes oriundas do Xakriabá, e o *cluster 4* as amostra são da mesma localidade, Santa Luzia (RMBH). O *cluster 5* agrupou somente amostras oriundas de pequenos mamíferos, de localidades diferentes (RMBH e RPPNSC). Já no *cluster 3*, também como ocorreu para o gene *alat*, duas amostras oriundas de cães de uma mesma localidade mantiveram-se juntas.

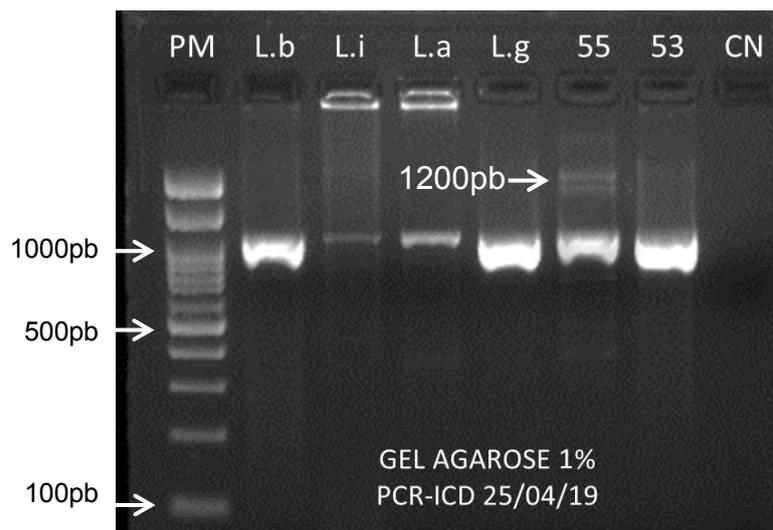


**Figura 15** - Árvore filogenética (filograma) enraizada utilizando sequências obtidas do marcador *g6pd*, em conjunto de sequências de *L. braziliensis* e *L. infantum* como referência recuperadas do banco de dados GenBank. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

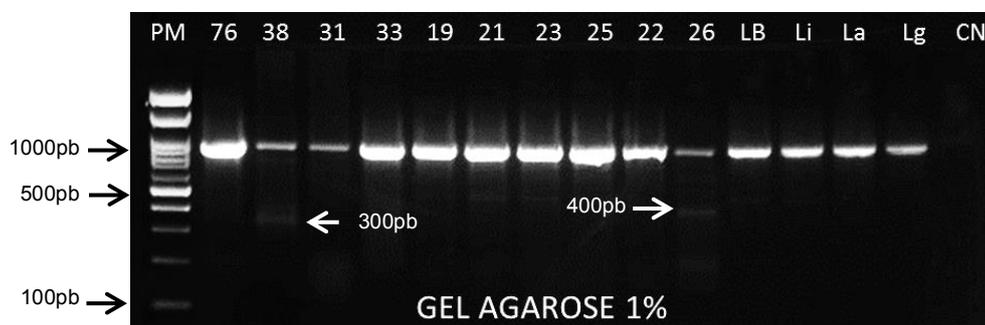
## 5.5 Análises do gene *icd*

### 5.5.1 PCR-*Icd*

A amplificação do gene *icd* através de PCR foi seguida de posterior corrida em gel de agarose a 1%, onde foi avaliada a capacidade de amplificação do gene na para as amostras e as espécies de *Leishmania* referência utilizadas como controle. Observou-se que todas as 28 amostras foram amplificadas gerando uma banda de aproximadamente 1000pb. Entretanto, as amostras 26, 38 55 apresentaram um padrão divergente de banda, conforme pode ser observado nas figuras 15 e 16.



**Figura 16** – Fotografia do gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados do gene *icd*. Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; 55 e 53 – cepas do grupo amostral; cepa referência L.b - *L. braziliensis*(MHOM/BR/75/M2903); cepa referência L.i -*L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência L.a - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); cepa referência L.g - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CN– controle negativo.

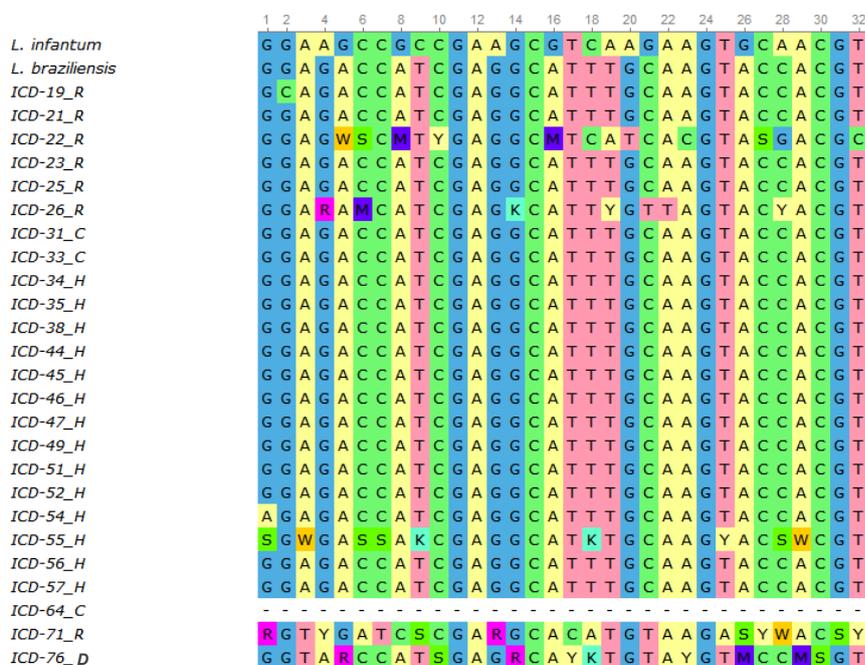


**Figura 17** – Fotografia do gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados do gene *icd*. Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; 19 a 76 – cepas do grupo amostral; cepa referência L.b - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); cepa referência L.i -*L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência L.a - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); cepa referência L.g - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CN– controle negativo.

A amostra 55 apresentou duas bandas, uma a aproximadamente 1200pb outra a 1000pb (figura 16). Já as amostras 38 e 26 apresentaram, além da banda de aproximadamente 1000pb, apresentaram também uma segunda banda a 300pb e 400pb, respectivamente (figura 17).

### 5.5.2 Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene *icd*

Os produtos obtidos da PCR voltada ao fragmento do gene *icd* foram sequenciados com intuito de verificar a ocorrência de nucleotídeos variantes e relação evolutiva das amostras. As sequências apresentaram, em média, 740pb o equivalente a 72,41% do *amplicon* esperado para o gene (1022pb). As amostras estudadas foram sequenciadas e comparadas com sequências depositadas no GenBank a partir do algoritmo BLASTn, sendo confirmadas novamente a identificação como *L. braziliensis*. Contudo, as amostra de número 43 e 48 foram excluídas desta análise por não apresentarem comprimento e qualidade da sequência suficiente para ser alinhadas com as demais sequências. A imagem representativa do alinhamento pode ser observada na **figura 18**.



**Figura 18-** Imagem representativa do alinhamento múltiplo do fragmento amplificado do gene *icd*.  
 Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – CARAÇA; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante

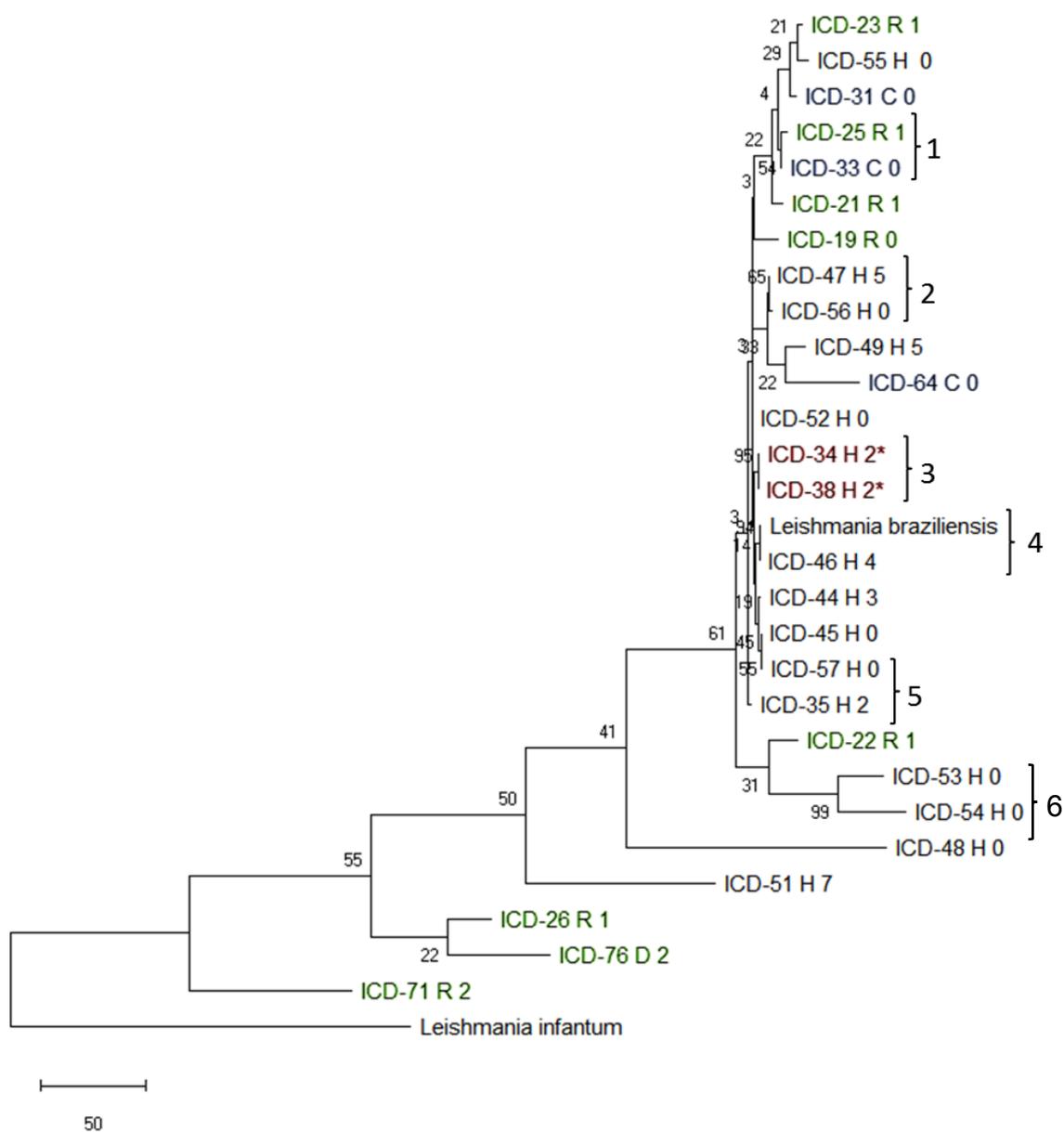
Ao avaliar o alinhamento múltiplo observou-se que todas as amostras apresentaram ao menos um nucleotídeo variante ao longo da sequência, totalizando 170 pontos de nucleotídeos variantes somando todas as amostras, com uma média de sete por mostra (**tabela 5**). O mesmo ocorreu para ambiguidades, onde foi identificado um alto valor total de 924, ao contabilizar a presença em todas as

amostras, com uma média de 36 por amostra. A amostras 64 proveniente de um canídeo, apresentou um grande comprimento de *gap*, em relação as cepas de referência.

Amostras	Variante	Amb.
ICD-19 R 0	3	11
ICD-21 R 1	3	11
ICD-22 R 1	1	112
ICD-23 R 1	4	12
ICD-25 R 1	4	13
ICD-26 R 1	17	43
ICD-31 C 0	3	6
ICD-33 C 0	3	12
ICD-34 H 2*	3	14
ICD-35 H 2	3	38
ICD-38 H 2*	3	10
ICD-44 H 3	4	8
ICD-45 H 0	3	16
ICD-46 H 4	3	4
ICD-47 H 5	3	19
ICD-49 H 6	4	7
ICD-51 H 7	31	70
ICD-52 H 0	3	9
ICD-53 H 0	10	20
ICD-54 H 0	8	68
ICD-55 H 0	2	94
ICD-56 H 0	3	10
ICD-57 H 0	3	12
ICD-64 C 0	23	119
ICD-71 R 2	11	122
ICD-76 D 2	12	64
TOTAL	170	924
Média	7	36

**Tabela 5** – Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades por amostra estudada no sequenciamento do alvo *icd*. Legenda: Amb. – ambiguidade ; Variante – nucleotídeos variantes; H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – CARAÇA; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante

As amostras amplificadas para o gene *icd* foram utilizadas para a realização de um filograma, afim de possivelmente analisar a relação evolutiva entre elas. Na árvore obtidas (**figura 19**), foi possível identificar 6 *clusters*, onde o *cluster* 1 agrupou uma amostra de roedor (25) e uma de cão (33). Os *clusters* 2, 3, 5 e 6 agruparam somente duas amostras oriundas de hospedeiros humanos, em cada. Os *clusters* 5 e 6 agruparam amostras pertencentes a RMBH, porém são provenientes de diferentes municípios (53-Betim, 54-Sabará, 45-Jaboticatuba, 57-Ribeirão das Neves. O *cluster* 2 (56-Lagoa Santa, RMBH e 47-Caratinga). Especialmente o *cluster* 3 agrupou, novamente, as amostras variantes do Xakriabá. Por fim, o *cluster* 4 agrupo uma amostra de humano (46) juntamente com a amostra controle de *L. braziliensis*.

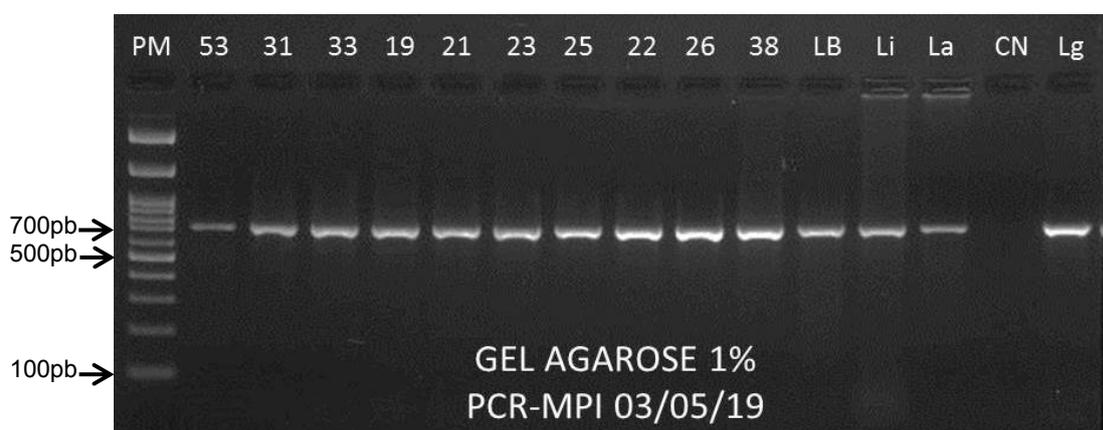


**Figura 19** - Árvore filogenética (filograma) enraizada utilizando sequências obtidas do gene *icd*, em conjunto de sequências de *L. braziliensis* e *L. infantum* como referência recuperadas do banco de dados GenBank. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

## 5.6 Análises do gene *mpi*

### 5.6.1 PCR-Mpi

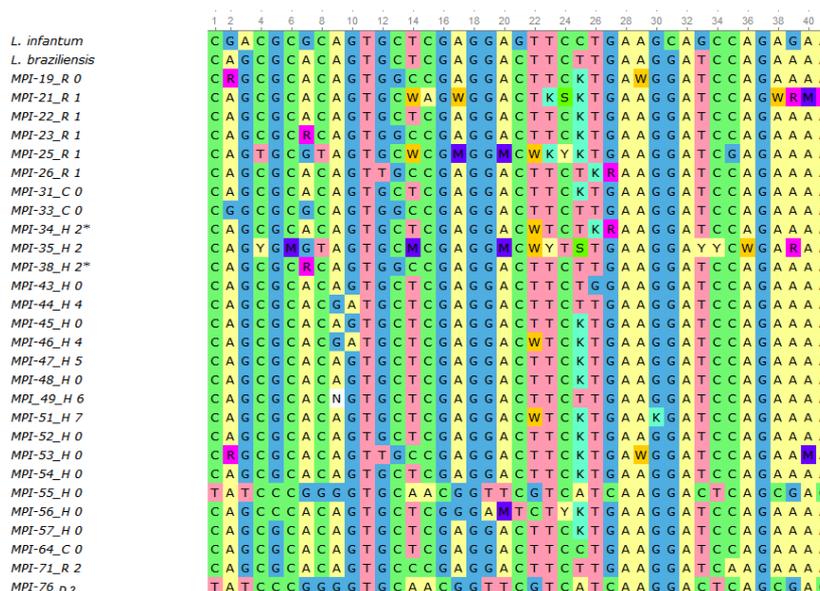
Realizou a amplificação das amostras para o alvo *mpi* através de PCR, e posteriormente, através de eletroforese em gel de agarose à 1%, onde foi avaliado a capacidade de amplificação do gene para as amostras e as espécies de *Leishmania* referência utilizadas como controle (**figura 20**). Todas as 28 amostras foram amplificadas gerando uma banda de aproximadamente 700pb.



**Figura 20** – Imagem representativa das fotografias obtidas do gel de agarose a 1% dos fragmentos amplificados para o alvo *mpi*. Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; 19 a 53 – cepas do grupo amostral; cepa referência LB - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); cepa referência Li - *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência La - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); cepa referência Lg - *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); CN– controle negativo.

### 5.6.2 Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene *Mpi*

Os produtos obtidos da PCR voltada ao fragmento do gene *mpi* foram sequenciadas com intuito de verificar a ocorrência de nucleotídeos variantes e relação evolutiva das amostras. As amostras estudadas foram sequenciadas e comparadas com sequências depositadas no GenBank a partir do algoritmo BLASTn, sendo confirmadas novamente a identificação como *L. braziliensis*. A imagem representativa do alinhamento pode ser observada na **figura 21**. As sequências obtidas apresentaram, em média, 520pb, cobrindo 76,36% do *amplicon* esperado para o gene (681pb).



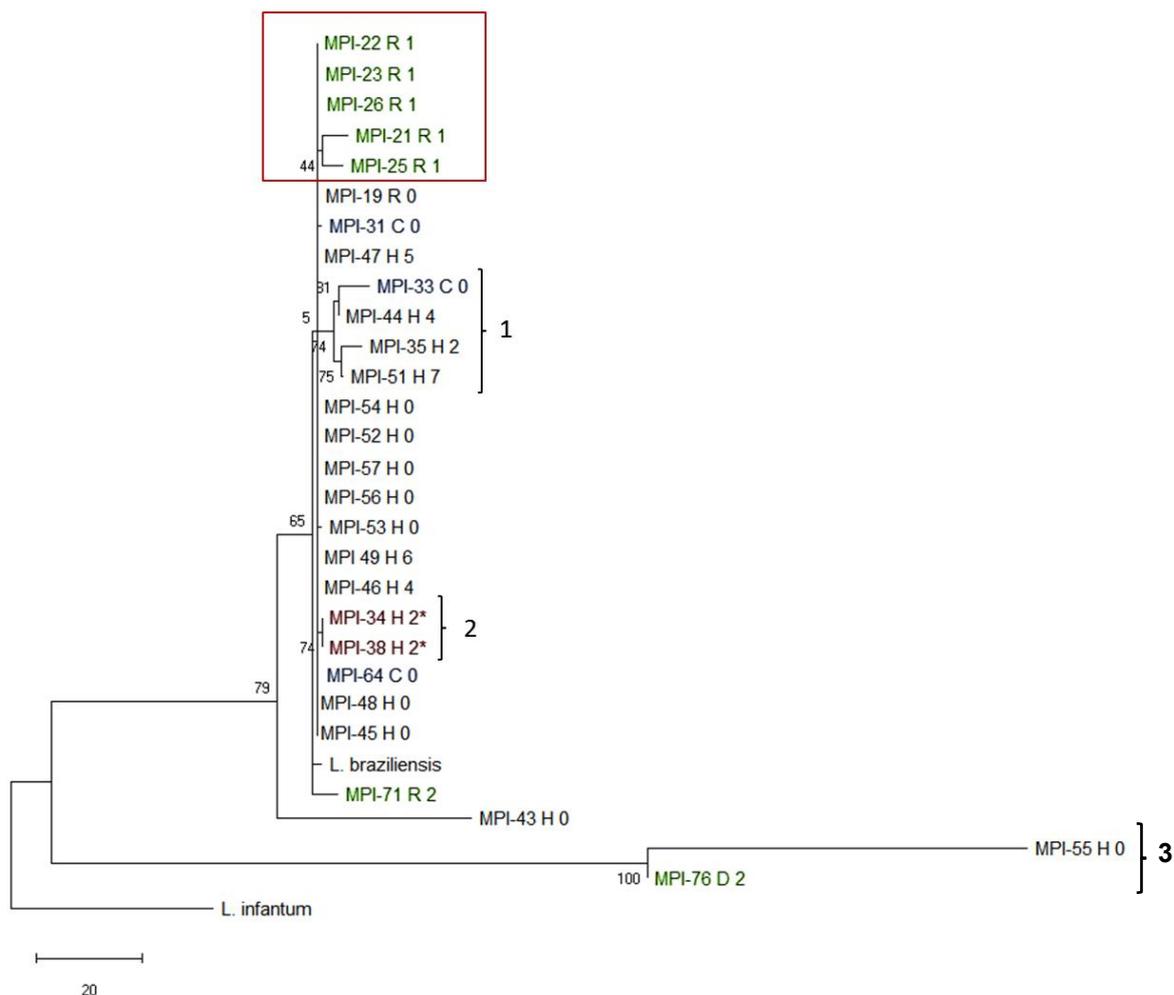
**Figura 21** – Imagem representativa do alinhamento múltiplo das sequências obtidas para o fragmento do gene *mpi*. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – CARAÇA; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

O alinhamento múltiplo foi analisado verificando que todas as amostras apresentaram ao menos um nucleotídeo variante ao longo da sequência, onde foi identificado um alto valor total de 386 pontos de nucleotídeos variantes somando todas as amostras (**tabela 6**). A amostra 55 proveniente de um humano da RMBH apresentou número mais elevado, 202 polimorfismos somado para todas as amostras, com uma média de 14 por amostra. Quanto a ambiguidades, os valores foram menores, apresentando um valor total de 94, ao contabilizar a presença em todas as amostras, com média de três por amostra.

Amostras	Variante	Amb.
MPI-19 R 0	1	7
MPI-21 R 1	5	9
MPI-22 R 1	1	2
MPI-23 R 1	1	3
MPI-25 R 1	4	2
MPI-26 R 1	3	7
MPI-31 C 0	1	1
MPI-33 C 0	8	2
MPI-34 H 2*	1	5
MPI-35 H 2	7	4
MPI-38 H 2*	1	3
MPI-43 H 0	44	2
MPI-44 H 4	4	1
MPI-45 H 0	2	2
MPI-46 H 4	3	2
MPI-47 H 5	2	3
MPI-48 H 0	5	1
MPI 49 H 6	2	1
MPI-51 H 7	5	2
MPI-52 H 0	2	1
MPI-53 H 0	2	2
MPI-54 H 0	1	0
MPI-55 H 0	202	2
MPI-56 H 0	6	3
MPI-57 H 0	6	2
MPI-64 C 0	6	1
MPI-71 R 2	19	22
MPI-76 D 2	42	2
Total	386	94
Média	14	3

**Tabela 6** - Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas e amplificadas para o alvo *mpi*. Legenda: Amb. – ambiguidade ; Variante nucleotídeos variantes; H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante

Para a análise da relação evolutiva entre as amostras amplificadas para o gene *mpi*, foi confeccionado uma árvore filogenética no modelo filograma. Ocorreu a formação de diferentes agrupamentos (*clusters*), onde a maior parte das amostras foi agrupada com a amostra controle de *L. braziliensis* obtendo um suporte de 79%, com exceção das amostras 55 e 76 (**figura 22**), de humano e marsupial respectivamente, que se agruparam e ficaram mais próximas do *outgroup* *L. infantum*, formando o cluster 3. Além disso, formou-se dois clusters, sendo que no primeiro ocorreu a junção de amostras de humanos e cães de localidades divergentes. Contudo, ocorreu novamente a separação das amostras variantes (34 e 38), em um cluster específico (2).

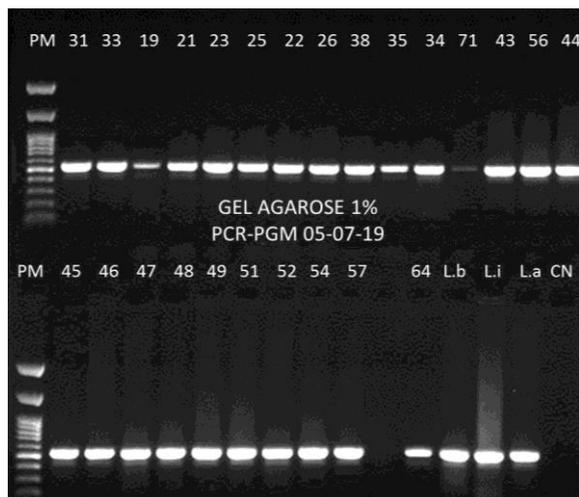


**Figura 22** – Filograma obtido das sequências da amplificação do gene *mpi*. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

## 5.7 Análises do gene *pgm*

### 5.7.1 PCR-Pgm

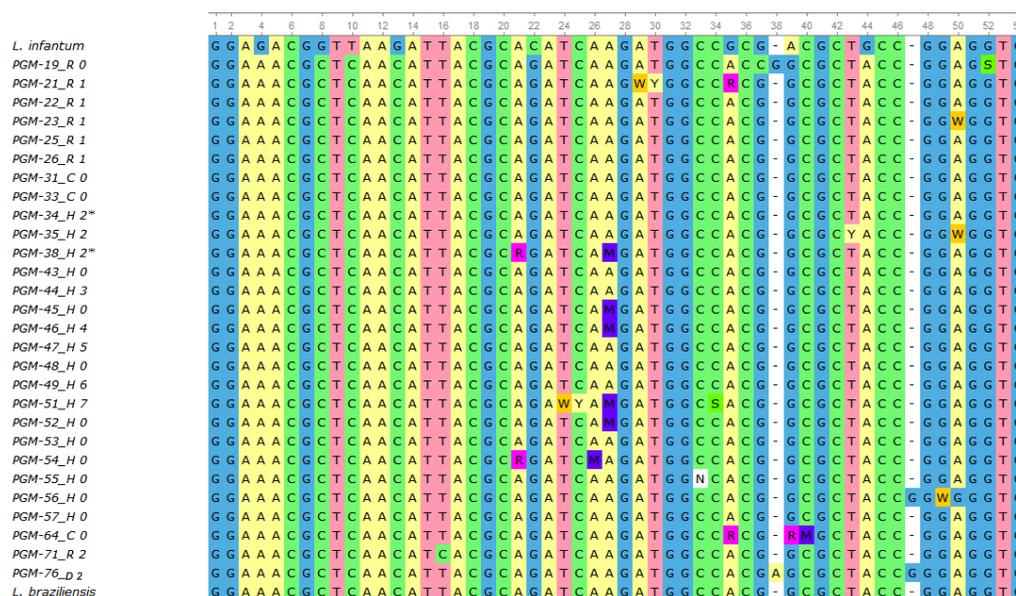
Realizou a amplificação das amostras para o alvo *pgm* através de PCR, e posteriormente, através de eletroforese em gel de agarose a 1%, onde foi avaliada a capacidade de amplificação do gene para as amostras e as espécies de *Leishmania* referência utilizadas como controle. O fragmento de 530 pb foi observado em todas as amostras utilizadas neste estudo (**figura 23**).



**Figura 23** - Resultado representativo da PCR-*pgm* a partir de amostras estudadas. Legenda: Legenda: PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; 31 a 64 – cepas do grupo amostral; cepa referência LB - *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); cepa referência Li -*L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); cepa referência La - *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8); CN– controle negativo.

#### 5.7.2 Alinhamento das sequências e árvore filogenética do gene *pgm*

Os fragmentos obtidos foram sequenciados a fim de investigar possíveis polimorfismos ao longo da sequência das amostras estudadas bem como realizar análise filogenética do gene. As sequências obtidas apresentaram, em média, 500pb, cobrindo 94,52% do *amplicon* esperado para o gene (529pb), sendo comparadas com sequências depositadas no GenBank a partir do algoritmo BLASTn, onde foram confirmadas novamente a identificação como *L. braziliensis*. Ao alinhar as sequências, foram encontrados 47 polimorfismos, e 295 ambiguidades em várias amostras e em diferentes posições, de forma homogeneia ao logo de todo alinhamento, com uma média de dois e 11, respectivamente para cada amostra (**figura 24 e tabela 7**).

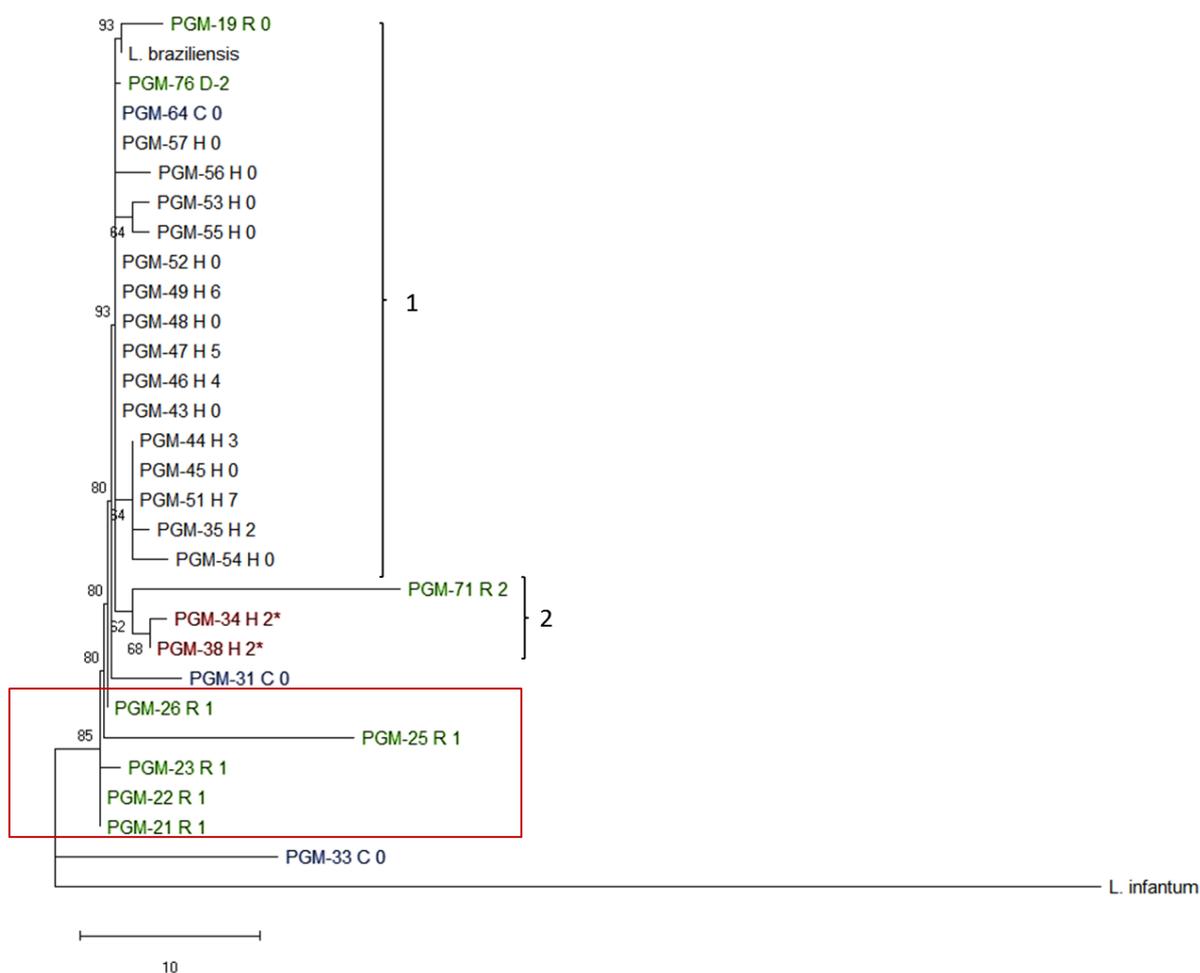


**Figura 24** – Alinhamento representativo das sequências do gene *pgm* para as amostras estudadas obtidas no software UGene. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfideo; 0 – RMBH; 1 – CARAÇA; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante.

Amostras	Variante	Amb.
PGM-19 R 0	1	12
PGM-21 R 1	0	9
PGM-22 R 1	0	7
PGM-23 R 1	1	8
PGM-25 R 1	8	13
PGM-26 R 1	0	6
PGM-31 C 0	2	8
PGM-33 C 0	12	16
PGM-34 H 2*	1	6
PGM-35 H 2	2	10
PGM-38 H 2*	1	8
PGM-43 H 0	0	8
PGM-44 H 3	1	7
PGM-45 H 0	1	7
PGM-46 H 4	0	11
PGM-47 H 5	0	7
PGM-48 H 0	0	6
PGM-49 H 6	0	7
PGM-51 H 7	1	12
PGM-52 H 0	0	8
PGM-53 H 0	1	7
PGM-54 H 0	4	28
PGM-55 H 0	1	7
PGM-56 H 0	0	14
PGM-57 H 0	0	9
PGM-64 C 0	0	10
PGM-71 R 2	10	35
PGM-76 D 2	0	9
Total	47	295
Média	2	11

**Tabela 7** - Quantidade de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por amostras estudadas e amplificadas para o alvo *pgm*. Legenda: Amb. – ambiguidade; Variantes – quantidade de posições que apresentaram nucleotídeos variantes em comparação com a sequência de *L. braziliensis*.

Com o objetivo de aprofundar a caracterização das amostras foram realizadas análises filogenéticas no formato de filograma, através do software MEGA X, utilizando sequências de *L. braziliensis* e *L. infantum* como *outgroup* recuperadas do banco de dados GenBank (**figura 25**). No filograma para este gene, as amostras foram agrupadas juntamente com o controle de *L. braziliensis*, suportadas por *bootstrap* de 85%, com exceção da amostra 33 oriunda de um canídeo doméstico da RMBH, que ficou segregada juntamente com o *outgroup* *L. infantum*. Observou-se também a formação de dois *clusters*, o primeiro e grande *cluster* 1 reuniu amostra indistintamente do lugar e do hospedeiro. Já o *cluster* 2 agrupou somente três amostras de uma mesma localidade (Xakriabá), reunindo novamente as duas amostras variantes provenientes de humanos (34 e 38), e uma amostra de roedor silvestre (71). Por fim, observa-se também que ocorreu segregação das amostras de roedores silvestres oriundas do Caraça.



**Figura 25** – Filograma obtido das sequências da amplificação do alvo *pgm*. Legenda: H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante. O retângulo vermelho destaca a segregação das amostras de roedores do Caraça.

### 5.8 Variabilidade genética e ambiguidades apresentadas nas amostras estudadas

Um resumo do perfil da variabilidade genética identificado nas amostras estudadas, com base nos diferentes marcadores (*hsp70*, *alat*, *g6pd*, *icd*, *mpi* e *pgm*) está representado na **tabela 8**. Além disso, calculou-se o índice de nucleotídeos variantes e ambiguidades apresentadas por cada amostra, onde a razão entre os parâmetros foi calculado em relação a cepa de referência *L. braziliensis* para cada gene analisado. Portanto, quanto mais próximo do valor 1 maior a similaridade com a cepa referência de *L. braziliensis*.

Amostras	Fragmentos de Gene amplificados																							
	hsp70		alat		g6pd		lcd		Mpi		pgm													
	Variante	Amb.	Variante	Amb.	Variante	Amb.	Variante	Amb.	Variante	Amb.	Variante	Amb.												
19 R0	77	0,94	44	0,97	14	0,98	8	0,99	3	1,00	7	0,99	3	0,99	11	0,98	1	1,00	7	0,99	1	1,00	12	0,98
21 R1	84	0,94	34	0,97	8	0,99	4	0,99	8	0,99	9	0,99	3	0,99	11	0,98	5	0,99	9	0,99	0	1,00	9	0,98
<b>22 R1</b>	80	0,94	38	0,97	11	0,98	2	1,00	5	0,99	9	0,99	1	1,00	<b>112</b>	<b>0,79</b>	1	1,00	2	1,00	0	1,00	7	0,99
23 R1	84	0,94	34	0,97	11	0,98	1	1,00	1	1,00	13	0,99	4	0,99	12	0,98	1	1,00	3	1,00	1	1,00	8	0,98
25 R1	81	0,94	29	0,98	7	0,99	3	0,99	0	1,00	16	0,98	4	0,99	13	0,98	4	0,99	2	1,00	8	0,98	13	0,98
26 R1	74	0,94	40	0,97	6	0,99	6	0,99	21	0,98	2	1,00	17	0,97	43	0,92	3	1,00	7	0,99	0	1,00	6	0,99
31 C0	106	0,92	0	1,00	12	0,98	7	0,99	0	1,00	24	0,97	3	0,99	6	0,99	1	1,00	1	1,00	2	1,00	8	0,98
33 C0	74	0,94	40	0,97	10	0,98	9	0,98	0	1,00	17	0,98	3	0,99	12	0,98	8	0,99	2	1,00	12	0,98	16	0,97
34 H2*	77	0,94	36	0,97	4	0,99	3	0,99	7	0,99	92	0,90	3	0,99	14	0,97	1	1,00	5	0,99	1	1,00	6	0,99
35 H2	77	0,94	36	0,97	3	0,99	2	1,00	0	1,00	60	0,93	3	0,99	38	0,93	7	0,99	4	0,99	2	1,00	10	0,98
38 H2*	78	0,94	36	0,97	4	0,99	3	0,99	3	1,00	11	0,99	3	0,99	10	0,98	1	1,00	3	1,00	1	1,00	8	0,98
43 H0	74	0,94	37	0,97	15	0,97	2	1,00	2	1,00	50	0,94	-	-	-	-	44	0,94	2	1,00	0	1,00	8	0,98
44 H3	81	0,94	35	0,97	10	0,98	1	1,00	0	1,00	54	0,94	4	0,99	8	0,98	4	0,99	1	1,00	1	1,00	7	0,99
45 H0	-	-	-	-	3	0,99	2	1,00	1	1,00	19	0,98	3	0,99	16	0,97	2	1,00	2	1,00	1	1,00	7	0,99
46 H4	81	0,94	39	0,97	5	0,99	3	0,99	0	1,00	21	0,98	3	0,99	4	0,99	3	1,00	2	1,00	0	1,00	11	0,98
47 H5	106	0,92	0	-	6	0,99	1	1,00	0	1,00	17	0,98	3	0,99	19	0,96	2	1,00	3	1,00	0	1,00	7	0,99
48 H0	77	0,94	39	0,97	16	0,97	1	1,00	0	1,00	17	0,98	-	-	-	-	5	0,99	1	1,00	0	1,00	6	0,99
49 H6	84	0,94	34	0,97	3	0,99	1	1,00	1	1,00	5	0,99	4	0,99	7	0,99	2	1,00	1	1,00	0	1,00	7	0,99
51 H7	-	-	-	-	2	1,00	22	0,96	0	1,00	27	0,97	31	0,94	70	0,87	5	0,99	2	1,00	1	1,00	12	0,98
52 H0	74	0,94	40	0,97	2	1,00	2	1,00	4	1,00	24	0,97	3	0,99	9	0,98	2	1,00	1	1,00	0	1,00	8	0,98
53 H0	84	0,94	31	0,98	6	0,99	4	0,99	1	1,00	22	0,98	10	0,98	20	0,96	2	1,00	2	1,00	1	1,00	7	0,99
54 H0	78	0,94	31	0,98	2	1,00	2	1,00	2	1,00	51	0,94	8	0,98	68	0,87	1	1,00	0	1,00	4	0,99	28	0,95
<b>55 H0</b>	91	0,93	16	0,99	3	0,99	2	1,00	18	0,98	13	0,99	2	1,00	94	0,82	<b>202</b>	<b>0,70</b>	2	1,00	1	1,00	7	0,99
56 H0	96	0,93	13	0,99	5	0,99	3	0,99	0	1,00	23	0,97	3	0,99	10	0,98	6	0,99	3	1,00	0	1,00	14	0,97
57 H0	82	0,94	31	0,98	7	0,99	1	1,00	0	1,00	9	0,99	3	0,99	12	0,98	6	0,99	2	1,00	0	1,00	9	0,98
<b>64 C0</b>	77	0,94	42	0,97	3	0,99	28	0,95	113	0,87	26	0,97	23	0,96	<b>119</b>	<b>0,78</b>	6	0,99	1	1,00	0	1,00	10	0,98
<b>71 R2</b>	79	0,94	33	0,97	4	0,99	5	0,99	9	0,99	42	0,95	11	0,98	<b>122</b>	<b>0,77</b>	19	0,97	22	0,97	10	0,98	35	0,93
76 D2	82	0,94	36	0,97	6	0,99	9	0,98	5	0,99	30	0,97	12	0,98	64	0,88	42	0,94	2	1,00	0	1,00	9	0,98
TOTAL	2138		824		188		137		204		710		170		924		386		94		47		295	
MÉDIA	82		32		7		5		7		25		7		36		14		3		2		11	

**Tabela 8** – Perfil da variabilidade genética por gene e amostra estudada, quando comparados à cepa referência de *L. braziliensis*. Legenda:

Amb. – ambiguidade; Variantes – quantidade de posições que apresentaram nucleotídeos variantes em comparação com a sequência de *L. braziliensis*; H – humano; C – cão; R – roedor; D - didelfídeo; 0 – RMBH; 1 – Caraça; 2 – Xakriabá; 3 – Pará de Minas; 4 - Martinho Campos; 5 – Caratinga; 6 – Rio Vermelho; \* amostras com perfil variante; - : amostra não analisada para o alvo. Gradiente de cores: quanto mais próximo do valor 1, mais claro e mais próximo a cepa de referência de *L. braziliensis*, quanto mais distante, mais vermelho.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Recuperação das amostras

Poucos estudos de caracterização e variabilidade genética de organismos da espécie *L. braziliensis* reúne grande quantidade de amostras, provenientes de localidade e hospedeiros diferentes, o que prejudica a compreensão panorâmica da LTA no Brasil (CUPOLLILO et al., 2003; BOITÉ et al, 2014). Deste modo, tentou-se recuperar o maior número de cepas que estavam depositadas no Banco de Cepas do Grupo de Estudos em Leishmanioses (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas). Contudo, a recuperação de cepas armazenadas apresentam algumas limitações, tal como dificuldade em se obter amostras que não apresentam degradação de DNA, quantidade de DNA suficiente para utilização em técnicas moleculares e volume adequado para os diferentes procedimentos. Diversos fatores podem estar associados à perda de qualidade do material armazenado, assim como procedimentos inadequados de coleta, má qualidade do material extraído, oscilação na temperatura de armazenamento, sucessivos descongelamentos, tempo de armazenamento e manipulação inadequada das amostras (BLOW, 2007; SHABIHKHANI et al., 2014).

Através da busca nos bancos de cepas foi possível obter 447 amostras. Contudo, somente 28 amostras apresentaram os requisitos mínimos estabelecidos para participação no estudo. O Banco de Cepas do Grupo de Estudos em Leishmanioses tem um alto nível de controle de qualidade, contudo assim determinadas amostras armazenadas podem não ser adequadas para estudos de caracterização genética. Além disso, é importante a definição de critérios rigorosos para inserção de amostras em estudos de variabilidade genética a fim de se evitar que os resultados obtidos sejam oriundos de degradação de DNA. Portanto, percebe-se a dificuldade de obter grande número de cepas que tenham qualidade suficiente para obter resultados mais acurados.

### 6.2 Identificação das amostras como *L. braziliensis*

A correta identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas nas infecções é de extrema importância, não somente para associar diferentes manifestações clínicas da doença e correto diagnóstico, mas também para condução de estudos

específicos a cada espécie, contribuindo para os conhecimentos epidemiológicos das mesmas. Deste modo, a identificação específica deste parasito contribui na escolha de terapias e condutas clínicas adequadas, bem como na adoção de medidas efetivas de prevenção e controle da transmissão.

A técnica ainda considerada padrão-ouro pela OMS para a identificação de espécies de *Leishmania* é a análise por MLEE (BAÑULS, HIDE & PRUGNOLLE, 2007). Contudo, este método apresenta desvantagens, principalmente por possuir uma menor resolução de identificação quando comparado aos métodos moleculares, além de exigir isolamento e cultivo dos parasitos, o que inviabiliza muitos estudos (MAURICIO et al., 2006).

As diferentes técnicas atuais de identificação de *Leishmania* usam tanto a PCR dirigidas a alvos específicos, tal como processos pós-amplificação baseados no polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). Os fragmentos amplificados são submetidos à ação de endonucleases de restrição, onde perfil de digestão apresentado pode diferenciar as espécies de *Leishmania* (GRAÇA et al., 2012; HIDE & BAÑULS, 2006). Neste estudo optou-se por realizar PCR-RFLP voltado para dois genes alvos, ITS1 e *hsp70* a fim de identificar as amostras estudadas. Estes dois alvos são considerados os melhores marcadores para identificação de espécies de *Leishmania*, no Velho e Novo Mundo respectivamente (VAN DER AUWERA & DUJARDIN, 2015).

Deste modo, primeiramente realizou-se a PCR-RFLP voltada para a região intergênica não-codificante do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal (ITS1). Este alvo foi inicialmente proposto por Cupolillo et al. (1995), e desde então vem sendo amplamente utilizado em estudos de caracterização molecular tanto em cepas do Velho Mundo (CHICHARRO et al, 2002; SCHÖNIAN et al., 2000), como em cepas de *L. braziliensis* do Novo Mundo (BERZUNZA-CRUZ et al., 2002; CUPOLILLO et al., 2003; KUHLS et al. 2005).

Através dos resultados obtidos com a PCR-RFLP do ITS1 observou-se que as amostras amplificadas apresentaram perfil de restrição semelhante ao observado para *L. braziliensis*. Contudo, a amostra de ID 34 apresentou perfil de restrição compatível com *L. guyanensis* (figura 5, página 59). Em estudos anteriores, essa

amostra, oriunda de um humano com lesões atípicas de LTA, foi identificada como *L. braziliensis* por diferentes técnicas e alvos moleculares, pelas quais foi verificado perfil de restrição variante, assim como foram identificados polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (QUARESMA et al., 2011; RUGANI, 2015). Apesar da PCR-RFLP ITS1 através da digestão dos *amplicons* com a enzima de restrição *HaeIII* ser considerada capaz de distinguir espécies de *Leishmania* próximas, a distinção de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* utilizando este alvo, somente é possível através de sequenciamento genético (SCHÖNIAN et al., 2003). Deste modo, a confirmação da identidade específica foi realizada através do sequenciamento dos fragmentos provenientes da PCR-ITS1, que demonstrou que todas as amostras apresentaram índice de identidade igual ou superior a 98%, quando comparadas com *L. braziliensis*. Portanto, este alvo apresentou limitação em identificar corretamente a espécie do parasito quando analisado somente a digestão enzimática por *HaeIII*.

Além disto, através deste marcador, não foi possível avaliar a diversidade genética das sequências obtidas, por apresentarem um valor baixo de qualidade (figura 6, página 60), não sendo possível também esclarecer o motivo de observarmos perfil semelhante a *L. guyanensis*. Estes resultados para o alvo ITS podem estar relacionados ao fato de que este alvo apresenta grande variação na amplificação (300 a 350pb) assim como é passível de acumular inserções e deleções que não serão expressas pelo sistema de síntese de proteínas e, portanto, não serão prejudiciais ao parasito, gerando um alto nível de variação intra e interespecífica (SCHÖNIAN et al., 2003).

A segunda PCR-RFLP foi direcionada para parte do gene que codifica a proteína de choque térmico de 70 kilodáltons (*hsp70*). Essas proteínas são caracterizadas como antigênicas importantes, pois são expressas como um mecanismo de defesa ao estresse físico e/ou químico causado pelo hospedeiro, não somente pela sua temperatura mais alta em relação à temperatura do vetor, mas também relacionada a pico febril, deste modo são essenciais à sobrevivência do parasito (FOLGUEIRA & REQUENA, 2007; SATO et al., 1995). A técnica de PCR voltada para o fragmento de gene que codifica *hsp70* associada à RFLP utilizando a enzima *HaeIII* vem sendo bastante utilizada para distinção entre variadas espécies de *Leishmania* (FRAGA et al., 2010; GARCIA et al., 2007; MONTALVO et al., 2008). Estes autores

recomendam a PCR-RFLP do *hsp70* como uma ferramenta universal para identificação das espécies de *Leishmania*, por ser uma técnica que conta como vantagem a fácil aplicação e reprodutibilidade, sendo útil em diferenciar *L. braziliensis* das demais espécies de *Leishmania* que circulam Novo e Velho Mundo.

Através dos resultados obtidos neste estudo com a técnica PCR-RFLP voltada para *hsp70*, observou-se que, além da espécie *L. braziliensis* apresentar um perfil distinguível de outras espécies que ocorrem no Brasil, todas as amostras analisadas apresentaram perfis de restrição compatíveis com *L. braziliensis*. Ainda, as amostras 34 e 38 oriundas do Xakriabá, apresentaram perfil de restrição divergente (figura 7, página 61), quando comparados com as cepas de referência, corroborando com estudos anteriores (QUARESMA et al, 2011; RUGANI, 2015). Quaresma e colaboradores (2011) detectou polimorfismo de base única (SNP) no perfil de restrição destas duas amostras. A comparação do sequenciamento das amostras com sequências depositadas no GenBank, também confirmou a identificação como *L. braziliensis* para todas as 28 amostras, inclusive as amostras de perfil variante. Deste modo, a metodologia de PCR-RFLP do *hsp70*, é útil, não somente para a identificação da espécie do parasito, como também para diferenciação de cepas geneticamente distintas.

As análises de variabilidade genética e relação evolutiva das 28 amostras utilizando as sequências obtidas para o alvo *hsp70*, bem como para os demais alvos utilizados neste estudo, serão discutidas e apresentadas no tópico a seguir.

### 6.3 Caracterização molecular e diversidade genética

Estudos que visam compreender relações evolucionárias entre populações de organismos contribuem para uma correta classificação taxonômica de espécies do gênero *Leishmania* e fornecem informações biológicas entre cepas estreitamente relacionadas. Ao mesmo tempo, a análise de cepas provenientes de diferentes hospedeiros e localidades fornecem dados sobre a influência destes no genótipo do parasito. O papel dos reservatórios de *L. braziliensis* na epidemiologia e na evolução do parasito ainda é pouco elucidado (MILLÁN et al., 2011; SILVA et al., 2005). Mais informações sobre a natureza dos ciclos de transmissão silvestre e peridoméstica, bem como a interação do parasito com cada hospedeiro podem ser obtidas

comparando, geneticamente, cepas de *L. braziliensis* provenientes de infecções em diferentes hospedeiros (CORTES et al., 2006). A variabilidade genética das sequências de DNA pode demonstrar a divergência evolutiva, sendo usada para elaborar hipóteses filogenéticas entre as cepas de diferentes hospedeiros.

Vários genes são candidatos a serem utilizados como alvos moleculares para análises de caracterização e variabilidade genética como, por exemplo, *hsp70* (GARCIA et al, 2004), genes que codificam a *g6pd* (CASTILHO et al., 2003; VICTOIR et al., 1998;), e também fragmentos de genes das vias glicolíticas, tal como *alat*, *pgm*, *mpi* e *icd* (BOITÉ et al., 2012; MAURÍCIO, 2006). Estes genes são alvos utilizados em MLST e também codificam enzimas utilizadas na técnica padrão-ouro de identificação de *Leishmania*, MLEE.

O sequenciamento genético dos fragmentos de gene de *hsp70*, *alat*, *g6pd*, *pgm*, *mpi* e *icd* das cepas realizado no presente estudo, demonstrou valores de identidade igual ou superior a 98%, comparados com outras sequencias de *L. braziliensis* depositadas no GenBank. Somente as amostras 45 e 51, provenientes de humano, apresentaram um valor baixo de qualidade (inferior a 98%) para o gene *hsp70*, sendo removidas da análise desse gene. O mesmo foi observado para as amostras 43, 48 e 53, ambas de humanos, quando comparadas com a cepa referência, para o gene *icd*, sendo excluídas do estudo desse gene. Estes resultados demonstram que todos os genes estudados apresentaram boa qualidade do material sequenciado, sendo úteis para a confirmação da espécie do parasito através do sequenciamento.

Os resultados obtidos, através da técnica PCR direcionada ao alvo *hsp70*, seguida de sequenciamento e alinhamento múltiplo, demonstraram alto índice de diversidade genética (nucleotídeos variantes e ambiguidades), quando comparados com a cepa referência de *L. braziliensis* para o mesmo gene alvo (tabela 2, página 63). Resultado divergente do encontrado na literatura e em estudos semelhantes (FRAGA et al., 2010; GARCIA et al., 2004; YOUNG et al., 2004), os quais observam baixo índice de polimorfismos e poucos sítios ambíguos, pois o gene *hsp70*, dentre todos os genes *HSPs*, é o mais altamente conservado em sequência e função (FOLGUEIRA et. al., 2005). Ambiguidade é a apresentação de qualquer nucleotídeo que pode estar presentes ou sobreposto em uma determinada posição do

sequenciamento, podendo ser observados como picos sobrepostos no eletroferograma (BOITÉ, 2014; KLUG et al., 2010). Essas ambiguidades podem representar células com diferentes alelos, ou células homocigotas com alelos distintos (BOITÉ, 2014; ODDS & JACOBSEN, 2008; VAN BELKUM et al., 2001;). Contudo, apesar das amostras utilizadas na análise deste gene apresentaram um mínimo de 98% de identidade comparada com as cepas referência através do algoritmo BLASTn, não descarta-se a hipótese de que essa heterogeneidade entre as sequências obtidas podem estar relacionadas a falhas inerentes ao sequenciamento deste gene (MÉDIGUE et al., 1999), visto que apresentaram apenas 38% de cobertura para o *amplicon* esperado.

Resultado semelhante para o gene *hsp70* foi observado para o fragmento dos genes *g6pd* e *icd*. Apesar de apresentarem índices de nucleotídeos variantes menores do que o apresentado para o *hsp70* (2138), também apresentou um elevado índice de ambiguidades (710 e 924, respectivamente, tabela 4, página 71 e tabela 5, página 75), em diversas posições, sem um padrão distinguível. Resultados estes divergentes aos encontrados na literatura para estes genes. Em um estudo realizado com diversas cepas por Boité et al. (2012) observou menor diversidade genética para espécies de *Leishmania* e para os genes que codificam *g6pd*, *icd* e *mpi*. Além disso, *icd* foi o único marcador que não apresentou SNP. Zemanová e colaboradores (2006) observaram resultados semelhantes para esses mesmos genes, assim como observaram menos de 1% de locais polimórficos ao longo das sequências estudadas. Nos resultados obtidos no presente estudo, observou-se elevado número de nucleotídeos variantes pode representar que estes genes ainda estejam sofrendo uma pressão seletiva intensa nas cepas estudadas (*g6pd* e *icd*) isoladamente. Os resultados apresentados podem estar mais relacionados à atividade das enzimas, *g6pd* e *icd*, que atuam principalmente no metabolismo da glicose (NUNES, 2016). Parasitos intracelulares podem utilizar os produtos metabólicos da célula hospedeira, principalmente quando sofrem danos que comprometam a sua própria capacidade metabólica. Deste modo, podem ser mais tolerantes a diversidade genotípicas em *locus* que codificam enzimas do metabolismo da glicose, onde pode ocorrer maior tendência a acumular variações genéticas (BAÑULS, HIDE & PRUGNOLLE, 2007). Além disso, a amplificação do

gene *g6pd* (figura 13, página 69) não foi capaz de diferenciar as espécies de *Leishmania* somente através da PCR convencional, como é proposto na literatura (CASTILHO et al., 2003; CUPOLILLO et. al., 1994).

Genes considerados *não-neutros*, ou seja, que estão mais sujeitos à pressão do meio, podem colaborar para assimilação de traços epidemiológicos importantes, como virulência e resistência a drogas (MAIDEN et al., 2013; SCHÖNIAN et al., 2011). Por isso, esses resultados aparentemente conflitantes com estudos anteriores, são reflexos das diferenças intrínsecas aos marcadores escolhidos, que podem variar em grau de polimorfismo, taxa de mutação, ocorrência de recombinação e pressão de seleção sobre os *loci* (BOITÉ et al., 2012; MAIDEN et al., 2013). Portanto, evidencia-se a importância da combinação de diferentes marcadores, a fim de se obter resultados mais fidedignos sobre a diversidade genética do parasito. Apesar da maioria dos estudos apresentarem divergência com estes resultados, Figueiredo et al. (2019) apresentaram resultados parecidos aos observados neste estudo, onde as diversas amostras estudadas demonstraram um nível substancial de diversidade quando comparado com a cepa de *L. braziliensis* utilizada como referência, com altas contagens de nucleotídeos variantes para os diferentes isolados através dos marcadores *icd*, *mpi* e *g6pd*.

As amostras 22 e 71 provenientes de roedores silvestres de localidades distintas, bem como a amostra 64 proveniente de cão doméstico da RMBH demonstraram valores significativos de ambiguidades para o gene *icd* (tabela 5, página 75). Adicionalmente, a amostra 64 também demonstrou elevado índice de nucleotídeos variantes para o gene *g6pd* (tabela 4, página 71). Estes resultados indicam que essa diversidade genética observada pode estar relacionada à intensa pressão seletiva que estes genes ainda estão sofrendo nos hospedeiros mamíferos. Considerando que o cão é um hospedeiro eventual ou mesmo ainda considerando acidental por alguns pesquisadores (MADEIRA et al., 2005; PADILLA et al., 2002), apresentando variações nos sinais clínicos e sorológicos, diferentes do observado em outros hospedeiros e humanos, quando infectados por *L. braziliensis*, podendo supor que este parasito ainda está em processo adaptativo a este hospedeiro (SANTOS et al., 2007). Além disso, RMBH é endêmica para *L. infantum* (FERREIRA

et al., 2015), podendo ocorrer coinfeções e até mesmo trocas genéticas no vetor, contribuindo para ocorrência de variabilidade genética (ROMANO et al., 2014).

Os genes *mpi*, *pgm* e *alat*, apresentaram os menores índices de posições com nucleotídeos divergentes do controle *L. braziliensis* e ambiguidades. Amostra 55 proveniente de humano oriundo de Santa Luzia (RMBH) foi mais expressiva, demonstrando alto valor de polimorfismos para o alvo *mpi*, o que elevou o índice do gene, considerado a amostra mais divergente (tabela 6, página 79). Apesar disso, os genes *mpi* e *pgm*, não apresentaram um padrão na apresentação de nucleotídeos variantes e ambiguidades. O gene codificador da enzima *alat*, demonstrou-se mais promissor para análises de variabilidade genética, com índices mais baixos de nucleotídeos variantes e ambiguidades (tabela 3, página 67). Apesar de apresentar nucleotídeos variantes, demonstrou sequências mais homogêneas. Estes resultados corroboram com os achados encontrados por Marco et al., (2015) o qual demonstra que este gene está sob pressão de seleção estabilizada, sendo um excelente marcador para avaliar diversidade genética e estudos filogenéticos. Além disso, esta enzima tem um papel importante na gliconeogênese nas diferentes fases do gênero *Leishmania*. Contudo suas funções ainda não estão bem esclarecidas, demonstrando a necessidade de mais pesquisas sobre seu papel nas diferentes espécies de *Leishmania* (MARCIANO et al., 2009).

Observa-se que o sequenciamento de DNA apresentou um elevado número de nucleotídeos variantes e de ambiguidades. Este último pode representar sítios heterozigotos, e ambos estavam presentes nos diferentes genes e amostras estudadas (Tabela 8). Como todos os alvos eram genes de cópia única, deste modo, a presença de locais ambíguos nos seis *loci* (*hsp70*, *alat*, *g6pd*, *icd*, *mpi* e *pgm*) acredita-se que representam, em sua maioria, heterozigose. Além disso, a apresentação de ambiguidades ocorreu de forma homogênea ao longo de todas as sequências analisadas, o que corrobora com a hipótese de heterogeneidade. A troca genética é considerada uma hipótese mais aceita para explicar elevada heterozigose em vários locais dentro de um gene e em vários *loci*, considerando que eventos de mutação é uma explicação menos provável (MAURICIO et al., 2006). Além disso, o intercâmbio genético pode elucidar o elevado índice de heterozigotos em populações de *Leishmania* (GAUNT et al., 2003; GIBSON & STEVENS, 1999).

Todavia, em análises de diversidade genética deve-se considerar diferentes fatores que vão além de nucleotídeos variantes, polimorfismos genéticos ou ambiguidades no genoma do parasito, como a dinâmica de interação com os diferentes hospedeiros e vetores, aspectos concernentes à transmissão, e aspectos do desenvolvimento da doença bem como resposta as terapias disponíveis (CORTES et al., 2006; BOITÉ, 2014). Sendo portanto, necessários mais estudos a fim de obter mais informações que contribuam para a compreensão da diversidade genética aqui observada.

#### 6.4 Análise dos filogramas das amostras de *L. braziliensis* de Minas Gerais

Os filogramas são ferramentas importantes para compreensão da estrutura de populações naturais, contribuindo para elucidar questões sobre a distribuição de indivíduos na natureza, bem como quais são suas estratégias para propagação e recombinação (ROUGERON et al., 2015). Estudo sobre a história evolutiva dos genes são de grande importância para organismos dos quais são difíceis de serem observados diretamente, tal como os protozoários de forma geral (DE MEEÛS et al., 2007), especialmente para gênero *Leishmania*, que apresenta grande plasticidade genômica, diferentes ciclos e apresentações clínicas nos indivíduos afetados (PACHECO et al., 1990).

Neste estudo foram realizadas análises de filogramas através do método de Máxima Parcimônia (NEI & KUMAR, 2000), pelo software MEGA X (KUMAR et al., 2018), utilizando dados de sequenciamento dos marcadores *hsp70*, *alat*, *g6pd*, *icd*, *mpi* e *pgm*. Para as análises foram incluídas as sequências da cepa referência de *L. braziliensis* e de uma espécie filogeneticamente mais distante (*L. infantum*), onde permaneceu como *outgroup*. As sequências dessas cepas foram recuperadas do banco de dados GenBank.

Através da árvore filogenética obtida para o gene *hsp70*, foi observado baixo suporte para as ramificações (figura 9, página 64), o que também foi observado na análise do gene *icd* (tabela 19, página 76). Estes resultados podem estar associados ao fato de que ambos os alvos (*hsp70* e *icd*) amplificam um fragmento de gene muito longo (1300pb e 1022pb, respectivamente, quadro 5), o que pode ocasionar sequenciamento de partes distintas do *amplicon*, gerando grandes

divergências dentre as sequências alinhadas. Essa hipótese é reforçada ao analisar conjuntamente o resultado do sequenciamento, onde se obteve apenas aproximadamente 38% do amplicon esperado para o gene *hsp70* e 72% para o gene *icd*. Estes alvos apresentaram altos índices de nucleotídeos variantes e ambiguidades, que podem ser resultados de alinhamento inconsistente das sequências *forward* e *reverse*, prejudicando o alinhamento múltiplo e obtenção de resultados fidedignos de variabilidade genética. Os fatores intrínsecos a estes dois alvos, principalmente considerando o comprimento do *amplicon*, são limitadores quanto à utilização deste em estudos de diversidade genética.

Na análise do gene *hsp70* foi observado que as amostras de perfil variante, oriundas de humanos do Xakriabá (34 e 38), foram separadas em um *cluster* apresentando um valor de *bootstrap* ou suporte de 100%. Resultado esperado, de acordo com os estudos realizados anteriormente para estas amostras (QUARESMA et al, 2011). A formação desse agrupamento repetiu-se de forma semelhante nas árvores para os demais genes, com diferença no nível de confiança/suporte (*alat*: 80%; *g6pd*: 73%; *icd*: 96%; *mpi*: 74% e *pgm*: 68%). Deste modo estes resultados indicam que as cepas exclusivamente de humanos que apresentaram perfis variantes e manifestações atípicas de LTA, provenientes do Xakriabá, apresentam polimorfismos ao longo das sequências (como foi descrito pelos estudos prévios), para os todos marcadores utilizados e tendem a se agrupar separadamente em análises dos filogramas. Estes resultados condizem com os resultados realizados com estas amostras em estudos anteriores (QUARESMA et al, 2011; RUGANI, 2015). Deste modo, todos os marcadores estudados foram eficientes ao demonstrar a relação filogenética das amostras de perfil genético variante.

Além disso, ainda sobre o gene *hsp70*, observaram-se também a separação de duas amostras de humanos, 53 de Belo Horizonte e 54 de Sabará (RMBH), em um *cluster* com suporte de 94% (figura 9, página 64). Adicionalmente, um *clusters* do filograma para o gene *hsp70*, ocorreu a combinação de amostra de canídeo doméstico juntamente com uma amostra de pequeno mamífero de localidades distintas (*cluster* 5). Bem como ocorreu agrupamento de amostras oriundas de pequenos mamíferos silvestres associadas a uma amostra de humano (suporte de 99%) de locais diferentes. Apesar de serem espécies completamente distintas, a

associação de cepas oriundas de cães com as cepas oriundas de pequenos mamíferos, bem como as de humanos associadas à de pequenos mamíferos demonstram que cepas provenientes de pequenos mamíferos podem apresentar características genéticas que disponha de mecanismos mais adaptados para circular em diferentes hospedeiros. Estes resultados demonstram que este gene está sofrendo pressão seletiva que pode ser independente da localidade ou da espécie do hospedeiro.

Contudo, para o gene *alat* (figura 12, página 68), onde os *clusters* 1, 4, e 5 agruparam amostras de pequenos mamíferos e humanos de áreas distintas. Além disso, no *cluster* 3 ocorreu a separação de duas amostras de cães que, apesar de pertencerem a uma mesma localidade (Betim, RMBH), este conjunto de resultados contribuem com a hipótese de separação evolutiva das cepas de *L. braziliensis* em relação ao tipo de hospedeiro, além do fator ambiente, para este gene.

Considerando que os pequenos mamíferos são mais numerosos e possuindo uma grande diversidade de espécies além de serem amplamente distribuídos em todos os ambientes (CARLETON & MUSSER, 2005), são incriminados como os principais reservatórios e amplificadores de *L. braziliensis*, sendo, não somente responsáveis pela manutenção nos ciclos silvestres, como também são importantes elos de comunicação dos ciclos silvestre e peridoméstico (ANDRADE et al., 2015; ASHFORD, 1996; TONELLI et al., 2017). Além disso, pequenos mamíferos são os principais hospedeiros responsáveis por propiciar a transmissão de *L. braziliensis* para humanos (ASHFORD, 1996). Estas características podem contribuir para que cepas oriundas destes hospedeiros apresentem genótipo mais variável, podendo eventualmente apresentar semelhanças com cepas oriundas de outros hospedeiros, sendo mais hábeis para circular em diferentes espécies e infectar humanos. Adicionalmente, Brandão-Filho e colaboradores (2003) verificaram uma grande heterogeneidade, tanto para o genótipo quanto para o fenótipo de grande número de isolados de roedores selvagens e sinantrópicos (*Necromys lasiurus*, *Nectomys squamipes*, e *Rattus rattus*), através da técnica de MLEE, contrastando com área geográfica reduzida do estado do Pernambuco (Brasil) da qual foram obtidos.

A grande variabilidade genética de *L. braziliensis*, contribui para a formação de pequenas populações que podem se agrupar de acordo com certas espécies hospedeiras, como por exemplo, podem ocorrer populações compartilhadas por seres humanos e pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos. Deste modo, supõe-se que este é o resultado dos diferentes ciclos independentes e interconectados de transmissão de espécies de *Leishmania* (ROQUE & JANSE, 2014). Novamente, a hipótese de populações distintas deste parasito de acordo com a espécie de hospedeiro é reforçada ao analisar a árvore para o gene *g6pd* (figura 15, página 72). Observa-se que ocorreu um *cluster* (4) com duas amostras (52 e 55) de humanos da mesma localidade (Santa Luzia-RMBH), bem como um *cluster* (5) onde foram agrupados roedores (pequenos mamíferos) de localidades distintas (Caraça e RMBH), e por fim, no *cluster* 3 onde, como para o gene *alat*, somente as duas amostras (31 e 33) de cães oriundos de Betim (RMBH) foram agrupados.

Supõe-se que além do papel do hospedeiro na modulação das populações de *Leishmania*, o fator ambiente ao qual a cepa circula, também apresenta fator importante na diferenciação das cepas. Diferentes estudos com cepas de localidades específicas demonstram variabilidade genética, quando comparadas com cepas de outras localidades (BOITÉ, 2014; SCHRIEFER et al., 2009; QUARESMA et al, 2011).

Ainda sobre os resultados obtidos para o gene *alat*, a amostra 64 de cão doméstico, apesar de ter sido confirmada como *L. braziliensis* através de sequenciamento genético com os diferentes genes, esta se separou das demais amostras, se distanciando das demais amostras juntamente com o *outgroup* *L. infantum* (figura 12, página 68). O que também foi observado para o gene *g6pd* (figura 15, página 72). Além disso, essa amostra apresentou altos índices de variabilidade genética (nucleotídeos variantes e ambiguidade). A grande diversidade genética observada para essa amostra pode ser em decorrência de coinfeção do hospedeiro além de isolamento de diferentes populações na mesma cultura (MARCO et al.,2015). Considerando que RMBH é endêmica para *L. infantum*, podem ser encontrados altos níveis de cães coinfectados com *L. braziliensis* e *L. infantum* (DANTAS-TORRES et al., 2010), o que também pode contribuir com a ocorrência de trocas genéticas no vetor, propiciando maior diversidade genética do

parasito ou mesmo formação de híbridos (FERREIRA et al., 2015; RAVEL et al., 2006; ROMANO et al., 2014).

Para o alvo *icd* (figura 19, página 76) observaram-se resultados semelhantes aos observados ao gene *hsp70*, onde amostras de cães se agruparam com amostras de pequenos mamíferos de localidades distintas (*cluster* 1). Já nos *clusters* 2, 4, 5 e 6, foram organizadas somente amostras de humanos independente da localidade. Contribuindo também com a hipótese de separação das populações de *L. braziliensis* de acordo com o hospedeiro.

Por fim, na análise dos filogramas para o gene *mpi* (figura 22, página 80) e *pgm* (figura 25, página 85), observou-se uma evidente separação das amostras de roedores oriundas do Caraça. Ambos os filogramas para estes dois alvos agruparam a maioria das amostras em um grande *cluster* com valores de suporte de 79% para o gene *mpi* e 85% para o gene *pgm*. Além disso, apresentaram conjuntamente uma evidente segregação das amostras provenientes de roedores silvestres oriundos do Caraça. A RPPNSC, comumente chamado de Caraça, é uma área de 10.187,89 hectares reservados como área de conservação ambiental com vegetação que transita entre mata atlântica e cerrado, onde o ciclo de transmissão da LTA preserva sua origem no ambiente silvestre (TONELLI et al., 2017). Nossos resultados aparentam demonstrar que neste ambiente, os genes *pgm* e *mpi* sofrem pressão seletiva diferente dos demais genes, podendo supor que, provavelmente, circule uma população de *L. braziliensis* homogênea e distinta de outras localidades de MG, corroborando com a hipótese de que o ambiente é um fator modulador das cepas circulantes. Esta hipótese é reforçada observando ainda o filograma para o gene *pgm* (figura 25, página 85), observa-se que no *cluster* 2 o agrupamento de amostras oriundas do Xakriabá, sendo duas de perfil variante proveniente de humanos, e uma de roedor silvestre (71). A Reserva Indígena do Xakriabá, apesar de apresentar características de ambiente rural, distinto do Caraça, conta com aproximadamente 403Km<sup>2</sup> e média de 6.500 habitantes, somente. Quaresma et al (2011) verificou nesta reserva a ocorrência de subpopulação de *L. braziliensis* causando um lesões atípicas, e cepas que apresentaram perfil genético variante, com presença de polimorfismos. Deste modo, acredita-se que podem ocorrer ciclos específicos de

LTA nestes dois locais, onde podem ser verificadas variabilidade genética intimamente correlacionada ao ambiente mantenedor.

Assim, a diversidade encontrada em amostras de *L. braziliensis* provenientes destes ambientes, parece estar relacionada às interações com os hospedeiros bem com as características intrínsecas aos ambientes específicos. Contudo, estes achados são apenas indicativos, sendo necessários mais estudos, com técnicas mais aprimoradas, tal como MLST, a fim de afirmar estas hipóteses.

Resumidamente, através destes resultados e análises, podemos sugerir que as diferentes cepas de *L. braziliensis* estão evoluindo juntamente com seus hospedeiros/reservatórios e aos ambientes de origem. A história evolutiva de cada gene aqui estudado pode contribuir para compreensão dos processos adaptativos de cada cepa aos diferentes hospedeiros e diferentes localidades. A relação de espécies de *Leishmania* com seus hospedeiros e vetores ocorre a bilhões de anos, resultando em um quebra-cabeça genômico, originando e combinando várias mutações, transferências de genes e eventos de reorganização (VAN DER AUWERA et al., 2011). Muitos anos se passaram desde o advento de técnicas de biologia molecular e o início de estudos de variabilidade genética e filogenética para o gênero *Leishmania*, onde diversos estudos têm demonstrado que realmente existe uma grande variabilidade para algumas de suas espécies (BOITE et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2019; KUHLS et al., 2013). Mas ainda assim, sua epidemiologia ainda não é bem compreendida, isso pode estar relacionado a poucos estudos que abrangem amostras de diferentes hospedeiros de *L. braziliensis*. A compreensão dessa variabilidade tem impacto direto na saúde pública, considerando que há coexistência de diferentes espécies de *Leishmania*, diferentes cepas e diferentes ciclos, o que torna complexo o diagnóstico, tratamento e controle do parasito (CUPOLILLO et al., 2003).

Além disso, este estudo evidencia a importância dos hospedeiros-reservatórios na compreensão na dinâmica intrínseca e extrínseca da *L. braziliensis*. Cada vez mais tem se demonstrado a necessidade utilização de abordagens “*One Health*” (saúde única), onde estudos com hospedeiros não-humanos e seu ambiente são importantes para a melhor compreensão de todos os fatores envolvidos nos ciclos

de transmissão de patógenos zoonóticos e para implementar, de forma correta e efetiva, políticas públicas de vigilância e controle epidemiológicos.

Assim, esses resultados demonstram a complexidade da estrutura genética de *L. braziliensis*, contribuindo para compreensão da história evolutiva dos genes estudados nas diferentes cepas, bem como a relação com os diferentes hospedeiros de áreas distintas do estado de Minas Gerais, gerando informações que contribuem para a compreensão da ecoepidemiologia da LTA no Brasil. Além disso, estes resultados mostram que a metodologia escolhida para este estudo foi eficaz para realizar a caracterização molecular e iniciar a avaliação da variabilidade genética intra-específica de *L. braziliensis* de diferentes hospedeiros, onde foi observado elevado grau de variações genotípicas, tendo como perspectivas futuras a continuação das análises e realização da técnica MLST.

## 7 CONCLUSÕES

- Poucas amostras apresentaram qualidade suficiente para participar de estudos de caracterização genética, demonstrando a dificuldade de utilizar cepas de bancos de dados para caracterização genética;
- A metodologia de PCR-RFLP dirigida ao alvo *hsp70* foi mais eficaz para identificar as amostras utilizadas neste estudo como *Leishmania (Viannia) braziliensis* quando comparado ao alvo ITS1;
- As amostras apresentaram diferentes níveis de variações genéticas para os marcadores utilizados (*hsp70*, *alat*, *g6pd*, *icd*, *mpi* e *pgm*). Os alvos que amplificam uma fração menor do gene alvo (tal como *alat*, *g6pd*, *mpi* e *pgm*) são mais adequados para estudos de variabilidade genética e história evolutiva;
- O marcador voltado para o gene *alat* demonstrou-se mais conservado e útil para avaliar diversidade genética de *L. braziliensis*;
- Os alvos que amplificam fragmentos do gene *hsp70* e *icd* demonstraram-se controversos quanto à utilização para identificação de diversidade genética, devido às limitações que estes alvos apresentam ao serem sequenciados;
- Ambos os alvos foram competentes em agrupar amostras com perfil genético variante, onde os genes polimórficos foram previamente identificados por estudos anteriores;
- Os resultados obtidos com este estudo demonstram que cepas oriundas de pequenos mamíferos, demonstram estarem mais adaptadas para circular em diferentes hospedeiros, principalmente em humanos;
- Identificamos que possivelmente ocorre uma pressão seletiva diferente para os genes *pgm* e *mpi*, em relação aos demais analisados, entre os pequenos mamíferos oriundos do Caraça e Xakriabá, suportando a hipótese de que ocorram populações de *L. braziliensis* nestes que diferem das demais localidades de Minas Gerais;
- Observou a associação entre amostras com diferentes características genéticas e, principalmente, ao tipo de hospedeiro, corroborando com a hipótese de que o hospedeiro tem papel importante na modulação de *locus* no genoma do parasito, destacando a importância de mais estudos com amostras de diferentes espécies de hospedeiros.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALVAR, J., et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, 75, e35671, 2012.
- ALTSCHUL, S. F., et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, 5;215(3):403-10, 1990.
- AKHOUNDI, M., et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, 57, 1–29, 2016a.
- AKHOUNDI, M., et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**. 3;10(3):e0004349, 2016b.
- ANDRADE, M. S. , et al. Infectiousness of sylvatic and synanthropic small rodents implicates a multi-host reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, 9(10): e0004137, 2015.
- ARANA, M., et. al., Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 84, 526-529, 1990.
- ASHFORD, Richard William. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. **Clinics in Dermatology**; 14: 523-523; 1996.
- ASHFORD, D. A. , et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **J. Trop. Med. Hyg**, 59: 53-57, 1998.
- ASHFORD, Richard William. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**; 30: 1269-1281, 2000.
- AZMI, K. , et al. Development of assays using hexokinase and phosphoglucosmutase gene sequences that distinguish strains of *Leishmania tropica* from different zymodemes and microsatellite clusters and their application to Palestinian foci of cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**. 8(5):e2963, 2014.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, 29, 1137-1147, 1999.
- BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PROGNOLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: Parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances In Parasitology**, 64, 2007.
- BERZUNZA-CRUZ, M. , et al. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. **Parasitol. Res**, 88:918-925, 2002.
- BLOW, Nathan. Tissue preparation: Tissue issues. **Nature**, 448: 959-963, 2007.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **J Antimicrob Chemother**, 532: 158-66, 2004.

BOITE, M. C., et al. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania (Viannia)* parasites based on multilocus sequence analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, 611, e1888, 2012.

BOITE, Mariana Cortês. **Desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares para estudos taxonômicos, genéticos e epidemiológicos em *Leishmania (Viannia)***. 2014. 118f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

BRANDÃO-FILHO, S. P., et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 97, 291-296, 2003.

BRANDÃO-FILHO, S.P.; SHAW, J.J. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. **Trends Parasitol**, 22(11):500-1, 2006.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 1a. ed.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2017.

BRITTO, C., et al.. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, 222: 107–117, 1998.

BUITRAGO, R., et al.. PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intraspecies variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. **Infect Genet Evol**, 11:557–563, 2011.

CABRERA, M. A. A., et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo; 45: 79-83, 2003.

CALDART, E. T., et al. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44: 1392, 2016.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, feridas bravas e Kalazar. **Ciência e Cultura**; 1:34-7, 2003.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; GOMES, A. C.; ANTUNES, J. L. F. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(4):299-306, 2002.

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identificação das úlceras de Bauru ao Botão do Oriente. **Revista Médica de São Paulo**, n.6, p.111-116, 1909.

CARLETON, M. D.; MUSSER, G. G. Order Rodentia in Wilson, D. E., Reeder, D. M. (eds). **Mammal Species of the World a Taxonomic and Geographic Reference**. 3ª edição. Johns Hopkins University Press, Baltimore, vol. 2, pp. 745–752, 2005.

CASTILHO, T. M.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J. Clin. Microbiol.**41, 540–546, 2003.

CATTAND, P., et al.. Tropical diseases lacking adequate control measures: Dengue, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis, Chap. 23 In: JAMISON, D.T.; BREMAN, J.G.; MEASHAM, A.R. et al. **Disease control priorities in developing countries**. Washington (DC): IBRD/The World Bank and Oxford University Press, 2006.

CBMM - Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração. Perfil de Minas Gerais - A Guide to the Economy of Minas Gerais. **Fundação João Pinheiro**, 2013.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Parasites—leishmaniasis**. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis>. Acesso em: 02 de outubro de 2019.

CHANG, K. P.; MCGWIRE B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**, 1 (1);1, 2002.

CHICHARRO, C., et al. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg** 96(Suppl. 1):S93-S99, 2002.

CORTES, S., et al. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. **Parasitology International**, 55:277–83, 2006

COSTA, S. M., et al.. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**,102(2) 149-153, 2007.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. J. R.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 50 : 296-311, 1994.

CUPOLILLO, E., et al. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 73(1-2), 145–155, 1995.

CUPOLILLO, E., et al.. Genetic Polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Jour. Clin. Microbiol.**, 41(7): 3126-3132, 2003.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, J. R.; MOMEN, H. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 91:617-626, 1997.

DANTAS-TORRES, F., et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Vet Parasitol**, 170(3-4): 313-317, 2010.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS. Ministério da Saúde. Informações de Saúde: **Informações Epidemiológicas e Morbidade**. 2019. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso em: 30 de outubro de 2019.

DE MEEÛS, T., et al. Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête” **Infection, Genetics and Evolution**, 7(2), 308–332, 2007.

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

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis. **Nature Reviews**: 2, 692-693. 2004.

DU, R., et al. Old world cutaneous leishmaniasis and refugee crises in the Middle East and North Africa. **PLoS Negl Trop Dis**. 10: e0004545, 2016.

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

ESPINOSA, O., et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, 145 (4), 430-442, 2018.

EWING, B.; GREEN, P. Base-Calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res** 8: 186-94, 1998.

FALQUETO, A., et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98(8):1003-1010, 2003.

FELSENSTEIN, Joseph. **Inferring phylogenies**. University of Washington. Sunderland (Massachusetts). Sinauer Associate, 2004.

FERREIRA, E. D., et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Vet Res** 11, 71, 2015.

FERREIRA, G. E. M., et. al. The Genetic Structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and Its Possible Association with the Transmission Cycle of Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**, 7(5), e36242, 2012.

FIGUEIREDO DE SÁ, B. S., et. al. Identification of *divergent Leishmania* (*Viannia*)*braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through whole genome analysis. **PLoS Negl Trop Dis** 13(6): e0007382, 2019;

FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J.M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiol Rev**, v. 31(4), p. 359-377, 2007.

FORATTINI, O. P., et. al. Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 10: 31-43, 1976.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular Epidemiology: Focus on Infection. **American Journal of Epidemiology**, 153; 1135-1141, 2001.

FRAGA, J., et. al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, 10(2), 238–245, 2010.

GARCÍA, A. L., et. al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **J Clin Microbiol** 42:2294–2297, 2004.

GARCIA, A. L., et. al., Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, 101; 1208-1213, 2007.

GARIN, Y. J., et. al.. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. **Infect Immun** 69: 7365–7373, 2001.

GAUNT, M.,. et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, 421, 936–939, 2003.

GHOSH, A .K., et. al.. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and Trypanothione reductase interaction protects *Leishmania donovani* from metalloid mediated oxidative stress. **Free Radic Biol Med**; 106: 10-23, 2017.

GIBSON, W.; STEVENS, J. The evolution of salivarian trypanosomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94(2):225-8, 1999.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 36 (1), 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F., et. al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Trop**, 81: 143-150, 2002.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 8:419-33, 2010.

GRAÇA, G. C., et. al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107(5):664-74, 2012.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. **Ann Epidemiol.**, 16; 157-169, 2006.

HERRERA, G., et. al. Evaluation of a Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia. **Parasit Vectors**;10(1):236, 2017.

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

HILLS, D. M., et. al, Evidence for Biased Gene Conversion in Concerted Evolution of Ribosomal DNA. **Science**, 251(4991); 308-310, 1991.

HOLDER M.; LEWIS P.O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature**. 4(4): 275-284, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Divisão Territorial Brasileira 2016**. Disponível em: [ftp://geofp.ibge.gov.br/organizacao\\_do\\_territorio/estrutura\\_territorial/divisao\\_territorial/2016/DTB\\_2016\\_v2.zip](ftp://geofp.ibge.gov.br/organizacao_do_territorio/estrutura_territorial/divisao_territorial/2016/DTB_2016_v2.zip). Acessado em 12 de janeiro de 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Estimativas da população residente com data de referência 1º de julho de 2019**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg.html>. Acessado em 12 de janeiro de 2019.

IVENS, A. C., et. al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, 309: 436–442, 2005.

KILLICK-KENDRICK, Robert. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**. 17, 279–289, 1999.

KLUG, W. S., et. al. **Conceitos de Genética**. 9ª Edição. Tradução: M. R. Borges-Osório & R. Fischer. ArtMed Editora. Porto Alegre, 2010.

KUHLS, K., et. al. Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania (Viannia)*. **PLoS Negl Trop Dis**; 7(10): e2490, 2013.

KUHLS, K., et. al. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 1224-1234, 2005.

KUMAR, S., et. al.MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**, 35(6), 1547–1549, 2018.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.. “*Leishmania* And Leishmaniasis Of The New World, With Particular Reference To Brazil.” **Pan American Health Organization**, no. June: 1–26, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds) *The leishmaniasis in biology and medicine*, Academic Press, London. 1; 1-120, 1987.

LAINSON, Ralph. Ecological interaction in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 321: 389-404, 1988.

LAINSON, Ralph. The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 1, 13-32, 2010.

LARKIN, M. A , et. al.. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947, 2007.

LAUTHIER, J. J., et. al. Development of a Multilocus sequence typing (MLST) scheme for Pan-Leishmania. *Acta Tropica*, 201, 2019.

LEE, S.T.; TARN, C.; CHANG, K.P. Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58(2), 187–203, 1993.

LEPROHON, P., et. al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res* 37: 1387–1399, 2009.

LIMA, A.C.V.M.R. **Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil**. Tese (Doutorado Em Ciências) ICB, UFMG, 2010.

LIMA, B. S., et al. Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in North-Eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 107 (9): 592–7, 2013.

MADEIRA, M. F., et. al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? *Parasitol Res*, 97: 73-76, 2005.

MAIDEN, M. C., et. al.. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews Microbiology*, 11(10):728-36, 2013.

MARCIANO, D., et. al. Functional characterization of stage-specific aminotransferases from trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 166 (2) 172-82, 2009.

MARCO, J. D., et. al. Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: describing parasite diversity in Argentina. *Infect Genet Evol*; 30:308-317, 2015.

MARZOCHI, M. C. A.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In Cimerman B & Cimerman. S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo, Atheneu., 39-64, 1999.

MAURÍCIO, I. L., et. al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). **Int J Parasitol.**, 367:757–69, 2006.

MAURÍCIO, Isabel L. *Leishmania* taxonomy Fabrizio Bruschi, L. Gradoni (Eds.), The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases. **Springer International Publishing**, 15-30, 2018.

MÉDIGUE, C., et. al. Detecting and analyzing DNA sequencing errors: toward a higher quality of the *Bacillus subtilis* genome sequence. **Genome Res.** (11):1116–1127, 1999.

MELO, Lutiana Amaral de.. **Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG.** Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2008.

MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. . Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. **Parasitology research.** 113, 2014.

MIRANDA, T. M., et. al. Estudo descritivo sobre a leishmaniose tegumentar americana na área urbana do Município de Governador Valadares, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua**, 2(1):27-35, 2011.

MOMEN, Hoomean. Parasite characterization by zymodeme analysis. In: Morel, C.M. (ed.) **Genes and Antigens of Parasites: A laboratory manual.** Rio de Janeiro, UNDP/WHO-FINEPCNPq-FIOCRUZ, p. 111-120, 1984.

MONTALVO, A .M., et. al. PCR-RFLP and RAPD for typing neotropical *Leishmania*. **Biomedica**, 28, 597-606, 2008.

MORARIU, V.; et. al. Automatic online tuning for fast Gaussian summation,. **Advances in Neural Information Processing Systems**, 2008.

NEI, M.; KUMAR, S. Phylogenetic Inference: Distance Methods. Molecular Evolution and Phylogenetics. **Oxford: Oxford University Press**, 115, 2000.

NUNES, Ramon V. Caracterização molecular de isolados de *Leishmania infantum* em municípios do estado de Minas Gerais, Brasil. Tese (Mestrado em Ciências) - UFSJ, Minas Gerais, 2016.

ODDS, F.C.; JACOBSEN, M.D. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. **Eukaryot Cell**, 7(7):1075-84, 2008.

OLIVEIRA, F.S., et. al., PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol**, 128; 219-227, 2005.

OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, 28: 1166-1167, 2012.

PACHECO, R. S., et. al. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: Rioux JA, editor. **Leishmania. Taxonomy and phylogeny**. Montpellier: IMEEE; p. 57-65, 1986.

PACHECO, R. S., et. al. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. **Parasitology**; 100: 393-8, 1990.

PADILLA, A. M., et. al. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. **Veterinary Parasitology**, 110: 1-10, 2002.

PASSOS, V. M. A., et. al. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of Belo Horizonte, MG, Brazil. **Mem Inst Osw Cruz**, 88: 103-110, 1993.

PASSOS, V. M. A., et. al. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania (Viannia)* in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Osw Cruz** 91(1): 19-20, 1996.

PAZ, G. F., et. al. Implications of the use of serological and molecular methods to detect infection by *Leishmania* spp. in urban pet dogs. **Acta Trop.**, v. 182, p. 198-201, 2018.

PEACOCK, C. S., et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet** 39 : 839–847, 2007.

PELHAM, Hugh R. B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucoseregulated proteins. **Cell.**, 46 (7); 959-961, 1986.

PEREIRA, A. A. S., et. al. Detection of *Leishmania* spp in silvatic mammals and isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS One**, 27;12(11):e0187704, 2017.

QUARESMA, Patrícia F. **Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - DDIP-CPqRR, Minas Gerais, CDD – 22. ed. – 616.936 4, 2011.

QUARESMA, P.F.; RÊGO, F.D.; BOTELHO, H.A.; DA SILVA, S.R.; MOURA, A.J.; NETO, R.G.T. et al. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 105: 579–585, 2011.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Rangel EF, Lainson R (eds.) **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruz; 291-310, 2003.

RANGEL, E. F.; COSTA, S. M.; CARVALHO, M. B. Environmental Changes and the Geographic Spreading of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. In: Claborn DM, editor. **Leishmaniasis: trends in epidemiology, diagnosis and treatment**. Missouri: InTechOpen; 2014.

RAVEL, C., et. al. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. **Int. J. Parasitol**, 36:1383–1388, 2006.

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 Res**, 40; 1131-1147, 2012.

READ, A. F.; TAYLOR, L.H. The ecology of genetically diverse infections. **Science**, 292; 1099-1102, 2001.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J Clin Microbiol**, 451:21–5, 2007.

RODRIGUEZ-CONTRERAS, D.; HAMILTON, N. Gluconeogenesis in *Leishmania mexicana*: Contribution of Glycerol Kinase, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Pyruvate Phosphate Dikinase. Department of Molecular Microbiology & Immunology, Oregon Health & Science University. **JBC Papers in Press**, 2014.

ROGERS, M.B., et. al., Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res**, 12; 2129-2142, 2011.

ROMANO, A., et. al. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Nov 25;111(47):16808-13, 2014.

ROMERO, G. A., et. al. Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two year follow-up. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 31, 511–516, 1998.

ROMERO, G. A., et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg*, v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.

ROQUE, A.L.; JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the America. **Int. J. Parasitology Parasites and Wildlife** 3: 251-262, 2014

ROUGERON, V., et. al. “Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)” in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. **PLoS Pathogens**. 6: e1001004, 2010.

ROUGERON, V.; DE MEEÛS, T.; BAÑULS, A. L. Response to Tibayrenc et al.: Can recombination in *Leishmania* parasites be so rare? **Trends in Parasitology** 31: 280-281, 2015.

RUGANI, Jerônimo M. N. Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Minas Gerais, Brasil. Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) - MBCM-CPqRR, Minas Gerais, CDD – 22. ed. – 616.936 4, 2015.

SABROZA, Paulo. C. **O domicílio como fator de risco na leishmaniose tegumentar americana. Estudo epidemiológico em Jacarepaguá, Município do Rio de Janeiro.** Dissertação de Mestrado — Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1981.

SAIKI, R. K., et. al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 20;230(4732):1350-4, 1985.

SANTOS, I. B., et al. Sporotrichosis: the main differential diagnosis with tegumentary leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet Parasitol**, 19;143(1):1-6, 2007.

SATO, H., et. al. Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium thiomalate and auranofin. **Biochem Pharm**, 49(10):1453-7, 1995.

SCHALLIG, H. D. F. H., et. al. *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): a potential reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). **Vector-Borne Zoon Dis**, 7: 387–393, 2007.

SCHRIEFER, A., et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis**, 15(6): 871-876, 2009.

SCHUBACH, T.M.P., et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 98(3):165-7, 2004.

SCHÖNIAN, G., et. al. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. **Mol. Biochem. Parasitol**. 106:239-248, 2000.

SCHÖNIAN, G., et. al., PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, 47(1); 349-358, 2003.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology p. 1-21 Cambridge University Press** 2010a.

SCHÖNIAN, G.; MAURÍCIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. **Trends Parasitol.**, 26; 466-469, 2010b.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology** 138: 405–425, 2011.

SCHULTE, P.A.; PERERA, F.P. Molecular epidemiology: principles and practices. **Academic Press**, 1993.

SHABIHKHANI, M., et. al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. **Clinical biochemistry**, 47(4-5), 258–266, 2014.

SHAW, J. J., et. al. "Aconitate Hydratase (ACON), an Enzyme That Distinguishes *Leishmania* of the Subgenus *Viannia* from Other Trypanosomatids." **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 85 (5): 597–98, 1991.

SHIMABUKURO, P. H. F., et. al. Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. **Parasit Vectors**, 3:121, 2010.

SIMÕES-MATTOS, L., et al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, 127(3-4):199-208, 2005.

SILVA, A.C.; GOMES, A. C. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 34: 187-191, 2001.

SILVA, S.; GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitol**; 21(12), 550-552, 2005.

SILVA, L. A., et. al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Inf.Genetics and evolution**, 10 77-83, 2010.

TESFAYE, G., et. al. Multilocus sequence and microsatellite identification of intra-specific hybrids and ancestor-like donors among natural Ethiopian isolates of *Leishmania donovani*. **International Journal for Parasitology**. 44 (2014) 751–757, 2014.

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

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends Parasitol.**, 18(9); 405-410, 2002.

TONELLI, G., et. al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild small mammals in ecotourism area of Brazil. **PLoS One**, 12(12): e0190315, 2017.

TSOKANA, C., et. al. Molecular diagnosis of leishmaniasis, species identification and phylogenetic analysis. In: Claborn DM, editor. Leishmaniasis: trends in epidemiology, diagnosis and treatment. Missouri: **InTechOpen**; 2014.

TSUKAYAMA, P.; LUCAS, C.; BACON, D. J. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. **Int J Parasitol** 39: 355–362, 2009.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, 80 (4), 421-428, 2005.

VAN BELKUM, A., et. al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical microbiology reviews**, 14(3):547-60, 2001.

VANDAMME Anne-Mieke. Basic Concepts of Molecular Evolution. In: Salemi M. (Ed). *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. 2nd edn. **Cambridge University Press**, 1-23, 2009.

VAN DER AUWERA, G., et. al. *Leishmania* taxonomy up for promotion? **Trends in Parasitology**, 27(2), 49–50, 2011.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDIN, J.C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 28, pp. 265-294, 2015.

VAN-EYS, G. J. J. M., et. al.. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 51,133-142, 1992.

VICKERMAN, Keith. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal for Parasitology**, 24(8), 1317–1331, 1994.

VICTOIR, K., et. al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. **Parasitology**, 117 (1):1–13, 1998.

VOLPINI, A. C., et. al. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.* (*Leishmania*) *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, 90: 31-37, 2004.

WHO – World Health Organization. **Control of the leishmaniasis. Technical Report Series** 793, p. 158. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1990.

WHO – World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 (WHO Technical Report Series, nº 949). Geneva: **WHO Press**; 2010.

WHO – World Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Nº 7 – 2019. Department of Neglected Infectious Diseases. **WHO Press**; 7, 2019.

YOON, R.Y., et. al. Novel substrates of a ribose- 5-phosphate isomerase from *Clostridium thermocellum*. **J. Biotechnol.**,139; 26 - 32, 2009.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). **Mem. Am. Entomol. Inst.** 54, 881, 1994.

ZEMANOVA, E., et. al., Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 70(6); 613-617, 2004.

ZEMANOVA, E., et. al. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. **Int J Parasitol** 37: 149–160, 2007.

ZHANGL, W. W., et. al., Development of a Genetic Assay to Distinguish between *Leishmania Viannia* Species on the Basis of Isoenzyme Differences. **Clinical Infectious Diseases**, 42; 801-809, 2006.