

RICARDO ANDRADE ZAMPIERI

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS MOLECULARES
DE DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Leishmania* spp. E
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA O
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo
2013

Ricardo Andrade Zampieri

**Análise comparativa de métodos moleculares de detecção
e identificação de *Leishmania* spp. e desenvolvimento de
metodologia para o diagnóstico de leishmanioses**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zampieri, Ricardo Andrade.

Análise comparativa de métodos moleculares de detecção e identificação de *Leishmania* spp. e desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico de leishmanioses / Ricardo Andrade Zampieri. – São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Diagnóstico de leishmanioses.

Versão do título para o inglês: Comparative analyses of molecular methods for detection and identification of *Leishmania* spp. and development of methodology for leishmaniasis diagnosis.

1. Identificação de *Leishmania* 2. Alvos de DNA 3. Detecção de polimorfismos 4. PCR 5. HRM I. Shaw, Prof. Dr. Jeffrey Jon II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0227/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Andrade Zampieri.

Título da Análise comparativa de métodos moleculares de detecção e identificação de *Leishmania* spp. e desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico de leishmanioses.

Orientador(a): Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

À Thais, pelo amor, incentivo e cumplicidade.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw, pela disponibilidade em me orientar na execução deste trabalho e pelos ensinamentos.

À Prof. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos durante todo o tempo em que trabalhamos juntos, por toda ajuda e incentivos e pela amizade firmada em mais de uma década de convívio como chefe, professora e orientadora.

À Dra. Maria Fernanda Laranjeira da Silva pelo apoio, ensinamentos, sugestões e ajuda na execução deste projeto, pelas incontáveis horas de trabalho em equipe, pela convivência dentro e fora do laboratório, pelas risadas de graça e de nervoso, pelos choros de tristeza e de alegria, pelas discussões profissionais sérias e as de relação, enfim, pela amizade sincera.

Ao Dr. Marcos Gonzaga dos Santos, pelo apoio, sugestões e ajuda na execução deste projeto, pela intensa convivência e amizade, pelos ensinamentos, pelas conversas, risadas e cumplicidade.

À Dra. Sandra Márcia Muxel, por toda ajuda e sugestões relacionadas a este trabalho, pela harmoniosa convivência, pela forte parceria no gerenciamento do BatLab e pela amizade.

Aos meus colegas de trabalho do BatLab Carolina Lima Jorge, Maria Carmen O. Pinho Sales e Ana Carolina Stocco de Lima, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por dividirem experiências da vida de pós-graduandos. Também aos colegas do BatLab que, mesmo antes do meu ingresso na pós-graduação, muito me ensinaram, principalmente Dra. Valeska de Andrade Stempliuk e Dr. Thiago Moreno Castilho.

À Silvia Ferreira Camargo, sempre muito acessível e disponível para facilitar todos os trâmites da pós-graduação, pela atenção, dedicação e comprometimento profissional, e pelas agradáveis conversas sobre força de vontade e superação.

À Roseli Silva Santos pelo apoio e dicas sobre os procedimentos burocráticos para realização da pós-graduação; à Fernanda Rossati França pelo cuidado e ética

dispensados aos animais experimentados neste trabalho. A ambas pela amizade cultivada durante os anos como colegas de departamento.

Aos membros da banca examinadora de qualificação Dra. Maria Carolina Q. B. E. Sabbaga, Dra. Thelma Suely Okay e Dra. Rosely dos Santos Malafronte pela disponibilidade e pelas tão relevantes contribuições.

Aos meus pais José Tadeu Zampieri e Maria da Conceição Andrade Zampieri por tudo, desde sempre. Aos meus irmãos Renata Andrade Zampieri e Rodrigo Andrade Zampieri pelo companheirismo e amor. Aos meus tão queridos sobrinhos Lucas Zampieri Soares e Giovana Zampieri Soares por me fazerem tão feliz. À minha prima Patrícia Cristina Andrade Pereira pelo eterno incentivo e carinho.

À minha mulher Thais Massanet, pelo apoio incondicional, pelo incentivo, companheirismo, paciência, pela grande ajuda em vários momentos da realização deste trabalho, pelo amor e pelos meus filhos, novos projetos de vida (em construção).

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“...Sim, pejeja sim! Coração em busca de beleza. Corre, anda, rasteja, só não deixa fugir a vida que te beija...”

ALICE RUIZ

RESUMO

ZAMPIERI, R. A. **Análise comparativa de métodos moleculares de detecção e identificação de *Leishmania* spp. e desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico de leishmanioses.** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As leishmanioses são doenças que acometem cerca de 2 milhões de pessoas em 88 países e representam um sério problema de saúde pública. No Brasil, sete espécies de *Leishmania* são reconhecidas como os agentes etiológicos dessas doenças e, nesse contexto, um diagnóstico diferencial preciso se torna extremamente relevante na compreensão de perfis epidemiológicos e na administração de protocolos terapêuticos. O emprego de técnicas que utilizam o DNA do parasita como alvo de detecção e identificação tem sido descrita como estratégia diagnóstica em diversos trabalhos. O presente trabalho tem como objetivos avaliar condições de coleta e armazenamento de material biológico destinado a testes de diagnóstico para leishmaniose, avaliar métodos de extração e purificação de DNA e desenvolver protocolos robustos de detecção, quantificação e identificação das espécies de *Leishmania* responsáveis pelos casos da doença no Brasil. Para isso, foram testados três soluções de conservação de amostras: PBS, NET e etanol 70%; e três protocolos de extração de DNA: *kit* comercial de colunas de sílica, precipitação proteica por *salting-out* e extração orgânica com fenol-clorofórmio. Amostras obtidas de infecção experimental de camundongos BALB/c com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, submetidas aos tratamentos de conservação e métodos de extração citados, foram utilizadas em ensaios de PCR em tempo real para detecção e quantificação dos alvos SSU rDNA do parasita e *gapd* de mamífero. O DNA dessas amostras, submetidas ao tratamento com NET, produziu maiores quantidades de amplicons dos alvos testados e o método de extração não influenciou a qualidade dos testes. Três alvos de DNA diferentes foram testados com relação à sensibilidade de testes de detecção por PCR convencional: SSU rDNA, *g6pd* e kDNA. Os resultados de maior sensibilidade e especificidade foram alcançados com a utilização do SSU rDNA como alvo. Além disso, o emprego da técnica de *nested* PCR utilizando este alvo mostrou-se sensível o suficiente para detectar *L. (L.) amazonensis* quando 10 ag de DNA do parasita foram utilizados como molde. A utilização simultânea de oligonucleotídeos complementares ao SSU rDNA e *g6pd* de *Leishmania* e *gapd* de mamíferos foi capaz de, em uma única reação, detectar parasitas, discriminar subgênero e verificar a presença de DNA amplificável em amostras com misturas de DNA de parasitas e hospedeiro. Para o desenvolvimento de uma metodologia de identificação, foram realizadas tentativas de aplicação da técnica de LCR, porém os resultados obtidos não foram satisfatoriamente precisos na discriminação de polimorfismos no gene SSU rDNA entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Por outro lado, a aplicação da técnica de HRM sobre polimorfismos no SSU rDNA foi bastante precisa na discriminação de *L. (L.) chagasi* entre as outras espécies testadas. Ainda com a aplicação desta técnica, polimorfismos no gene *g6pd* foram detectados e permitiram a discriminação de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e as demais espécies do subgênero *L. (Viannia)* pelos distintos perfis de dissociação dos amplicons. Assim, este trabalho propõe protocolos

otimizados de conservação de amostras biológicas, extração de DNA e ensaios de identificação de *Leishmania*, testados sistematicamente em amostras padronizadas.

Palavras-chave: Identificação de *Leishmania*. Alvos de DNA. Detecção de polimorfismos. PCR. HRM.

ABSTRACT

ZAMPIERI, R. A. **Comparative analysis of molecular methods for detection and identification of *Leishmania* spp. and development of methodology for leishmaniasis diagnosis.** 2013. 78 p. Masters thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Leishmaniasis are diseases that affect around 2 million people in 88 countries and represent a serious public health problem. In Brazil, seven *Leishmania* species are recognized as etiologic agents of these diseases. Therefore an accurate differential diagnosis is extremely relevant for the comprehension of epidemiological profiles and administration of therapeutic protocols. The employment of techniques using parasite DNA as target for detection and identification has been described as diagnostic strategy in several works. The present work aims to evaluate sample collection and storage conditions for leishmaniasis diagnosis tests, evaluate DNA extraction and purification methods and develop precise protocols for detection, quantification and identification of *Leishmania* species responsible for the disease in Brazil. This way, were tested three solutions for sample conservation: PBS, NET and ethanol 70%; and three DNA extraction protocols: commercial kit of silica columns, salting-out protein precipitation and phenol-chloroform extraction. The samples from BALB/c mice experimentally infected with *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis*, submitted to the described conservation treatments and extraction methods, were used in real time PCR assays for detection and quantification of parasite SSU rDNA and mammal *gapd*. The DNA of samples submitted to NET treatment produced higher amounts of target amplicons and the extraction method did not influence the test quality. Three different DNA targets were evaluated regarding sensitivity for conventional PCR detection: SSU rDNA, *g6pd* and kDNA. The higher sensitivity and specificity were reached when SSU rDNA was used as target. Besides, the use of nested PCR technique using the same target revealed to be sensitive enough to detect 10 ag of *L. (L.) amazonensis* DNA. In parasite/host mixture DNA samples, the simultaneous utilization of *Leishmania* SSU rDNA and *g6pd*, and mammalian *gapd* enabled parasite detection and subgenus discrimination, besides verification of amplifiable DNA presence. For the development of a new identification method, attempts to apply LCR technique were performed, but the obtained results did not provide accuracy for discrimination of *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) chagasi* SSU rDNA polymorphisms. Moreover, the application of HRM methodology exploring SSU rDNA polymorphisms proved to be quite accurate to discriminate *L. (L.) chagasi* among others tested species. HRM methodology also discriminated *g6pd* polymorphisms, allowing the *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and other *L. (Viannia)* species discrimination by distinct amplicons dissociation profiles. So, the present work proposes optimized protocols for sample conservation, DNA extraction and identification assays of *Leishmania*, systematically tested in standardized samples.

Keywords: *Leishmania* identification. DNA targets. Polymorphisms detection. PCR. HRM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Quantificação do alvo <i>gapd</i> do hospedeiro em 50 ng de DNA obtido de amostras de tecidos de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	45
Figura 2. Quantificação do alvo SSU rDNA do parasita no DNA obtido de amostras de lesões cutâneas de camundongos infectados experimentalmente	46
Figura 3. Quantificação do alvo SSU rDNA do parasita no DNA obtido de amostras de tecidos de camundongos infectados experimentalmente com <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i>	47
Figura 4. Ensaio de sensibilidade em PCR com diferentes alvos de DNA	48
Figura 5. Esquema da estratégia utilizada na otimização de sensibilidade na detecção de DNA de <i>Leishmania</i> por PCR	49
Figura 6. Teste de sensibilidade de testes de PCR e <i>nested</i> PCR com o alvo SSU rDNA	50
Figura 7. Ensaio de PCR multiplex de detecção de <i>Leishmania</i> e identificação de subgênero do parasita	51
Figura 8. Esquema da estratégia utilizada para os ensaios de LCR	52
Figura 9. Gráfico de amplificação de PCR em tempo real precedida de LCR	53
Figura 10. Esquema das sondas utilizadas nos testes de LCR	54
Figura 11. Gráficos de amplificação do produto de LCR gerados a partir de sondas específicas para a detecção de <i>L. (L.) amazonensis</i>	55
Figura 12. Gráficos de amplificação do produto de LCR gerados a partir de sondas específicas para a detecção de <i>L. (L.) chagasi</i>	56
Figura 13. Composição nucleotídica dos amplicons analisados por HRM	58
Figura 14. Análise de HRM do alvo SSU rDNA de <i>Leishmania</i>	60
Figura 15. Análise de HRM do alvo <i>g6pd</i> de <i>Leishmania</i>	61

Figura 16. Proposta de algoritmo para o diagnóstico de leishmanioses	69
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos e sondas utilizados nos testes de detecção, quantificação e identificação de <i>Leishmania</i> spp	38
Tabela 2. Pares de oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR convencional, qPCR e HRM	39
Tabela 3. Quantificação espectrofotométrica de DNA extraído de lesões cutâneas geradas por infecção experimental de camundongos BALB/c por <i>L. (L.) amazonensis</i> ou <i>L. (V.) braziliensis</i>	44
Tabela 4. Temperatura média de dissociação dos amplicons gerados nos testes de HRM	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
<i>Cpb</i>	Cisteíno proteinase b
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
<i>g6pd</i>	Gene codificante da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase
<i>gapd</i>	Gene codificante da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanossulfônico
HRM	Dissociação em alta resolução
Hsp70	Proteína de Choque Térmico
ITS	Espaçador interno transcrito
kDNA	DNA de cinetoplasto
LCR	Reação de ligação em cadeia
NET	Tampão NaCl-EDTA-Tris
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativa
rDNA	Gene codificante do RNA ribossômico
RFU	Unidades relativas de fluorescência
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SL	<i>Spliced Leader</i>

SODE	Extração de DNA por <i>salting-out</i> de proteínas
SSU	Gene codificante da subunidade 18S do ribossomo
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
T _m	Temperatura média de fusão (<i>melting</i>)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
L	litro
m	metro
M	molar
min	minuto
°C	grau Celsius
pb	par de base
s	segundo
x g	unidade correspondente à aceleração normal da gravidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Leishmania spp.	20
1.2	Leishmanioses	21
1.3	Agentes etiológicos, vetores e hospedeiros	23
1.4	Diagnóstico de leishmanioses	26
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Organismos	33
3.1.1	<i><u>Leishmania</u> spp.</i>	33
3.1.2	<i>Camundongos</i>	33
3.1.3	<i>Bactérias</i>	33
3.2	Infecção experimental de camundongos por <i>Leishmania</i> spp.	34
3.3	Coleta e tratamento de amostras obtidas de infecção experimental	34
3.4	Extração de DNA genômico	34
3.4.1	<i>Extração de DNA genômico de <u>Leishmania</u> spp. em cultura</i>	34
3.4.2	<i>Extração de DNA genômico de tecidos obtidos de infecção experimental</i>	35
3.4.2.1	<i>Lise celular de tecidos de camundongos</i>	35
3.4.2.2	<i>Extração de DNA genômico com kit comercial</i>	35

3.4.2.3	Extração orgânica de DNA genômico com fenol-clorofórmio.....	36
3.4.2.4	Extração de DNA genômico por precipitação proteica por salting-out.....	36
3.5	Testes de detecção, quantificação e identificação de <i>Leishmania</i> spp.	36
3.5.1	<i>Oligonucleotídeos</i>	36
3.5.2	<i>Reações em cadeia da polimerase (PCR)</i>	37
3.5.3	<i>PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	37
3.5.3.1	Clonagem de fragmentos de DNA	37
<u>3.5.3.1.1</u>	<u>Vetor de clonagem</u>	37
<u>3.5.3.1.2</u>	<u>Ligação de fragmentos de DNA</u>	37
<u>3.5.3.1.3</u>	<u>Preparo de bactérias competentes e transformação bacteriana</u>	39
<u>3.5.3.1.4</u>	<u>Determinação das sequências nucleotídicas dos fragmentos de DNA</u>	39
3.5.3.2	Preparação de curvas de calibração	40
3.5.3.3	Ensaio de quantificação de DNA alvo	40
3.5.4	<i>Reação de ligação em cadeia (LCR)</i>	41
3.5.4.1	Fosforilação de oligonucleotídeos	41
3.5.4.2	Reação de ligação em cadeia	41
3.5.4.3	Deteção dos produtos de LCR por PCR em tempo real	41
3.5.5	<i>Análise de dissociação em alta resolução (HRM)</i>	42
3.6	Análise estatística	42

4	RESULTADOS	43
4.1	Determinação das melhores estratégias de acondicionamento de amostras biológicas e extração de DNA para a detecção do parasita por PCR quantitativa	43
4.2	Determinação do melhor alvo de DNA para detecção do parasita por PCR convencional	47
4.3	Desenvolvimento de estratégias para detecção e identificação de parasitas por PCR convencional	49
4.3.1	<i><u>Nested PCR</u></i>	49
4.3.2	<i>PCR Multiplex</i>	50
4.4	Desenvolvimento de protocolos para a identificação de parasitas	52
4.4.1	<i>Reação de ligação em cadeia (LCR)</i>	52
4.4.2	<i>Análise de Dissociação em Alta Resolução (HRM)</i>	57
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* spp.

Inicialmente descritos por Ross (1903), os organismos do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos das leishmanioses. São protozoários flagelados, exclusivamente parasitas, posicionados taxonomicamente da seguinte forma: Reino Protista; Sub-Reino Protozoa; Filo Sarcomastigophora; Sub-Filo Mastigophora; Classe Zoomastigophorea; Ordem Kinetoplastida; Sub-Ordem Trypanosomatina; Família Trypanosomatidae; Gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987).

As espécies do gênero *Leishmania* se classificam em dois subgêneros, definidos de acordo com as diferenças de comportamento dos parasitas no inseto vetor. O subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) compreende as espécies que se desenvolvem na porção anterior do tubo digestório do inseto vetor, crescem de forma rápida em meios de cultura e provocam lesões extensas nos hospedeiros vertebrados. O subgênero *Leishmania* (*Viannia*) agrupa as espécies que se desenvolvem na porção posterior do tubo digestório do vetor, crescem de forma lenta em meio de cultura e acometem o hospedeiro mamífero com lesões de desenvolvimento lento (LAINSON; SHAW, 1987). As espécies desses dois subgêneros são parasitas de mamífero, porém, há um terceiro grupo de organismos, separados taxonomicamente das demais espécies de *Leishmania*, compondo o subgênero *Leishmania* (*Sauroleishmania*), formado por espécies que parasitam lagartos e apresentam distribuição restrita nos países da Eurásia e África (SAF'JANOVA, 1982).

Desde a primeira descrição do gênero, em 1903 (ROSS, 1903), houve variações no número de espécies e nas posições taxonômicas, dependentes de critérios de classificação. Inicialmente essa classificação foi se definindo com base em critérios clínicos, biológicos, geográficos e epidemiológicos e, mais tarde, dados imunológicos e bioquímicos foram os critérios mais utilizados (SCHONIAN; MAURICIO; CUPOLILLO, 2010). Principalmente a partir da década de 1990, houve um notável crescimento na utilização de técnicas que têm por alvos ácidos nucleicos e assim, diversas sequências de DNA foram exploradas na investigação filogenética do gênero *Leishmania* (SCHONIAN; MAURICIO; CUPOLILLO, 2010).

O ciclo de vida de *Leishmania* é heteroxênico, isto é, o parasita se desenvolve em dois hospedeiros, um inseto vetor hematófago e um hospedeiro vertebrado. O inseto, conhecido como flebotomíneo, pertence à subfamília Phlebotominae, representada nas Américas por cerca de 470 espécies, das quais 10% são vetores ou potenciais vetores de leishmaniose, segundo estudos de infecção natural e/ou experimental (GALATI, 2003; LAINSON; SHAW, 2005). No repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo aspira, junto com o sangue, macrófagos infectados que liberam amastigotas no tubo digestório do inseto. As amastigotas são formas ovaladas, aflageladas, com dimensões de 2 a 6 μm de comprimento por 1,5 a 3 μm de largura que, no interior dos macrófagos, têm como hábitat os fagolisossomos, estruturas celulares formadas pela fusão do fagossomo e do lisossomo. As amastigotas então se diferenciam em promastigotas, formas alongadas, flageladas, com dimensões entre 14 e 20 μm de comprimento por 1,5 a 4 μm de largura (REY, 2001).

Quando atingem alta densidade populacional, as formas promastigotas procíclicas migram para as porções anteriores do tubo digestório do vetor se diferenciando em promastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas. Essas formas se acumulam na probóscide do inseto e no repasto sanguíneo seguinte, as formas infectivas são inoculadas em novo hospedeiro vertebrado, sendo fagocitadas por macrófagos residentes no tegumento, no interior dos quais se diferenciam em formas amastigotas (REY, 1992).

1.2 Leishmanioses

Leishmaniose é o termo genericamente empregado para designar as doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. As diferentes formas de leishmaniose são antroponoses de grande importância na saúde pública, e representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e epidemiologia diversa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013), o número de pessoas acometidas pela doença é de cerca de 12 milhões, em 88 países da África, Ásia, América e Europa. Cerca de 350 milhões de pessoas constitui a população potencialmente sob o risco de contrair

leishmanioses, vivendo em áreas de transmissão e, anualmente, o número estimado de novos casos é de 2 milhões.

Sob a ótica clínica, as leishmanioses são divididas em dois principais grupos, denominados leishmanioses tegumentares e leishmaniose visceral. As formas tegumentares são consideradas clinicamente menos graves, visto que seus efeitos são delimitados a mucosas e/ou pele, porém podem resultar em quadros desfigurantes e graves, com a destruição de palato e septo nasal, por exemplo. As leishmanioses tegumentares em geral, são doenças de evolução crônica, não contagiosas, que acometem de forma localizada ou difusa estruturas da pele e nasofaringe (BASANO; CAMARGO, 2004).

A leishmaniose visceral, também denominada calazar, é potencialmente mais grave, acomete o sistema linfo-monocitário de forma sistêmica, muitas vezes com evolução fatal, quando não tratada de forma adequada, o que ocorre em cerca de 10% dos casos (GONTIJO; MELO, 2004).

Sob um foco ecológico, segundo (COSTA, 2005), as leishmanioses são caracterizadas como doenças em que o meio ambiente exerce um importante papel dentro da tríade epidemiológica agente – meio ambiente – hospedeiro, sendo passíveis de ocorrerem de acordo com fatores ambientais como geografia física, fauna flebotomínica e espécies de reservatórios vertebrados presentes na área. O aparecimento da enfermidade no homem é relacionado com seu contato com o ambiente silvestre, onde o ciclo do parasita está naturalmente instalado. Em situações de desequilíbrio ambiental, gerado por adensamento populacional junto às áreas de florestas, observa-se a adaptação de vetores e reservatórios a ambientes peridomiciliares ou domiciliares, com a inclusão accidental do homem no ciclo. As dinâmicas de transmissão de leishmaniose, quando analisadas sob um enfoque ecológico, podem assumir três padrões distintos caracterizados pelo tipo de interação entre o homem e o meio ambiente:

I) ciclos puramente silvestres que ocorrem com surtos epidêmicos associados à degradação ambiental causada. Por exemplo, por construção de estradas e povoamento de áreas intactas, além da exploração desordenada dessas áreas para agricultura, mineração e extração de madeira e outros recursos naturais;

II) ciclos silvestres modificados, caracterizados pela ocorrência de surtos sazonais em áreas com mata primária residual, que se instalam na interface mata/peridomicílio, flutuando de acordo com variações populacionais de flebotomíneos;

III) ciclo peri-urbano de transmissão da doença que se dá em áreas de colonização antiga com a participação de animais domésticos como reservatórios da infecção.

Epidemiologicamente as leishmanioses devem ser entendidas separadamente: por um lado as formas tegumentares, de outro, a forma visceral da doença. Nas Américas, a leishmaniose tegumentar está distribuída desde o norte da Argentina ao sul dos Estados Unidos e é causada por onze espécies de *Leishmania* (COSTA, 2005). Essa forma da doença é atualmente distribuída em todo o território brasileiro, com registros em todos os estados federativos (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Casos autóctones de leishmaniose visceral, causados pela espécie *L. (L.) infantum chagasi*, foram registrados em 19 dos 27 estados brasileiros, sendo a maioria na região Nordeste (GONTIJO; MELO, 2004). Porém, a partir da década de 1990, as regiões Norte, Centro Oeste e Sudeste passam a ter influência significativa nas estatísticas da leishmaniose visceral no país (COSTA, 2005).

1.3 Agentes etiológicos, vetores e hospedeiros

No Brasil existem seis espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose tegumentar no homem: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*, e mais de 200 espécies de flebotomíneos envolvidos em sua transmissão (BASANO; CAMARGO, 2004).

A espécie *L. (L.) amazonensis* é responsável pelo desenvolvimento, no homem, das leishmanioses tegumentares cutânea e difusa. Apresenta-se distribuída principalmente em áreas de florestas primárias e secundárias da bacia amazônica (Amazonas, Pará, Rondônia e Maranhão) além dos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia. Os principais hospedeiros silvestres conhecidos são os roedores *Proechimys* sp., *Dasyprocta* sp., *Nectomys* sp., *Neacomys* sp., os marsupiais

Didelphis sp., *Marmosa* sp. e *Philander* sp., além da raposa *Cerdocyon thous*. Tem como principais vetores os flebotomíneos *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lu. olmeca* (BASANO; CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Até meados da década de 1960, a existência de hospedeiros reservatórios naturais de *L. (V.) braziliensis*, responsável por formas cutânea e cutâneo-mucosa de leishmaniose, era questionada. Nessa época, as pesquisas eram limitadas a observações em animais domésticos que, em função da raridade de detecção dos parasitas, não eram considerados reservatórios epidemiologicamente importantes do parasita e, por isso, esse papel era atribuído ao homem doente. Porém, com o surgimento de novas abordagens na pesquisa epidemiológica, estudos começaram a demonstrar que as zonas endêmicas estavam intimamente relacionadas a áreas florestais preservadas, escassamente habitadas, evidenciando que a doença não deveria ser primariamente humana e sim de espécies silvestres. Assim, para o rastreamento de espécies que naturalmente servem de reservatórios de parasitas, hemoculturas de amostras silvestres começaram a ser realizadas, principalmente de roedores e marsupiais, quando os primeiros resultados começaram a indicar os hospedeiros naturais de *L. (V.) braziliensis* nas Américas do Sul e Central (FORATTINI, 1960). Na segunda metade da década de 1990, um estudo minucioso reforçou a hipótese de que algumas espécies de mamíferos silvestres são reservatórios primários de *L. (V.) braziliensis*, através da detecção por PCR do parasita em roedores e marsupiais silvestres das espécies *Necomys lasiurus*, até recentemente denominada *Bolomys lasiurus* (MASSOIA; PARDIÑAS, 1993), *Nectomys squamipes*, *Rattus rattus*, *Akodon arviculoides*, *Didelphis albiventris*, *Holochilus sciurus* e *Marmosa* sp. (BRANDÃO-FILHO et al., 2003). Além desses, na transmissão peridoméstica, cavalos, jumentos, cães e gatos podem apresentar-se como hospedeiros acidentais. Entre seus vetores incluem-se os flebotomíneos *Psychodopygus wellcomei*, *Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia* e *Lu. carrerai* (BASANO; CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Também responsáveis pela forma tegumentar cutânea de leishmaniose no Brasil, em especial na região amazônica, são as espécies *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) shawi*. *L. (V.) guyanensis* tem, conhecidamente como hospedeiros vertebrados, o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), a preguiça

(*Choloepus didactylus*), o marsupial *Didelphis* sp. e o roedor *Proechimys* sp. Seus vetores são os flebotomíneos *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. Whitmani*. *L. (V.) naiffi* tem como principal hospedeiro vertebrado o tatu (*Dasypus novemcinctus*) e tem como vetores pelo menos três espécies do gênero *Psychodopigus*. A espécie *L. (V.) lainsoni* tem como hospedeiro vertebrado silvestre a paca (*Agouti paca*) e tem como vetor o flebotomíneo *Lu. Ubiquitalis*. *L. (V.) shawi* parasita macacos (*Cebus apella*, *Chiropotes satanás*), preguiças (*C. didactylus*, *Bradypus tridactylus*) e quatis (*Nasua nasua*), e tem como vetor o flebotomíneo *Lu. whitmani* (BASANO; CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

A espécie *L. (L.) infantum chagasi* é a responsável pelos casos de leishmaniose visceral no território brasileiro. A nomenclatura dessa espécie é resultado de uma discussão importante sobre a origem do parasita (DANTAS-TORRES, 2006). Para alguns autores, *L. (L.) chagasi* é sinônima de *L. (L.) infantum* e foi trazida ao continente americano durante a colonização portuguesa e europeia (KILLICK-KENDRICK, 1985; RIOUX et al., 1990). Por outro lado, outros pesquisadores acreditam que a existência de *L. (L.) chagasi* nas Américas é anterior à colonização e, por serem distintas, foram separadas em duas subespécies: *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* (LAINSON; RANGEL, 2005). *L. (L.) i. chagasi* tem como vetores pelo menos dois flebotomíneos: *Lu. (Lu.) longipalpis* e *Lu. cruzi*, e como hospedeiros silvestres marsupiais do gênero *Didelphis* e raposas de duas espécies descritas, *Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus* (COSTA, 2005; DOS SANTOS et al., 1998; GONTIJO; MELO, 2004; LAINSON et al., 1990). Porém, em função das mudanças ocorridas nos ciclos de infecção, a introdução de animais domésticos nesses ciclos tem sido observada. Cães infectados, mesmo assintomáticos, têm papel efetivo na transmissão do parasita como fonte de infecção (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001).

As leishmanioses tegumentares e visceral em gatos também têm sido reportadas em várias partes do mundo, fato que sugere que estes felinos tenham participação nos ciclos da doença desempenhando o papel de hospedeiro acidental em centros urbanos (HERVÁS et al., 1999; MORSY; ABOU EL SEOUD, 1994; OZON et al., 1998; PASSOS et al., 1996; POLI et al., 2002; SAVANI et al., 2004).

1.4 Diagnóstico de Leishmanioses

O amplo espectro clínico é um fator que dificulta os processos diagnósticos das leishmanioses. Contudo, um diagnóstico diferenciado, além de promover maior eficácia no tratamento dessas doenças, discrimina essas patologias de outras, muitas vezes endêmicas nas mesmas áreas, de aspectos clínicos semelhantes (por exemplo, hanseníase, tumores de pele, tuberculose, com sinais clínicos semelhantes à forma cutânea de leishmaniose, ou malária e esquistossomose, semelhantes à forma visceral). Também, a severidade das leishmanioses e suas respostas às intervenções terapêuticas mostram-se variáveis, dependendo das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção e até mesmo dependendo de cepas diferentes da mesma espécie (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Além disso, a correta identificação dos agentes etiológicos das leishmanioses é fundamental em estudos epidemiológicos, ecológicos, clínicos, e farmacológicos entre outros.

O diagnóstico clínico das leishmanioses é baseado em critérios fisiopatológicos e em aspectos e localização das lesões causadas pela doença. A forma visceral, por exemplo, tem diagnóstico clínico indicativo em todo indivíduo com febre e esplenomegalia, proveniente de área com registros de transmissão da doença. As leishmanioses tegumentares são clinicamente diagnosticadas quando apresentam suas manifestações clássicas: formas cutânea ou mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; REITHINGER et al., 2007).

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses é baseado na demonstração da presença do agente, ou seja, na busca direta por microscopia, por cultivo de material biológico em meio apropriado para o crescimento do parasita ou pela detecção de biomoléculas do parasita, como ácidos nucleicos e proteínas; ou indiretamente, pela detecção de antígenos produzidos pelo hospedeiro contra o parasita.

A metodologia clássica empregada na identificação de *Leishmania* inclui reações por anticorpo monoclonal e perfis de isoenzimas (CHANCE; PETERS; SHCHORY, 1974; MCMAHON-PRATT; BENNETT; DAVID, 1982). Esses métodos dependem do estabelecimento em cultura de parasitas e se baseiam na expressão fenotípica das diferentes espécies. O desenvolvimento das técnicas que utilizam anticorpos monoclonais revolucionou a discriminação das espécies do gênero

Leishmania (MCMAHON-PRATT; BENNETT; DAVID, 1982). Porém, existem limitações na produção de anticorpos e o processo de identificação deve incluir certa variedade de anticorpos distintos para produzir um resultado confiável. Além disso, a maioria dos anticorpos empregados reconhece apenas antígenos presentes nas formas promastigotas do parasita, não expressos nas formas amastigotas, o que torna necessário o estabelecimento de cultura de células (FLOETER-WINTER, 2010). A obtenção de uma cultura de parasitas originada de material de biópsia não é uma tarefa fácil. Muitas vezes ocorre a contaminação da cultura, pela presença de outros organismos oportunistas na lesão.

As características genéticas estão codificadas nas moléculas de DNA. Considerando que todos os organismos têm uma origem comum e, portanto, estão relacionados entre si, parte da informação genética é comum entre vários grupos de organismos. Contudo, uma parte do genoma compõe um perfil específico, obtido pela evolução, característico das diferentes espécies. De uma maneira geral, as moléculas empregadas como alvos na detecção e identificação de organismos são altamente conservadas entre as diferentes espécies, por terem importante função biológica e assim, estarem sobre uma alta pressão de seleção (FLOETER-WINTER, 2010). Tibayrenc e Ayala (1991), propuseram uma teoria de que protozoários parasitas se reproduzem essencialmente de forma clonal, o que não implica a ausência de recombinações genéticas, e que as características genéticas individualizadas seriam extremamente aparentadas entre esses organismos. Regiões do DNA desses organismos podem servir, por isso, como importantes marcadores evolutivos, apresentando baixas variações em suas estruturas e permitindo, muitas vezes, a sua discriminação específica por meio da exploração da presença de mutações.

A atual disponibilidade de bancos de informações biológicas tais como sequências nucleotídicas originadas do sequenciamento de genomas, sequências preditas de peptídeos e acervos de modelos estruturais de proteínas, tem permitido a escolha de uma grande diversidade de alvos para a detecção específica de diferentes patógenos. Diferentes métodos com abordagens moleculares que exploram características específicas do DNA de parasitas têm sido testados para o diagnóstico das leishmanioses. Inicialmente, as análises de padrões de fragmentos

gerados por enzimas de restrição, RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*), foram o método que empregou o DNA como alvo de informação na identificação de *Leishmania* e de outros tripanossomatídeos (CAMARGO et al., 1992; DIETRICH et al., 1990; MOREL et al., 1980). Outro tipo de análise de genótipos explorado foi a construção de sondas utilizadas em testes de hibridação molecular. Esta técnica foi empregada tanto em estudos discriminatórios entre espécies fortemente relacionadas como para o diagnóstico de infecções (ULIANA et al., 1991, 1994). A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que amplifica por PCR fragmentos com iniciadores aleatórios, também foi uma técnica adotada para analisar padrões específicos capazes de discriminar os organismos do gênero *Leishmania* (MACEDO et al., 1992; SCHONIAN et al., 1996). Em função de inúmeras vantagens, os testes baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) são as principais ferramentas utilizadas na detecção e identificação de *Leishmania*. Essa metodologia permite, além da utilização de ínfimas quantidades de material biológico, a discriminação específica de organismos pela análise de polimorfismos dos alvos. Diferentes técnicas baseadas em PCR têm sido empregadas na identificação de *Leishmania* por apresentarem vantagens como a rapidez e sensibilidade e especificidade altas, quando comparadas às técnicas convencionais baseadas em microscopia e cultura de células (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Diversas sequências de DNA têm sido utilizadas como alvo para a identificação específica de *Leishmania*, como o DNA do cinetoplasto (kDNA) (LOPEZ et al., 1993), o DNA ribossômico (rDNA) (ULIANA et al., 1991, 1994), o gene *g6pd*, entre outros alvos (CASTILHO; SHAW; FLOETER-WINTER, 2003; CASTILHO et al., 2008).

O kDNA compõe cerca de 25% do DNA do parasita e é formado por uma rede de moléculas circulares concatenadas, os maxicírculos e minicírculos. Por organismo, são encontrados entre 10 mil e 20 mil minicírculos com tamanho de 0,5 a 2,5 kb e cerca de 50 maxicírculos de 20 a 35 kb que codificam proteínas mitocondriais e RNA ribossômico da organela (CORTES et al., 2004; TELLERIA et al., 2006). Entre os alvos descritos na literatura científica, o kDNA está entre os mais utilizados no diagnóstico molecular. O elevado número de cópias do alvo por

genoma garante alta sensibilidade e constitui a principal vantagem da técnica. Porém, a acurácia dos ensaios pode ser afetada pela considerável heterogeneidade que as sequências de kDNA apresentam (SILVA et al., 2010).

A caracterização de cistrons ribossômicos de diversos tripanossomatídeos viabilizou a descrição de sondas capazes de identificar alguns organismos. A princípio foi demonstrada a existência de polimorfismo nas sequências espaçadoras de genes ribossômicos em *Trypanosoma* (DIETRICH et al., 1990). A caracterização de cistrons ribossômicos de seis espécies de *Leishmania* mostrou um padrão característico dessas espécies pontuado pela existência de um sítio de restrição reconhecido pela enzima *PvuII*. Esse sítio, presente na sequência codificadora do rRNA 18S ou SSU, foi explorado na construção de oligonucleotídeos capazes de identificar o gênero (ULIANA et al., 1991). Com base em polimorfismos na sequência desse mesmo gene, foram descritas sondas que puderam ser utilizadas na identificação de diferentes grupos de *Leishmania* (ULIANA et al., 1994). O sequenciamento de amplicons desse segmento gênico tem sido empregado na identificação de *Leishmania*. Dois pontos de mutação são encontrados nas posições 1714 e 1721 da sequência SSU rDNA, são capazes de discriminar *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (Viannia) spp.* Baseados nessa estratégia, diversos trabalhos, explorando as características polimórficas do SSU rDNA, foram realizados com abordagens distintas, focando aspectos clínicos, epidemiológicos, ecológicos, entre outros (AMATO et al., 2009; BACHA et al., 2011; GARCEZ et al., 2009; SAVANI et al., 2004, 2009; TUON et al., 2007; ULIANA et al., 2000).

Entre as técnicas de identificação molecular mais utilizadas, pode-se destacar as análises eletroforéticas de isoenzimas, também denominadas zimodemas. A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma das principais enzimas utilizadas na identificação de *Leishmania* por análise de zimodemas. O polimorfismo na estrutura dessas proteínas é reflexo de polimorfismos em nível gênico, o que tornou possível o emprego de marcadores moleculares capazes de discriminar e quantificar *Leishmania* por PCR convencional e em tempo real (CASTILHO; SHAW; FLOETER-WINTER, 2003; CASTILHO et al., 2008).

Além desses, outros alvos de DNA descritos na literatura, como os ITSs presentes no cistron de rDNA (*Internal Transcribed Spacers*), o gene Hsp70 (*Heat*

Shock Protein), o gene *cpb* (Cysteine Proteinase), entre outros, têm sido explorados em testes de identificação de *Leishmania*, com base nas características polimórficas do DNA (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

A utilização simultânea de alvos diferentes também tem sido utilizada em reações de PCR convencionais com o objetivo de discriminar os patógenos das leishmanioses. A combinação de oligonucleotídeos desenhados a partir da sequência do gene que codifica o mini-exon adicionado por *trans*-splicing a todos os RNA mensageiros de tripanosomatídeos, o SL RNA, foi descrita como capaz de discriminar, em uma única reação de PCR, as espécies causadoras da forma visceral da doença em um grupo e as espécies responsáveis pela forma tegumentar da doença em outros dois grupos, distintos por incluírem espécies dos subgêneros *L. (Leishmania)* ou *L. (Viannia)* (HARRIS et al., 1998; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006).

A estratégia de combinar mais de um alvo de DNA também tem se mostrado útil na identificação simultânea de vetores e do parasita contido em seu trato digestório em amostras de insetos coletados em campo. Esse tipo de abordagem permitiu a incriminação de diferentes espécies como vetores naturais de *Leishmania* spp. com a amplificação simultânea de alvos específicos de insetos e de parasitas (PITA-PEREIRA et al., 2005, 2008, 2011).

Recentemente alguns trabalhos descreveram a discriminação de espécies causadoras de leishmaniose nos continentes europeu, africano e asiático pela aplicação de análises de HRM (*High Resolution Melting*), método capaz de detectar diferenças na composição nucleotídica de produtos específicos de PCR. Com o uso dessa técnica, o gene 7SL RNA foi utilizado como alvo capaz de discriminar *L. tropica*, *L. major* e as espécies causadoras da forma visceral em amostras clínicas, com sensibilidade e especificidade superiores aos testes de detecção e identificação que utilizam PCR com os alvos ITS1 e kDNA (NASEREDDIN; JAFFE, 2010). Na Tunísia, o roedor *Ctenodactylus gundi* foi incriminado como potencial hospedeiro de *L. tropica* com o emprego de testes de HRM capazes de distinguir essa espécie de *L. major*, utilizando também como alvo polimorfismos no gene 7SL RNA (BOUSSLIMI et al., 2012). Polimorfismos de outro alvo, o HASPB (*Hydrophilic Acylated Surface Protein B*), foram detectados com o emprego de análises de curvas

de dissociação. A amplificação de um fragmento desse gene gerou amplicons com diferenças detectáveis por HRM em diferentes cepas de *L. donovani*, de diferentes regiões do leste africano o que permitiu a indicação desse gene como potencial alvo de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose (ZACKAY et al., 2013).

A utilização de mutações pontuais, inserções e deleções de nucleotídeos como alvo na detecção de variantes genéticas tem sido aplicada em diversas áreas de pesquisa. Entre as metodologias empregadas para esse fim, além das descritas acima, a reação de ligação em cadeia (LCR) é descrita como uma técnica extremamente sensível e específica e foi utilizada em estudos de marcadores genéticos relacionados ao câncer e na identificação de patógenos (WIEDMANN et al., 1994). Descrita por Barany (1991), a técnica consiste em ciclos térmicos consecutivos em que uma *Taq* DNA ligase, termoestável, catalisa a formação de uma ligação fosfodiéster entre as extremidades 5' e 3' de dois oligonucleotídeos justapostos que são complementares a um DNA alvo. A ligação ocorre somente se os oligonucleotídeos são perfeitamente complementares ao DNA molde. Uma única mutação, em que uma substituição de bases impeça o perfeito pareamento entre os oligonucleotídeos e o DNA molde, impede a ação da ligase e não ocorre a ligação dos fragmentos. Contudo, apesar da descrição de inúmeras vantagens dessa técnica, ela não é descrita na literatura como ferramenta de detecção e identificação de *Leishmania*, e foi testada no presente trabalho em tentativas de discriminar as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* com base em mutações pontuais no gene SSU rDNA.

Para a utilização de uma metodologia para o diagnóstico de leishmanioses em larga escala, características como baixo custo, simplicidade operacional e automatização devem ser consideradas. Nesse contexto, o desenvolvimento de protocolos robustos de identificação desses patógenos se torna indiscutivelmente relevante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Com base na diversidade de estratégias encontrada na literatura para o diagnóstico de leishmanioses, este trabalho tem por objetivo principal avaliar a eficácia de algumas abordagens de detecção, quantificação e identificação de organismos do gênero *Leishmania*, por meio da amplificação *in vitro* de seu DNA por PCR, e desenvolver um protocolo prático para o diagnóstico de leishmanioses, utilizando amostras de DNA genômico de cepas certificadas de parasitas ou obtidas de lesões produzidas experimentalmente.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- I) avaliar procedimentos que produzam DNA com qualidade satisfatória para ensaios de detecção e identificação de organismos do gênero *Leishmania*, como métodos de conservação e de extração de DNA de amostras biológicas;
- II) avaliar a eficácia de alvos de DNA de *Leishmania* spp. que permitam discriminar gênero, subgêneros e/ou espécies, e determinar a sensibilidade e especificidade desses alvos na detecção e identificação dos patógenos das leishmanioses brasileiras;
- III) desenvolver um protocolo robusto capaz de identificar de forma precisa e relativamente simples espécies de *Leishmania* utilizando seu DNA como alvo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismos

3.1.1 *Leishmania* spp.

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (L.) chagasi* (MCER/BR/1981/M6445), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) e *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/84/M8408) foram cultivadas a 25 °C e repicadas semanalmente em meio M199 com sais de Earle; HEPES (40 mM), pH 7,4; adenina (0,1 mM); hemina (5 mg/L); penicilina (4550 U/mL); estreptomicina (0,05 mg/mL); soro fetal bovino (10%).

3.1.2 Camundongos

Camundongos BALB/c foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob condições preconizadas pelo Comitê de Ética do instituto. Todos os procedimentos realizados com os animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, protocolo nº 145 de 20/10/2011.

3.1.3 Bactérias

Bactérias *Escherichia coli* SURE™ (Stratagene, La Jolla, Califórnia, EUA) foram cultivadas em meio SOB (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 8,56 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM), a 37 °C. Para o preparo de meio semi-sólido, foi adicionado ágar para a concentração final de 1,5%. Para a seleção de bactérias transformadas se utilizou o antibiótico ampicilina a 100 µg/mL.

3.2 Infecção experimental de camundongos por *Leishmania* spp.

Infecções experimentais *in vivo* por cepas-referência de *Leishmania* spp. em camundongos BALB/c foram realizadas para produzir amostras para a extração de DNA. Essas amostras foram então preparadas variando-se o meio de acondicionamento do tecido e método de extração de DNA. Cerca de $1,0 \times 10^6$ promastigotas em fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* foram inoculadas por injeção intradérmica na região dorsal da pata posterior esquerda de 10 camundongos por espécie de parasita. Aos 45 dias de infecção os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e o tegumento da região dorsal da pata inoculada foi removido de todos os camundongos infectados e acondicionados em soluções de conservação para posterior extração de DNA.

3.3 Coleta e tratamento de amostras obtidas de infecção experimental

Os fragmentos de pele coletados de animais infectados experimentalmente foram acondicionados em três soluções diferentes. Os tecidos foram imersos em 1 mL de PBS (NaCl 150 mM e Na₂HPO₄ 50 mM, pH 7.4); NET (NaCl 150 mM; EDTA 50 mM e Tris 100 mM, pH 7,4) ou etanol 70% e mantidos a 4 °C. Passados sete dias da coleta, cada amostra foi centrifugada a 3000 x g e o sobrenadante foi descartado. Os tecidos drenados foram então processados de acordo com diferentes protocolos de purificação de DNA genômico.

3.4 Extração de DNA genômico

3.4.1 Extração de DNA genômico de *Leishmania* spp. em cultura - adaptado de Miller, Dykes e Polesky (1988)

Formas promastigotas de cada espécie estudada de *Leishmania* spp. foram coletadas de 50 mL de cultura em fase estacionária por centrifugação a 3000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas uma vez com PBS e novamente coletadas. As células foram ressuspensas em 6 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, pH7,4) e lisadas pela adição de 600 µL de SDS a

10%. Após a digestão com 1 mg de proteinase K a 37 °C *overnight*, 2 mL de solução saturada de NaCl foram adicionados, o lisado foi vigorosamente agitado por 15 segundos e centrifugado a 3000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente para remoção do extrato protéico precipitado. Ao sobrenadante recuperado foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado e o DNA precipitado foi transferido, com auxílio de uma ponteira descartável estéril, para um microtubo contendo 1 mL de etanol 70%, drenado e seco a temperatura ambiente. O DNA purificado foi ressuspensão em 1 mL de TE e teve a concentração e a pureza determinadas por espectrofotometria no equipamento GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences, Freiburg, Baden-Württemberg, Alemanha).

3.4.2 *Extração de DNA genômico de tecidos obtidos de infecção experimental*

3.4.2.1 Lise celular de tecidos de camundongos

Os tecidos obtidos como descrito na seção 3.2 foram lisados com tampão de lise de tecidos ATL (Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Alemanha) de acordo com o manual de procedimentos do produto. Após serem lavadas com PBS, as amostras foram imersas em 630 µL de ATL, maceradas com um pistilo e digeridas com 1400 µg de proteinase K a 56 °C por 3 horas, num volume final de 700 µL, com agitação em vórtex de 1 em 1 hora. Após a digestão cada lisado foi dividido em três alíquotas de 200 µL que foram submetidas a três diferentes processos de extração de DNA.

3.4.2.2 Extração de DNA genômico com *kit* comercial

Após digestão com proteinase K, as amostras foram processadas de acordo com o manual do *kit* comercial de extração de DNA DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). O processo consistiu na adição de etanol aos lisados, que foram posteriormente submetidos a uma centrifugação em coluna de sílica onde o DNA é retido. A coluna foi então lavada duas vezes em tampões alcoólicos e o DNA eluído em um volume final de 200 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH 7.4).

3.4.2.3 Extração orgânica de DNA genômico com fenol-clorofórmio - adaptado de Uliana et. al. (1991)

As amostras lisadas foram submetidas a três extrações orgânicas, uma pela adição de igual volume de fenol tamponado com Tris, pH 8,0, outra pela adição de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e outra pela adição de igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguidas de centrifugações de 20000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O conteúdo de ácidos nucleicos presente na fase aquosa das separações foi precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 7,0) e dois volumes de etanol absoluto com centrifugação de 20000 x g por 10 minutos a 4 °C. O DNA precipitado foi então lavado com 1 mL de etanol 70%, seco e ressuspenso em 200 uL de TE.

3.4.2.4 Extração de DNA genômico por precipitação proteica por *salting-out* (SODE – *Salting Out Deproteinization Extraction*) - adaptado de Rotureau, Gego e Carme (2005)

Aos 200 µL de lisado foram adicionados 80 µL de NaCl saturado sob forte agitação em vórtex. As amostras foram centrifugadas a 20000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O DNA contido no sobrenadante foi precipitado pela adição de 560 µL de etanol absoluto e centrifugação de 20000 x g por 10 minutos a 4 °C. O ácido nucleico precipitado foi então lavado com 1 mL de etanol 70%, seco e ressuspenso em 200 µL de TE.

3.5 Testes de detecção, quantificação e identificação de *Leishmania* spp.

3.5.1 Oligonucleotídeos

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados como iniciadores ou como sondas de identificação, assim como os ensaios em que foram utilizados e as referências bibliográficas em que foram descritos estão listados na Tabela I.

3.5.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As reações convencionais de polimerização em cadeia foram realizadas com o *kit* TopTaq Master Mix (Qiagen), com 1X Master Mix, que contém dNTPs e TopTaq DNA Polimerase, 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo e 50 ng de DNA molde, ou 0,25 μ L de produto de PCR para as reações *nested*. Cada reação foi submetida a 40 ciclos, ou 30 ciclos para as reações de *nested* PCR, que incluíam passos de desnaturação do DNA molde a 94 °C por 1 min, associação dos oligonucleotídeos por 1 min a temperaturas distintas para cada par (Tabela II) e extensão a 72 °C por 30 s. Os produtos gerados foram então fracionados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE corado com brometo de etídeo, visualizado sob luz ultravioleta no transiluminador TFX-20M (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e fotografado no fotodocumentador LAB-020 (LabTrade do Brasil, Cotia, São Paulo, Brasil).

3.5.3 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

3.5.3.1 Clonagem de fragmentos de DNA

3.5.3.1.1 Vetor de clonagem

Para a clonagem dos fragmentos amplificados por PCR do gene *gapd* e da região SSU rDNA, utilizados nas reações de PCR em tempo real, foi utilizado o vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector (Promega, Heidelberg, Baden-Württemberg, Alemanha), de 3015 pb, que possui o gene de resistência à ampicilina e o da β -galactosidase, origem de replicação e múltiplos sítios de clonagem.

3.5.3.1.2 Ligação de fragmentos de DNA

Os produtos de PCR foram purificados e ligados ao vetor com T4 DNA ligase de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do *kit* de clonagem pGEM-T Easy vector System I (Promega).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos e sondas utilizados nos testes de detecção, quantificação e identificação de *Leishmania* spp. Referências: (a) Uliana et. al. (1994); (b) Savani et al. (2009); (c) Castilho et. al. (2008); (d) Castilho, Shaw e Floeter-Winter (2003); (e) Lopez et al. (1993).

Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Ensaio de utilização
S4^a	GATCCAGCTGCAGGTTCCACC	<i>nested</i> PCR
S12^a	GGTTGATTCCGTCAACGGAC	PCR/qPCR/HRM
S17^b	CCAAGCTGCCCAGTAGAAT	<i>nested</i> PCR/PCR multiplex
S18^b	TCGGGCGGATAAACACC	<i>nested</i> PCR/PCR multiplex
S19	GAATTCGACCGAATGCGGCC	PCR/qPCR/HRM
G6PD-LLF^c	CTTGTTGCCTCCGGCTAC	HRM
G6PD-LLR^c	GGCCATGTAAGCATCCTCAT	HRM
G6PD-LVF^c	TTGATCACTGGTACATGCATTAAG	PCR/HRM
G6PD-LVR^c	CTCGTCCAGAATGCAGCAC	PCR/HRM
G6PD-ISVC^d	ATCACAATGATGGTCAACGCAC	PCR multiplex
G6PD-ISVA^d	GTCGGTTATCCTATTCGGGTC	PCR multiplex
MP1L^e	TACTCCCCGACATGCCTCTG	PCR
MP3H^e	GAACGGGGTCTTCTGTATGC	PCR
GAPD-F2	GCCCAGAACATCATCCCTG	PCR multiplex/qPCR
GAPD-R2	GGAACACGGAAGGCCATG	PCR multiplex/qPCR
Sonda S1	pTCTATGGGCAATTCTGAATTCTACT GGGCACCCTATAGTGAGTCGTATTA	LCR
Sonda S2/6	ATTTAGGTGACACTATAGCGTTGGGT AAAACCCGCCGATGAGTTTGCTAT	LCR
Sonda S3	TAATACGACTCACTATAGGGTGCCC AGTAGAATTCAGAATTGCCCATAGA	LCR
Sonda S4/8	pATAGCAAACCTCATCGGCGGGTTTTA CCCAACGCTATAGTGTCACCTAAAT	LCR
Sonda S5	pCCTATGGGCAATTCTGAATTCTACTG GGCACCCTATAGTGAGTCGTATTA	LCR
Sonda S7	TAATACGACTACCTATAGGGTGCCCA GTAGAATTCAGAATTGCCCATAGG	LCR
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	LCR/sequenciamento
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	LCR/sequenciamento

Tabela 2 – Pares de oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de PCR convencional, qPCR e HRM.

Par de oligonucleotídeos	Temperatura de associação (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
S4 – S12	55 °C	540
S17 – S18	60 °C	440
S12 – S19	60 °C	116
G6PD-LLF – G6PD-LLR	60 °C	101
G6PD-LVF – G6PD-LVR	65 °C	101
G6PD-ISVC – G6PD-ISVA	60 °C	336
MP1L – MP3H	60 °C	70
GAPD-F2 – GAPD-R2	60 °C	100

3.5.3.1.3 Preparo de bactérias competentes e transformação bacteriana

Seguindo o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989), as bactérias termocompetentes foram preparadas com CaCl_2 e transformadas por choque térmico a 42 °C.

3.5.3.1.4 Determinação das sequências nucleotídicas dos fragmentos de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado a partir de uma adaptação do protocolo de Sanger e Coulson (SANGER; COULSON, 1975). As reações foram feitas com BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, Reino Unido), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Os produtos das reações foram então enviados ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da USP onde foram fracionados e analisados pela Plataforma ABI 3130 XL de 16 capilares (Life Technologies).

3.5.3.2 Preparação de curvas de calibração

Para determinar a quantidade de cópias de genoma do hospedeiro fez-se inicialmente uma curva padrão, amplificando um fragmento do gene que codifica a enzima GAPD de mamíferos utilizando os iniciadores GAPD-F2 e GAPD-R2 (Tabela I), comuns a uma vasta gama de espécies de mamíferos. Os produtos de PCR gerados com esses iniciadores foram clonados em pGEM-T Easy Vector (Promega), sequenciados e alinhados para a confirmação da sequência. Um clone selecionado foi linearizado com enzima de restrição *Scal*, o DNA foi purificado por eletroforese em gel de agarose, quantificado e utilizado como molde nas curvas-padrão dos testes de quantificação de DNA do hospedeiro por PCR em tempo real. Da mesma forma, DNA de clones contendo um fragmento gerado pelos iniciadores S12 e S19, que corresponde a parte da sequência do gene SSU rDNA de *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, foram linearizados, quantificados e utilizados como molde para a amplificação nas curvas-padrão dos testes de qPCR desse alvo. A concentração das soluções estoque para cada alvo a ser utilizado nas curvas padrão foi calculada para 10^{10} cópias/5 μ L levando em consideração o tamanho de cada plasmídeo. A partir dessa solução inicial, foram feitas diluições seriadas para os pontos da curva de calibração indo de 10^8 a 10 cópias do alvo.

3.5.3.3 Ensaios de quantificação de DNA alvo

As reações de amplificação para quantificação relativa (qPCR) de parasitas nas amostras foram realizadas no equipamento PikoReal 96 Real-Time PCR System (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Cada reação foi realizada com o *kit* Maxima SYBR Green/ROXqPCR Master Mix (ThermoScientific) em um volume final de 20 μ L, com 0,3 μ M de cada oligonucleotídeo e 50 ng de DNA total como molde. O protocolo de termociclagem incluiu um passo inicial de desnaturação de 94 °C por 5 min; 40 ciclos que incluíram um passo de desnaturação de 94 °C por 30 s e um passo de associação e extensão de 60 °C por 30 s. Os sinais de fluorescência foram captados ao final de cada passo de extensão. Ao final de cada teste, uma

curva de dissociação foi programada, com aquisição dos sinais de fluorescência a cada 0,5 °C entre 60 e 95 °C.

O número de cópias de cada alvo nas amostras experimentais foi calculado por interpolação a partir da curva padrão obtida para cada ensaio de qPCR como descrito na seção 3.5.3.2.

3.5.4 *Reação de ligação em cadeia (LCR)*

3.5.4.1 Fosforilação de oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos S1, S4/8 e S5, utilizados como sondas nas reações de LCR, tiveram suas extremidades 5' fosforiladas pela ação catalítica da enzima T4 polinucleotídeo quinase (Life Technologies). Para isso, 5 pmols de cada uma das sondas foram utilizados com substrato em reações com volume final de 25 µL, ATP 1 µM e Buffer Forward 1X. Após incubação por 1 hora a 37 °C, a enzima foi inativada a 65 °C por 10 min.

3.5.4.2 Reação de ligação em cadeia

As reações de ligação em cadeia foram realizadas no equipamento Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Cada reação foi realizada em um volume final de 25 µL, com 1X *Taq* DNA ligase buffer, 12,5 U de *Taq* DNA ligase (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, EUA), 0,02 µM de cada sonda e 10⁶ cópias do amplicon gerado pelos oligonucleotídeos S12 e S19 clonados em pGEM-T Easy Vector, produzidas como descrito na seção 3.5.3.1. O protocolo de termociclagem consistiu em 30 ciclos de 2 min a 94 °C para desnaturação e 5 min a 65 °C para associação e ligação das sondas.

3.5.4.3 Detecção dos produtos de LCR por PCR em tempo real

Dois microlitros de cada produto de LCR gerado como descrito acima foram utilizados como molde em reações de PCR em tempo real com o *kit* Maxima SYBR Green/ROXqPCR Master Mix (ThermoScientific) em um volume final de 20 µL, com

0,3 μ M de cada um dos oligonucleotídeos T7 e SP6 (Tabela I). O protocolo de termociclagem incluiu um passo de desnaturação de 94 °C por 5 min; 40 ciclos incluindo passos de desnaturação a 94 °C por 30 s, associação dos iniciadores a 55°C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. Os sinais de fluorescência foram captados ao final de cada passo de extensão. Ao final de cada teste, uma curva de dissociação foi programada, com aquisição dos sinais de fluorescência a cada 0,5 °C entre 60 e 95°C.

3.5.5 Análise de dissociação em alta resolução (HRM)

Os testes de HRM foram realizados ao final de cada reação de PCR em tempo real que utilizaram como iniciadores os pares de oligonucleotídeos S12 e S19 para os ensaios com o alvo SSU rDNA ou LLF, LLR, LVF e LVR para os ensaios com o alvo *g6pd* (Tabela I). O protocolo de programação para as curvas de dissociação estabeleceu a captação de fluorescência a cada acréscimo de 0,2 °C, com manutenção de 10 s a cada acréscimo de temperatura. Os dados brutos de fluorescência (RFU) e a primeira derivada foram obtidas pelo próprio software de amplificação do equipamento PikoReal 96.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism v.6.02, utilizando o teste *t* de Student.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação das melhores estratégias de acondicionamento de amostras biológicas e extração de DNA para a detecção do parasita por PCR quantitativa

Para se determinar a melhor opção de acondicionamento das amostras, anterior aos procedimentos de extração de DNA, os fragmentos de tecidos com cerca de 1 a 3 mm², coletados de camundongos experimentalmente infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, foram imersos em três soluções distintas: PBS, NET ou etanol 70% e mantidos a 4 °C por sete dias. Essas amostras foram então maceradas, lisadas com SDS, digeridas com proteinase K e cada lisado foi aliquotado em três partes iguais. Cada uma das alíquotas passou por um método de extração de DNA diferente: extração orgânica com fenol:clorofórmio; ou purificação de DNA por precipitação de proteínas por *salting-out* (SODE – *Salting Out Deproteinization Extraction*); ou utilização de kit comercial (DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen)), como descrito na seção 3.4.2.

As concentrações de DNA obtido, pelos três métodos utilizados, das amostras submetidas aos três protocolos de acondicionamento, estão apresentadas na Tabela III, assim como as respectivas razões dos valores de absorbância A260/A280.

A utilização do *kit* comercial no processo de purificação de DNA rendeu, em todas as amostras, aproximadamente metade da quantidade de DNA obtida pelos outros dois métodos de extração. As extrações de DNA das amostras geradas pela infecção experimental com *L. (L.) amazonensis* tratadas com etanol 70% tiveram rendimento maior do que as submetidas aos outros processos de conservação. Os diferentes processos de conservação de amostras não promoveram diferenças acentuadas com relação ao rendimento e à pureza dos processos de extração de DNA.

Tabela 3 – Quantificação espectrofotométrica de DNA extraído de lesões cutâneas geradas por infecção experimental de camundongos BALB/c por *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*.

AMOSTRA	ACONDICIONAMENTO	EXTRAÇÃO	[DNA] (ng/uL)	A260/A280
Lesão - <i>L. (L.) amazonensis</i>	PBS	Dneasy	58,6 ± 5,5	1,9
		φ:CHCl ₃	108,6 ± 3,8	2,0
		SODE	119,5 ± 0,4	2,0
	NET	Dneasy	25,5 ± 2,0	1,9
		φ:CHCl ₃	59,0 ± 15,6	2,0
		SODE	55,8 ± 11,6	2,0
	Etanol 70%	Dneasy	145,2 ± 13,7	1,9
		φ:CHCl ₃	263,6 ± 112,6	1,9
		SODE	341,1 ± 100,3	1,9
Lesão - <i>L. (V.) braziliensis</i>	PBS	Dneasy	14,01 ± 0,6	2,1
		φ:CHCl ₃	33,7 ± 5,7	2,2
		SODE	37,5 ± 5,2	2,3
	NET	Dneasy	8,9 ± 0,9	2,0
		φ:CHCl ₃	27,0 ± 7,4	2,2
		SODE	22,5 ± 0,5	2,1
	Etanol 70%	Dneasy	12,3 ± 2,0	2,1
		φ:CHCl ₃	34,0 ± 3,9	2,1
		SODE	39,1 ± 6,4	2,1

Apesar das razões que determinam a pureza da preparação estarem satisfatórias, para determinar a qualidade do DNA obtido dos tecidos submetidos às diversas condições de acondicionamento e extração em testes de amplificação por PCR, foi realizada uma qPCR com o objetivo inicial de se quantificar o gene *gapd* do hospedeiro em 50 ng de DNA de cada amostra. A Figura 1 mostra os dados obtidos da quantificação do número de cópias de *gapd* em cada amostra submetida às diferentes condições de acondicionamento e extrações de DNA.

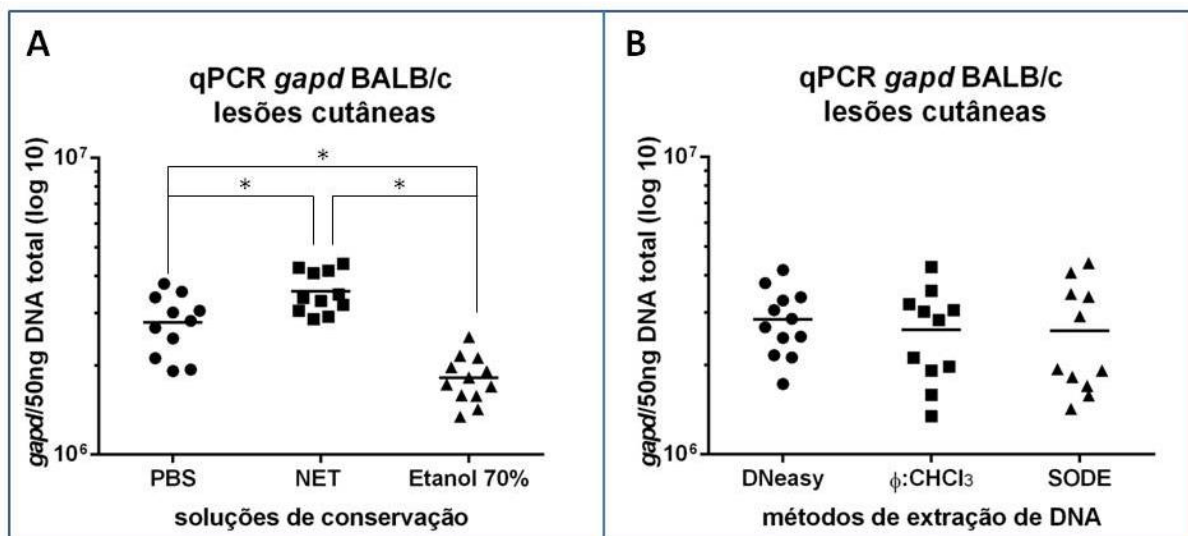


Figura 1 – Quantificação do alvo *gapd* do hospedeiro em 50 ng de DNA obtido de amostras de tecidos de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Quantificação por PCR em tempo real de DNA alvo em amostras submetidas a diferentes meios de acondicionamento (A) e métodos de extração de DNA (B). *Valores de p: NET X PBS p = 0,0080; Etanol 70% X PBS p = 0,0001; Etanol 70% X NET p < 0,0001.

As amostras inicialmente mantidas em NET, tanto nas lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* quanto por *L. (V.) braziliensis*, geraram DNA molde capaz de produzir mais amplicons do que as amostras submetidas aos outros protocolos de acondicionamento quando o DNA-alvo era o gene *gapd* do hospedeiro. Já o DNA purificado dos tecidos mantidos em etanol foi menos eficaz em relação ao número de cópias do alvo detectadas. No entanto, a quantificação de *gapd* não apresentou diferenças significativas nas amostras processadas pelos diferentes métodos de extração de DNA aplicados.

A quantificação de DNA-alvo do parasita também foi realizada nas amostras de lesões geradas por infecção experimental com o objetivo de avaliar os processos de acondicionamento e purificação de DNA genômico. Para isso, a amplificação por qPCR de um fragmento do gene SSU rDNA de *Leishmania* foi realizada como descrito na seção 3.5.3.

Apesar de as infecções experimentais mimetizarem a forma tegumentar da doença, as espécies de parasitas envolvidas acometem o hospedeiro de formas distintas. As lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* se mostraram claramente mais evidentes e maiores do que as causadas por *L. (V.) braziliensis* e a determinação da carga parasitária nessas lesões refletiu essa diferença (Figura 2).

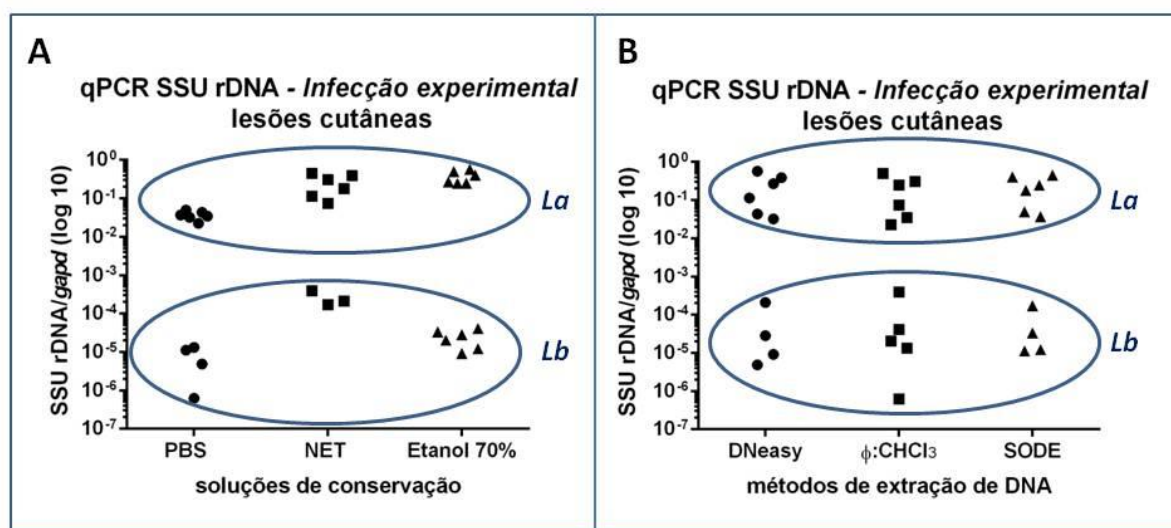


Figura 2 – Quantificação do alvo SSU rDNA do parasita no DNA obtido de amostras de lesões cutâneas de camundongos infectados experimentalmente. Quantificação por PCR em tempo real de DNA alvo em amostras submetidas a diferentes condições de acondicionamento (A) e métodos de extração de DNA (B). La: infecção por *L. (L.) amazonensis*; Lb: infecção por *L. (V.) braziliensis*.

Por apresentarem perfis distintos de infecção com relação a carga parasitária, as análises de quantificação do DNA do parasita nas amostras de infecção experimental por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram realizadas separadamente.

Na infecção por *L. (L.) amazonensis*, o DNA obtido dos tecidos com as lesões, mantidos em etanol 70% ou NET produziu um número de amplicons do SSU rDNA significativamente maior do que os obtidos pelo tratamento com PBS (Figura 3A). O DNA obtido de lesões causadas por *L. (V.) braziliensis* também produziu quantidade significativamente maior de amplicons de SSU rDNA quando os tecidos foram submetidos ao tratamento com etanol 70% e, apesar de gerar amostras que se mostraram negativas ao teste, o tratamento com NET gerou amostras que também amplificaram um número maior de cópias do DNA alvo (Figura 3B). A quantificação desse alvo não mostrou diferenças significativas nas amostras processadas pelos diferentes métodos de purificação de DNA aplicados nos tecidos de infecção experimental tanto por *L. (L.) amazonensis* quanto por *L. (V.) braziliensis* (Figura 3C e 3D).

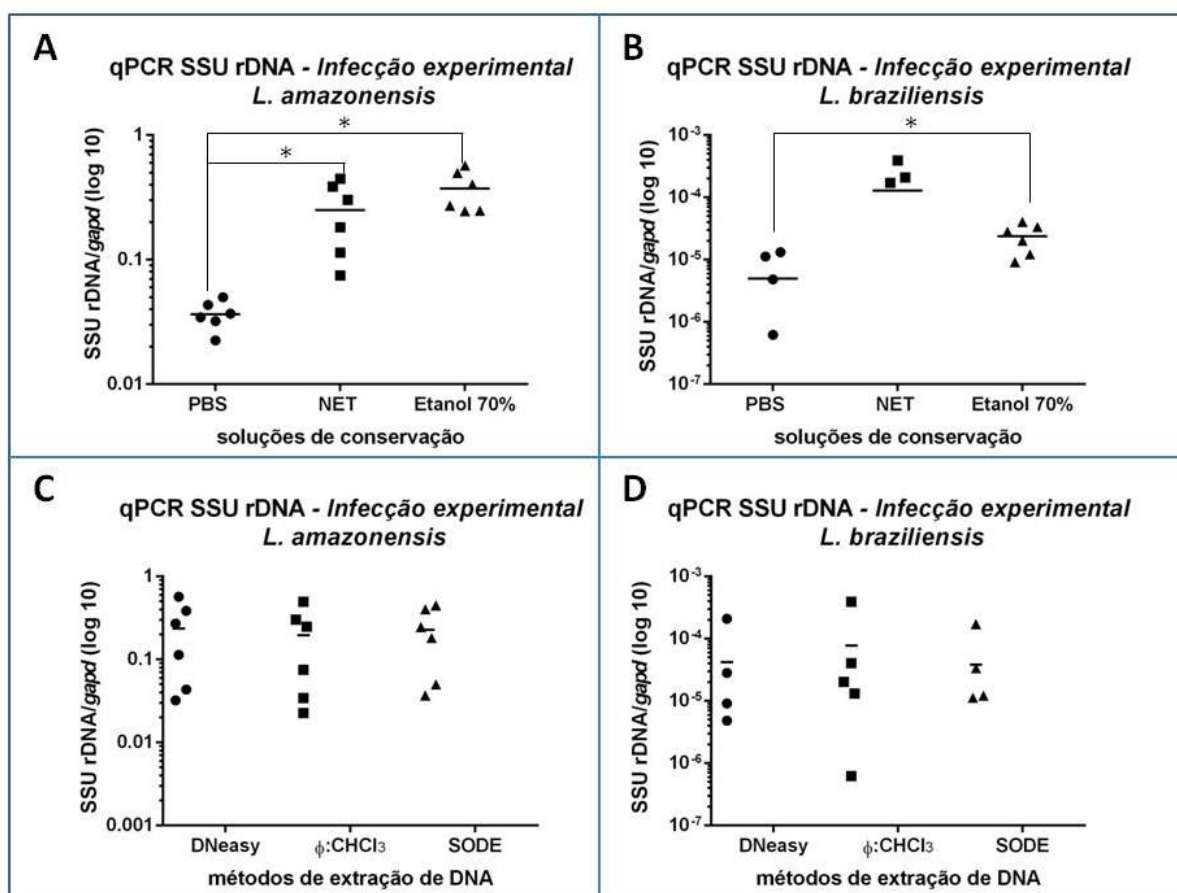


Figura 3 – Quantificação do alvo SSU rDNA do parasita no DNA obtido de amostras de tecidos de camundongos infectados experimentalmente com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*. Quantificação por PCR em tempo real de DNA alvo em amostras submetidas a diferentes condições de acondicionamento (A e B) e métodos de extração de DNA (C e D). *Valores de p: A: NET X PBS p = 0,006; Etanol 70% X PBS p = 0,0002; B: Etanol 70% X PBS p < 0.068.

4.2 Determinação do melhor alvo de DNA para detecção do parasita por PCR convencional

Três alvos de DNA foram utilizados em testes de detecção por PCR convencional de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em amostras de DNA genômico de cepas certificadas dessas espécies na presença ou não de DNA genômico camundongo. Os iniciadores foram baseados nas sequências dos genes SSU rDNA e *g6pd* e na sequência do kDNA (Tabela II). Esses pares de iniciadores amplificam fragmentos de 116, 101 e 70 pb, respectivamente.

Na figura 4A pode ser visto que os ensaios com os oligonucleotídeos S12 e S19, derivados da sequência do gene SSU rDNA, permitiram a detecção de *L. (L.) amazonensis* a partir de 50 fg de DNA genômico do parasita na presença ou não de

50 ng de DNA do hospedeiro mamífero. A sensibilidade foi menor para os testes que utilizaram os oligonucleotídeos G6PD-LLF e G6PD-LLR que amplificam um fragmento do gene *g6pd* de *L. (L.) amazonensis*, detectando o parasita apenas quando 50 pg do DNA do parasita foram utilizados como molde (Figura 4B).

A utilização de oligonucleotídeos derivados da sequência de kDNA permitiu a detecção de *L. (V.) braziliensis* quando 500 ag de DNA genômico do parasita foram utilizados como molde. Porém, na presença de DNA genômico de camundongo, a amplificação de fragmentos inespecíficos de DNA foi observada, quando a quantidade de DNA do parasita foi menor que 50 fg (Figura 4F).

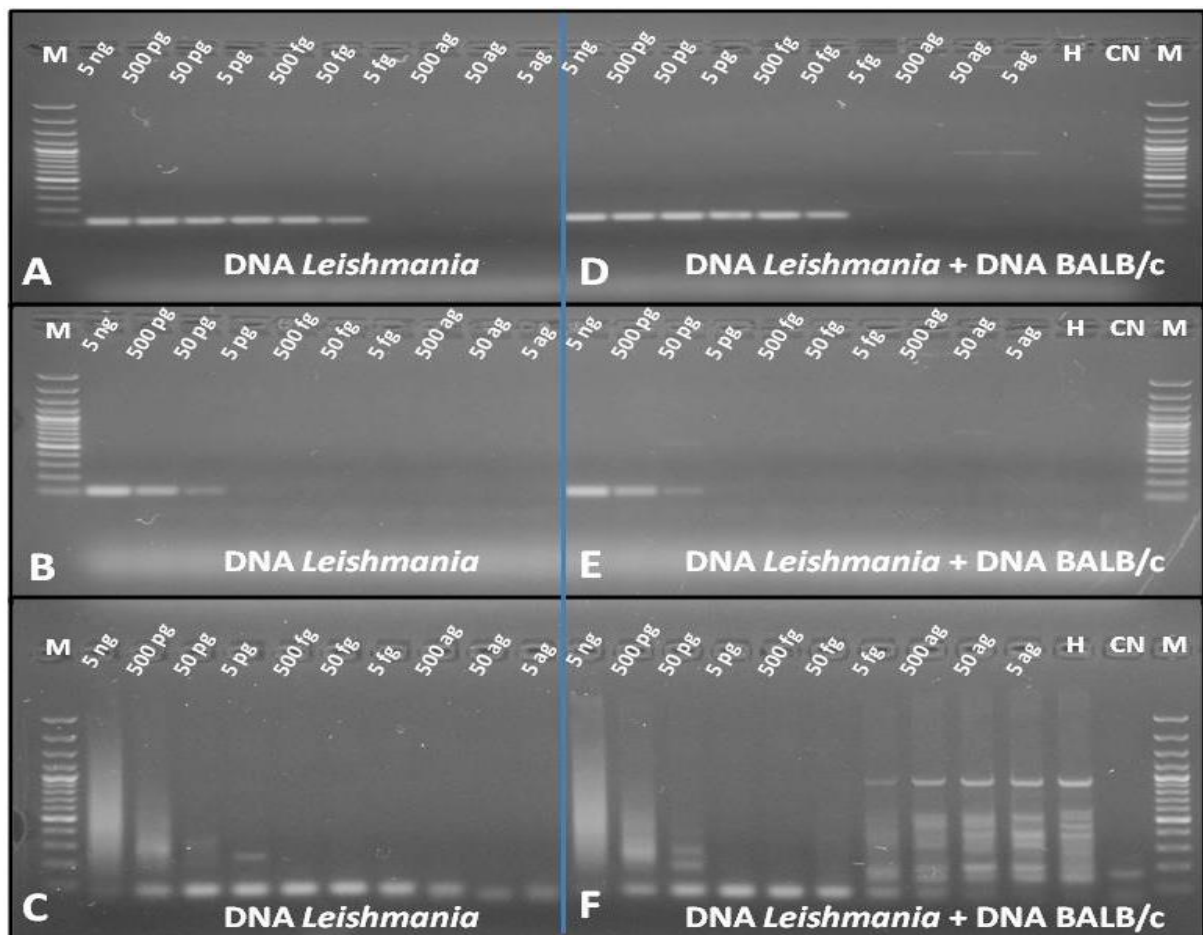


Figura 4. Ensaio de sensibilidade em PCR com diferentes alvos de DNA. Eletroforese em gel de agarose com os produtos de amplificação de diferentes alvos de DNA por PCR convencional para a detecção de parasitas em amostras com concentrações variadas de DNA purificado de *Leishmania* spp. em cultura (A,B,C) e em misturas com concentrações variadas do DNA do parasita adicionado a 50 ng de DNA de hospedeiro BALB/c (D, E, F). Fragmentos gerados a partir do alvo SSU rDNA (A,D), *g6pd* (B,E) ou kDNA (C,F). M: 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

4.3 Desenvolvimento de estratégias para detecção e identificação de parasitas por PCR convencional

4.3.1 *Nested PCR*

Com o objetivo de otimizar a sensibilidade da detecção de SSU rDNA de *Leishmania* foi aplicada a metodologia de *nested PCR*, que emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de oligonucleotídeos internos à sequência do produto gerado numa primeira amplificação. Para isso foram utilizados os oligonucleotídeos S4 e S12, específicos para as espécies da família Trypanosomatidae, para a amplificação de um fragmento de 540 pb que foi utilizado como molde na segunda etapa para a amplificação de um fragmento de 440 pb pelos oligonucleotídeos S17 e S18, específicos para o gênero *Leishmania*. A figura 5 ilustra a estratégia utilizada.

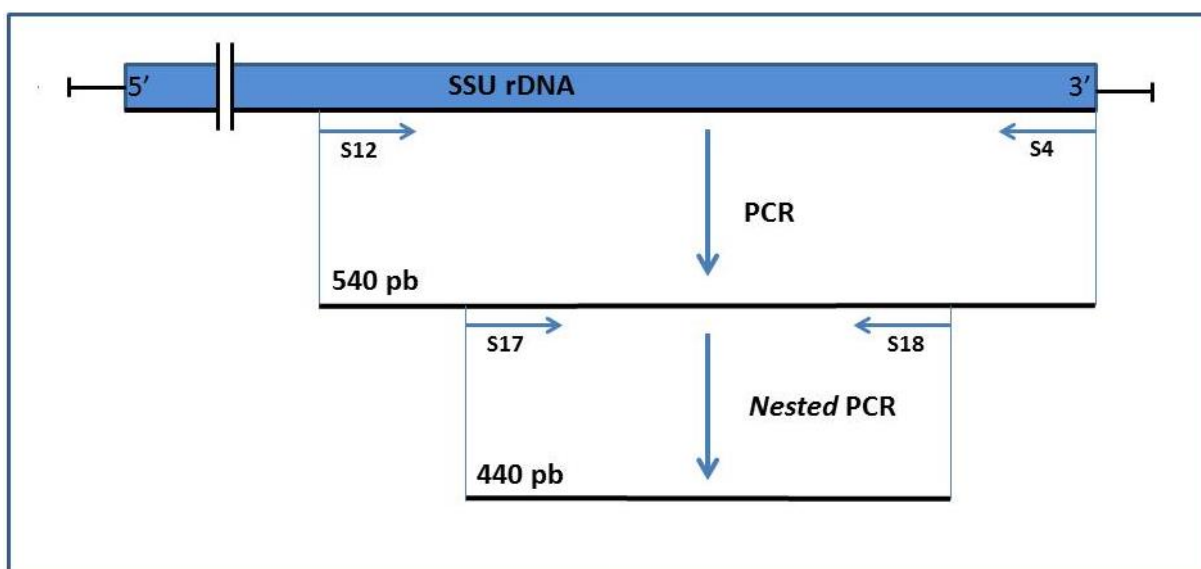


Figura 5. Esquema da estratégia utilizada na otimização de sensibilidade na detecção de DNA de *Leishmania* por PCR. Em uma primeira reação, o par de oligonucleotídeos S4 e S12 amplifica um fragmento de 540 pb que serve de molde para uma segunda reação de PCR, onde um fragmento de 440 pb é amplificado com o par de oligonucleotídeos S17-S18.

A aplicação dessa estratégia permitiu a detecção *L. (L.) amazonensis* em amostras com quantidades de DNA genômico equivalentes a 10 ag, o que aumentou a sensibilidade do teste de PCR, utilizando esse alvo, em 100 mil vezes (figura 6).

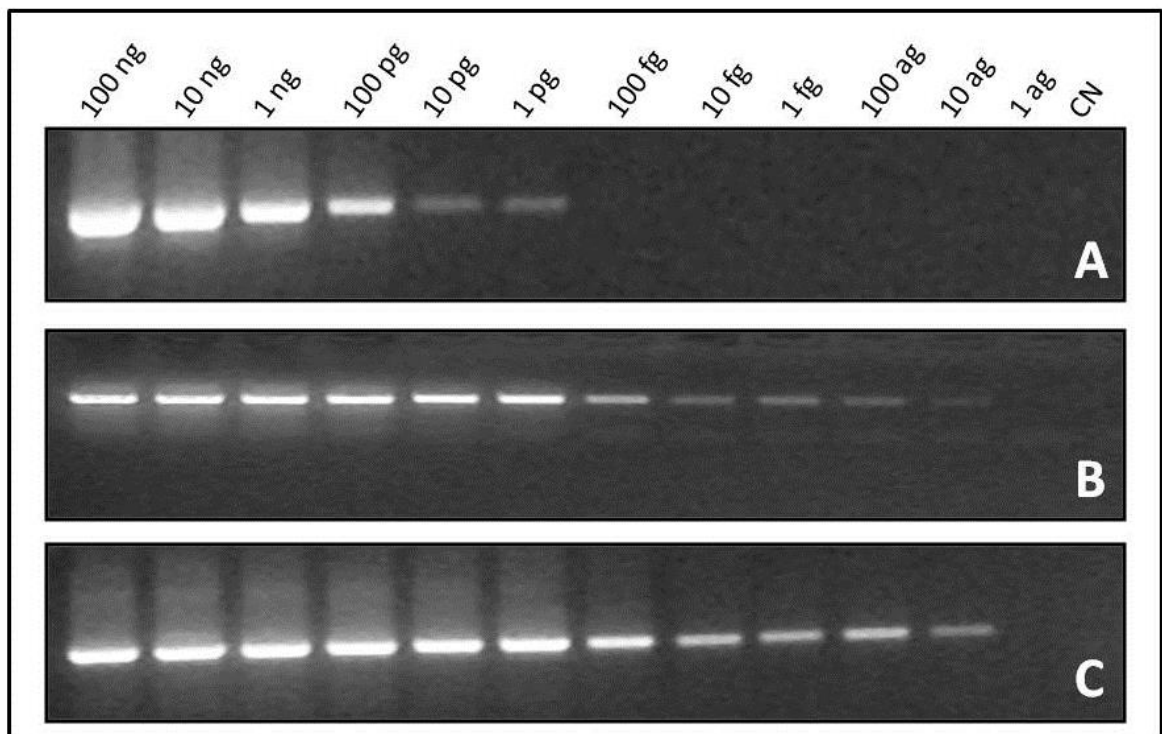


Figura 6. Teste de sensibilidade de testes de PCR e *nested* PCR com o alvo SSU rDNA. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR gerados pelos oligonucleotídeos externos S4 e S12, numa primeira reação de PCR (A); Os produtos da primeira reação foram utilizados como molde em uma segunda reação com os oligonucleotídeos S17 e S18 em diluições de 1000 vezes (B) e 100 vezes (C); CN: controle negativo das reações.

4.3.2 PCR Multiplex

Com o objetivo de se obter mais de uma informação sobre a identidade de parasitas em uma única reação de PCR, o DNA genômico de culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* (agentes causadores das leishmanioses encontradas no território nacional) e de *L. (S.) adleri*, *L. (S.) hoogstraali*, *L. (S.) tarentolae*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* e *Crithidia fasciculata* foi misturado com DNA humano. A mistura foi então submetida a um protocolo de PCR com um par de iniciadores que amplifica um fragmento de 440 pb do gene SSU rDNA (S17 e S18), específico para todas as espécies do gênero *Leishmania*, um par que amplifica um segmento com cerca de 330 pb do gene *g6pd* (G6PD-ISVC e G6PD-ISVA), específico para DNA das espécies pertencentes ao sub-gênero *L. (Viannia)* e um terceiro par que amplifica um segmento de 100 pb do gene *gapd* (GAPD-F2 e GAPD-R2), baseado na sequência do gene que codifica a enzima

gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de mamíferos. A utilização do DNA de mamífero tem por objetivo ter o controle positivo da reação de PCR, mesmo que o DNA do parasita resulte negativo e também permitir normalizar o resultado por DNA de mamífero.

Foi possível observar que, como esperado, as amostras ensaiadas contendo DNA de *Leishmania* (*Leishmania*) spp. foram identificadas pela presença de apenas uma banda, de 440 pb, enquanto as amostras com DNA de *L. (Viannia)* spp. geraram fragmentos de DNA de dois tamanhos distintos, correspondentes a 440 e ~ 330 pb, correspondendo à amplificação dos dois alvos. Os DNAs de *T. brucei*, *T. cruzi* e *C. fasciculata* foram utilizados como controles negativos, não gerando bandas específicas de amplificação. Como todas as amostras foram misturadas a uma quantidade fixa de DNA humano (45 ng de DNA humano + 5 ng de DNA de cada parasita por reação), também como esperado, geraram a banda de 100 pb que pode indicar a presença de DNA amplificável em amostras testes (Figura 7).

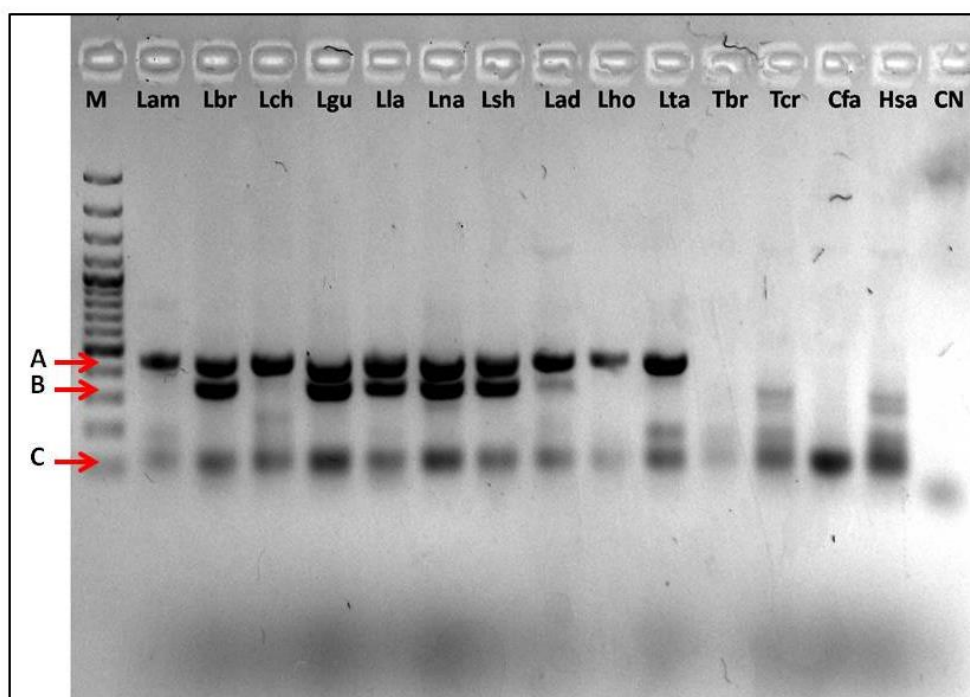


Figura 7 – Ensaio de PCR multiplex de detecção de *Leishmania* e identificação de subgênero do parasita. Eletroforese dos produtos de PCR gerados com oligonucleotídeos específicos para DNA de espécies do gênero *Leishmania* (fragmentos de ~ 440 pb – seta A), oligonucleotídeos específicos para DNA de espécies do sub-gênero *Leishmania* (*Viannia*) (fragmentos de ~ 330 pb – seta B) e oligonucleotídeos específicos para DNA de mamífero (fragmentos de 100 pb – seta C). M: 100 bp DNA Ladder (Fermentas); Lam: *L. (L.) amazonensis*; Lbr: *L. (V.) braziliensis*; Lch: *L. (L.) chagasi*; Lgu: *L. (V.) guyanensis*; Lla: *L. (V.) lainsoni*; Lna: *L. (V.) naifi*; Lsh: *L. (V.) shawi*; Lad: *L. (S.) adleri*; Lho: *L. (S.) hoogstraali*; Lta: *L. (S.) tarentolae*; Tbr: *T. brucei*; Tcr: *T. cruzi*; Cfa: *C. fasciculata*, Hsa: DNA humano; CN: controle negativo.

4.4 Desenvolvimento de protocolos para a identificação de parasitas

4.4.1 Reação de ligação em cadeia (LCR)

Na tentativa de desenvolver um ensaio para a detecção de mutações pontuais presentes no SSU rDNA, que são capazes de discriminar as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*, foram realizados ensaios de LCR com DNA de cepas-referência dessas espécies, utilizando como alvo a mutação na posição 1721 do gene SSU rDNA, que codifica a subunidade 18S do ribossomo de *Leishmania* (Figura 10B). A existência de sequências-âncora permitiram a detecção por PCR em tempo real dos produtos de ligação. A figura 8 esquematiza a estratégia utilizada.

Os primeiros testes, com a utilização de um par de sondas adjacentes, complementares a uma das fitas de DNA onde ocorre a mutação pontual em *L. (L.) amazonensis*, mostraram a detecção específica de *L. (L.) amazonensis*, porém em ciclos tardios da PCR em tempo real, indicando uma baixa eficiência na etapa de LCR (Figura 9).

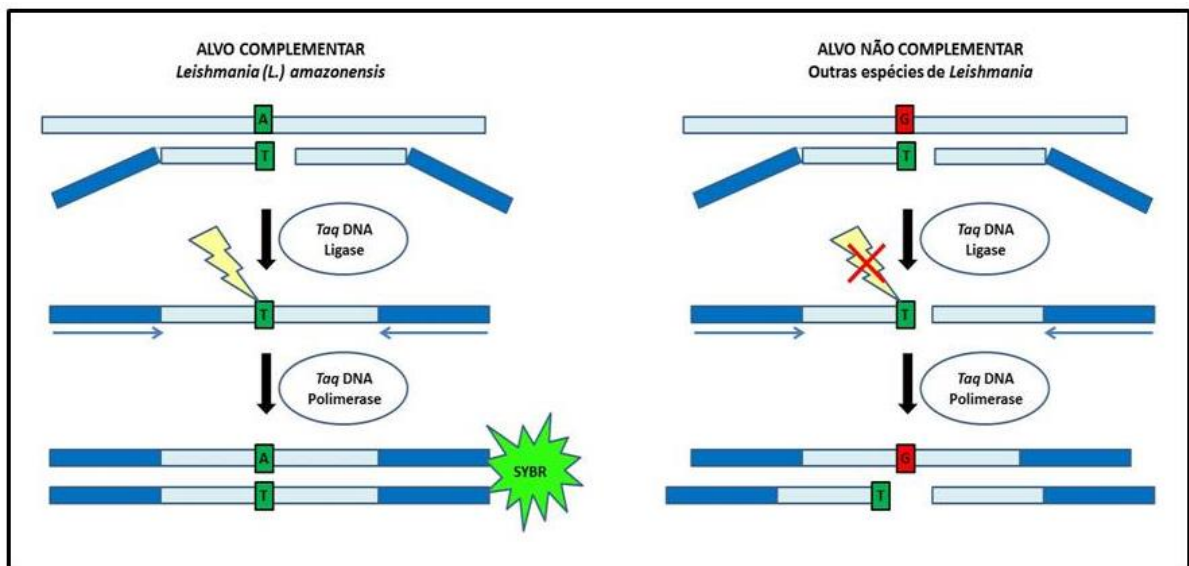


Figura 8. Esquema da estratégia utilizada para os ensaios de LCR. Foram desenhados oligonucleotídeos que contêm, além de uma sequência-âncora, a região polimórfica do SSU rDNA que compreende uma mutação pontual capaz de discriminar *L. (L.) amazonensis* das outras espécies brasileiras (Uliana, 1991), permitindo uma amplificação do produto de ligação por PCR em tempo real.

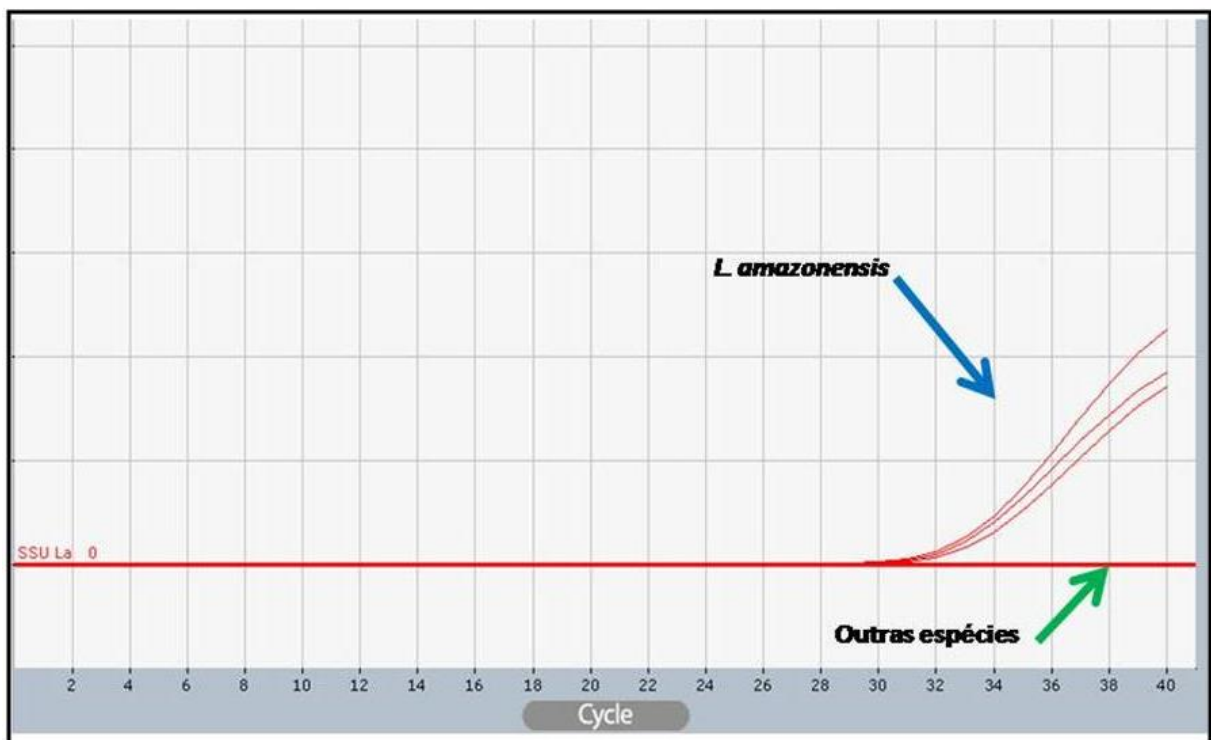


Figura 9 – Gráfico de amplificação de PCR em tempo real precedida de LCR. Seta azul: amplificação específica de fragmento de DNA de *L. (L.) amazonensis*; Seta verde: ausência de amplificação nas amostras de DNA das espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*.

Tentativas utilizando diferentes condições de LCR foram testadas para obtenção de melhores sensibilidade e especificidade. Para isso, reações de LCR foram realizadas com combinações diferentes das sondas esquematizadas na figura 10, em testes que utilizaram apenas uma fita de DNA genômico como molde e outros que utilizaram as duas fitas como molde, para as duas espécies.

Quando apenas as sondas complementares à fita senso de *L. (L.) amazonensis* eram utilizadas nos ensaios de LCR, observou-se, após a amplificação por PCR em tempo real, ligação entre as sondas na presença do molde específico, mas também ocorreu ligação na presença de DNA molde de *L. (L.) chagasi*, onde uma mutação pontual impediria essa ligação (Figura 11A).

Nos testes com sondas complementares à fita antisenso de *L. (L.) amazonensis*, a ligação inespecífica com base no DNA de *L. (L.) chagasi* mostrou-se menos expressiva, porém ainda existente (Figura 11B). E quando os dois pares de sondas específicas para *L. (L.) amazonensis* foram utilizados simultaneamente nas reações, houve um significativo aumento da sensibilidade de detecção, porém a

ligação inespecífica das sondas ainda permitiu a amplificação de produtos gerados na presença de DNA de *L. (L.) chagasi* e também de produtos de ligação independentes da presença de DNA molde (Figura 11C).

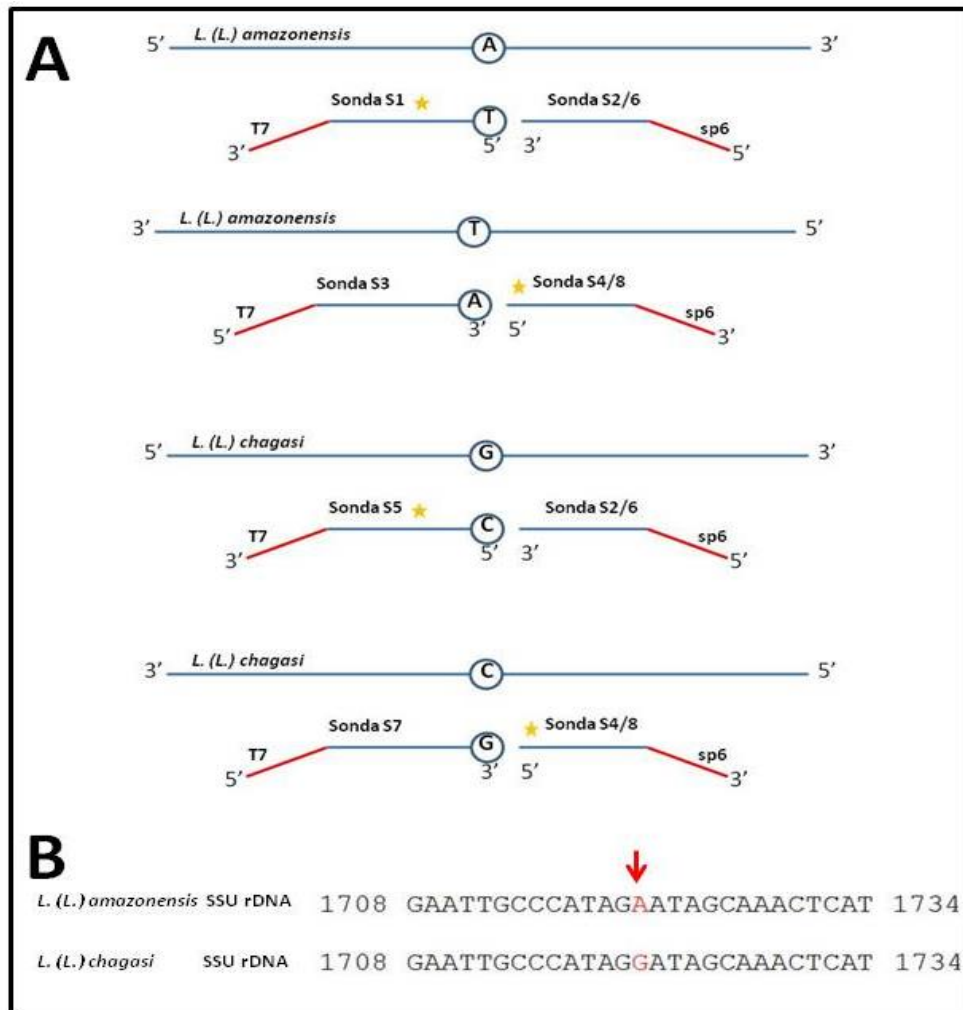


Figura 10. Esquema das sondas utilizadas nos testes de LCR. (A) Sondas utilizadas nas diferentes tentativas de padronização do teste. A estrela indica a sonda fosforilada para cada par utilizado. (B) Região do gene SSU rDNA explorada nos testes de LCR; a seta indica a mutação pontual na posição 1721 em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*.

Da mesma forma, foram realizados testes com sondas específicas para *L. (L.) chagasi*, na presença de DNA molde de *L. (L.) chagasi* ou de *L. (L.) amazonensis* ou na ausência de DNA molde. A amplificação dos produtos de LCR evidenciou a ligação inespecífica das sondas na presença do molde não complementar e na ausência de DNA molde (Figuras 12A, B e C).

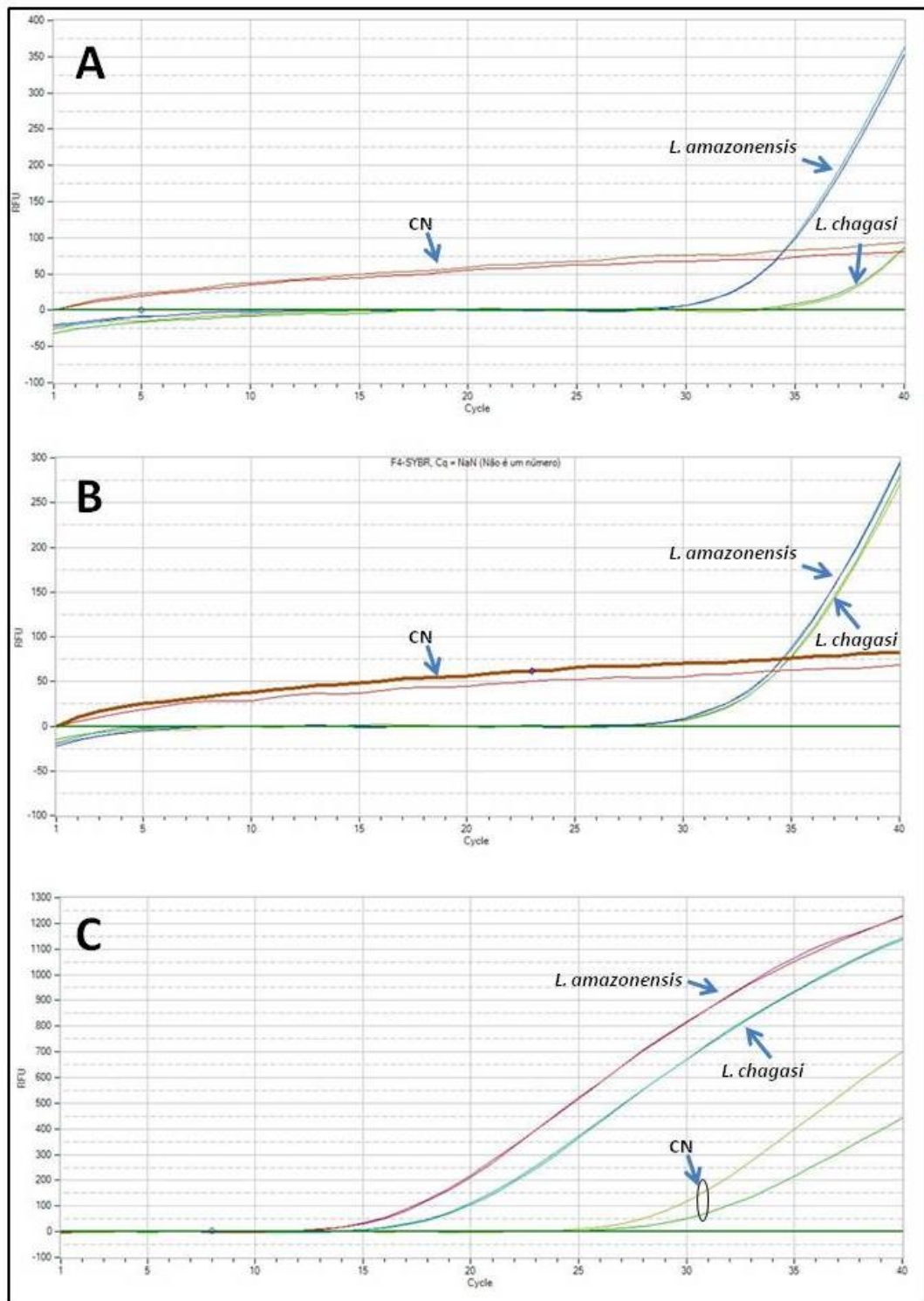


Figura 11. Gráficos de amplificação do produto de LCR gerados a partir de sondas específicas para a detecção de *L. (L.) amazonensis*. As reações de LCR que precederam as amplificações por tempo real foram realizadas na presença de sondas complementares à fita sentido (A), ou à fita antisenso (B) ou simultaneamente às duas fitas de DNA molde de *L. (L.) amazonensis* (C).

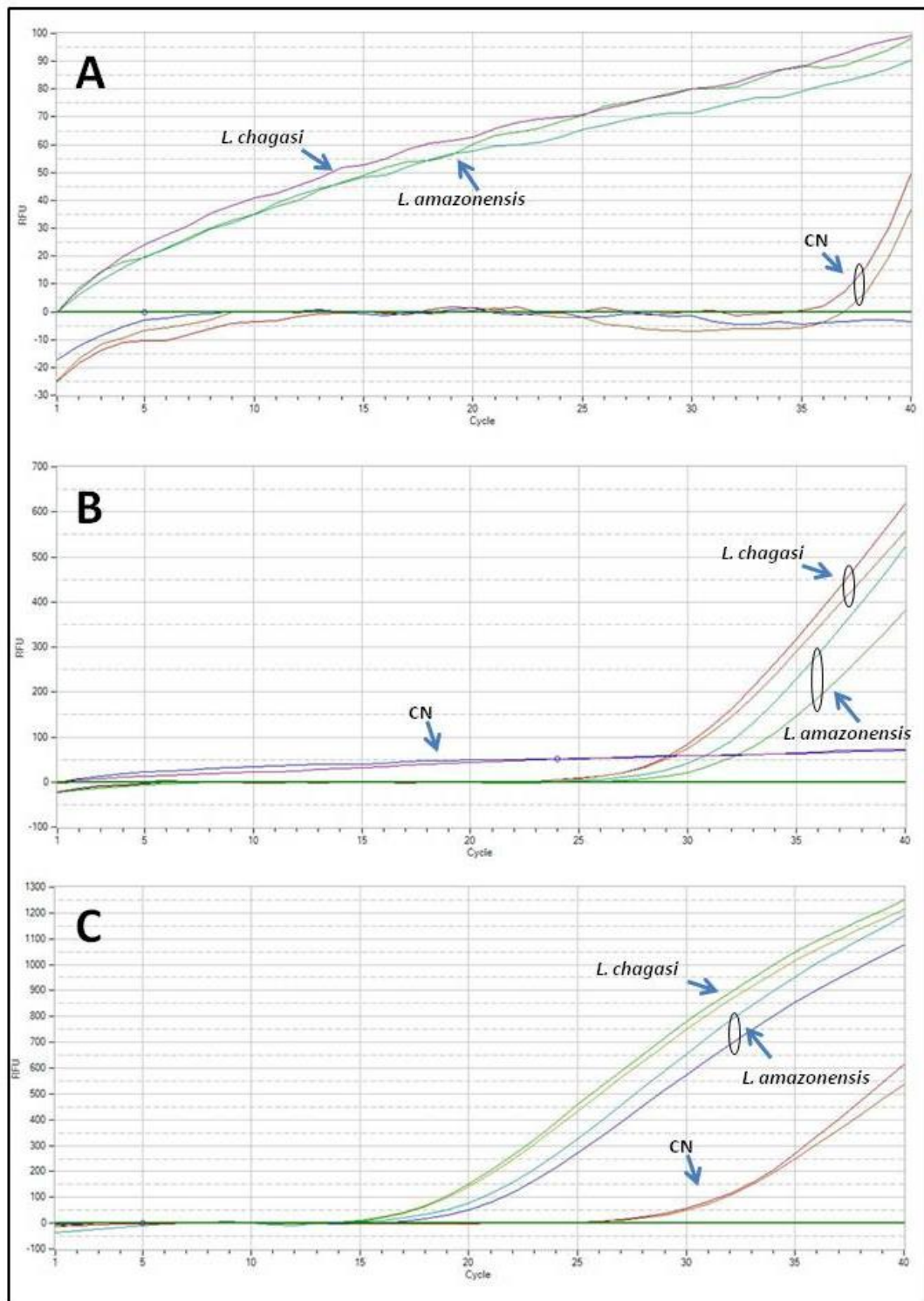


Figura 12. Gráficos de amplificação do produto de LCR gerados a partir de sondas específicas para a detecção de *L. (L.) chagasi*. As reações de LCR que precederam as amplificações por tempo real foram realizadas na presença de sondas complementares à fita senso (A), ou à fita antisenso (B) ou simultaneamente às duas fitas de DNA molde de *L. (L.) chagasi* (C).

4.4.2 Análise de Dissociação em Alta Resolução (HRM)

Com o objetivo de discriminar as espécies de *Leishmania* envolvidas nas leishmanioses que ocorrem no território brasileiro, foi empregada a metodologia de HRM, ainda na tentativa de distinguir os polimorfismos presentes em alvos padronizados anteriormente. Para isso, um par de oligonucleotídeos (S12 e S19) foi utilizado nas reações em que as curvas de dissociação do alvo SSU rDNA foram analisadas e outros dois pares (LLF e LLR; LVF e LVR) foram utilizados simultaneamente nas reações em que as curvas de dissociação do alvo *g6pd* foram analisadas. Para a padronização foram utilizadas amostras contendo de 100 ng a 10 pg de DNA genômico extraído de cepas-referência de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) guyanensis*. As diferenças termocinéticas entre amplicons se dá em função de diferenças na composição nucleotídica entre eles e, para os alvos escolhidos, esses polimorfismos estão esquematizados na figura 13.

Figura 13. Composição nucleotídica dos amplicons analisados por HRM. (A): Alinhamento das sequências dos amplicons de SSU rDNA de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* (La ssu, Lb ssu e Lc ssu, respectivamente); (B) Alinhamento das sequências dos amplicons de *g6pd* de *L. (V.) braziliensis* e *L.(V.) guyanensis* (Lb g6pd e Lg g6pd, respectivamente) e sequência do amplicon de *g6pd* de *L. (L.) amazonensis* (La g6pd); As setas vermelhas indicam o posicionamento dos polimorfismos nas sequências.

Nas reações em que o fragmento do SSU rDNA foi amplificado, as curvas de dissociação do amplicom gerado a partir do DNA de *L. (L.) chagasi* tiveram padrão distinto do observado para as outras espécies (Figura 14). As análises de HRM entre os amplicons de SSU rDNA permitiram a discriminação de *L. (L.) chagasi* das demais espécies pela evidente diferença de T_m , de aproximadamente 0,5 °C, que pode ser observada na tabela IV.

Nas reações em que o alvo utilizado foi o gene *g6pd*, o par de oligonucleotídeos G6PD-LLF e G6PD-LLR possibilitou a produção de amplicons somente na presença de DNA de *L. (L.) amazonensis*, com T_m de 77,5 °C. O par G6PD-LVF e G6PD-LVR produziu amplicons apenas na presença de DNA das espécies do subgênero *L. (Viannia)*, com T_m s de 77,92 °C e 78,63 °C para *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, respectivamente (Tabela IV). As curvas de dissociação dos amplicons gerados nesse ensaio tiveram padrões distintos e estão representadas na figura 15.

Tabela 4 – Temperatura média de dissociação dos amplicons gerados nos testes de HRM.

ENSAIO HRM	ESPÉCIE	TEMPERATURA DE DISSOCIAÇÃO (°C)
Alvo SSU rDNA	<i>L. (L.) amazonensis</i>	78,77 ± 0,09
	<i>L. (L.) chagasi</i>	79,26 ± 0,03
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	78,66 ± 0,03
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	78,70 ± 0,05
Alvo <i>g6pd</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	77,50 ± 0,03
	<i>L. (L.) chagasi</i>	-
	<i>L. (V.) braziliensis</i>	77,92 ± 0,02
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	78, 63 ± 0,03

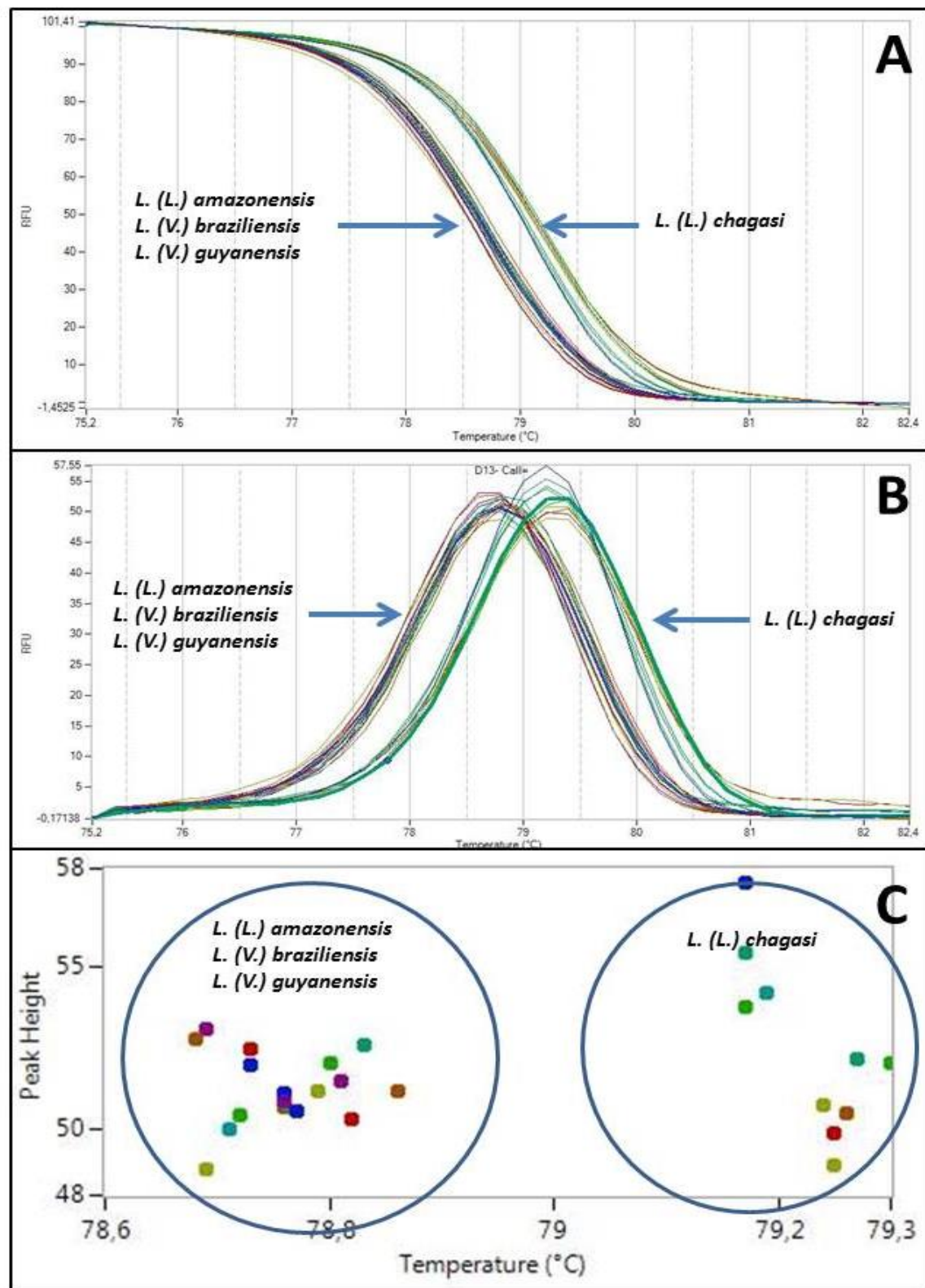


Figura 14. Análise de HRM do alvo SSU rDNA de *Leishmania*. Curvas de dissociação de amplicons gerados pela amplificação de SSU rDNA de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) guyanensis*. (A): Intensidade de fluorescência (RFU) em função de um gradiente de temperatura; (B): Derivada negativa das curvas de dissociação, expressa por $-d(RFU)/dT$; (C): Gráfico de dispersão individual das amostras.

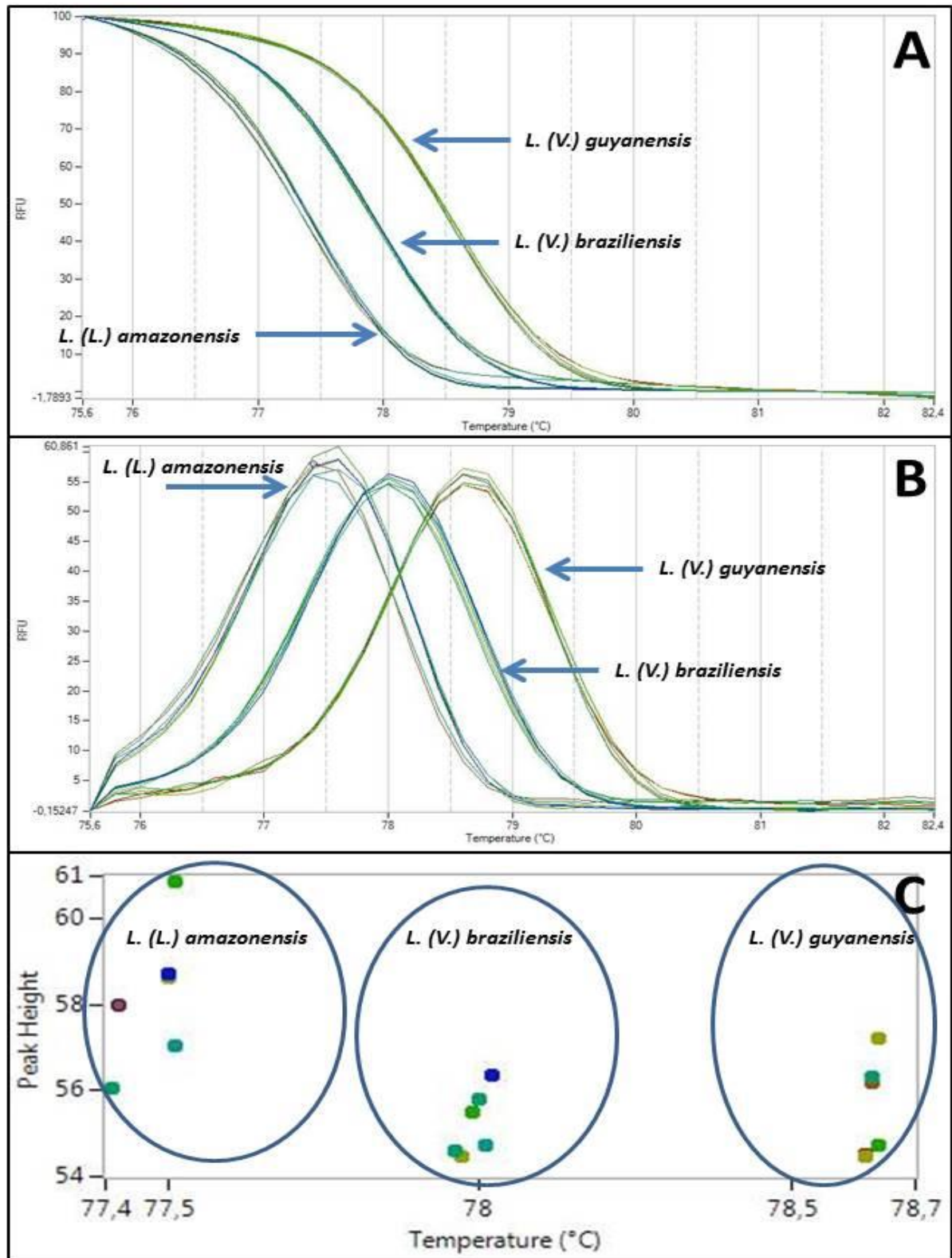


Figura 15. Análise de HRM do alvo *g6pd*. Curvas de dissociação de amplicons gerados pela amplificação de *g6pd* de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. (A): Intensidade de fluorescência (RFU) em função da temperatura; (B): Derivada negativa das curvas de dissociação, expressa por $-d(RFU)/dT$; (C): Gráfico de dispersão individual das amostras.

5 DISCUSSÃO

O estabelecimento de protocolos otimizados de detecção e identificação dos agentes causadores das leishmanioses torna-se extremamente útil num contexto clínico, uma vez que a determinação da espécie em questão pode promover uma maior eficácia no tratamento dessas doenças, um melhor entendimento de ação e eficácia de possíveis novos fármacos ou mesmo protocolos de tratamento que sejam espécie-específicos. Além disso, essa detecção e identificação permite a geração de dados importantes para estudos epidemiológicos e ecológicos.

Metodologias que utilizam o DNA do parasita como alvo têm sido descritas como estratégias de diagnóstico em diversos estudos. A amplificação de segmentos específicos do genoma de *Leishmania* por PCR é a metodologia de escolha em diversos trabalhos que detectam e discriminam espécies desse patógeno, permitindo a incriminação de insetos vetores e hospedeiros mamíferos no contexto eco-epidemiológico das leishmanioses (GARCEZ et al., 2009; SAVANI et al., 2004, 2009). Utilizando a mesma estratégia metodológica, outros estudos mostram correlações entre as espécies envolvidas em casos clínicos e a severidade das manifestações da doença e sua resposta aos tratamentos empregados (NICODEMO et al., 2012; TUON et al., 2007).

Os processos envolvidos no diagnóstico das leishmanioses por técnicas de detecção DNA do parasita incluem a coleta de material clínico, processamento dessas amostras, purificação do material genético e posterior detecção do DNA alvo. Para cada etapa, torna-se importante a padronização de metodologias que permitam otimizar um diagnóstico preciso. Essas padronizações são importantes, pois muitos aspectos podem estar envolvidos no sucesso ou no fracasso da detecção. Dentre esses aspectos ressaltamos a integridade do DNA, para que o alvo possa ser acessível aos iniciadores e a ausência de inibidores teciduais da *Taq* DNA polimerase, muitas vezes presentes nas preparações de tecidos animais. Assim, este trabalho teve como objetivo analisar alguns desses parâmetros e verificar as condições que podem compor um protocolo robusto para a detecção, quantificação e identificação de *Leishmania* spp.

A maneira pela qual amostras clínicas são acondicionadas parece ter influência na qualidade do DNA purificado posteriormente. Já foi mostrado que DNases podem ter um importante papel na degradação de DNA extraído de tecidos e que a presença de EDTA nas soluções de tratamento desses tecidos inibe a ação dessas nucleases (TOKUDA et al., 1990). Outra estratégia simples utilizada na conservação de tecidos para posterior purificação de DNA é a fixação por etanol, que é descrita como capaz de conservar tecidos de mamíferos por mais de seis anos, a temperatura ambiente, em condições satisfatórias para posteriores extrações de DNA e ensaios de PCR (SMITH et. al., 1987).

No presente trabalho foram realizados testes de quantificação de DNA do hospedeiro mamífero em amostras obtidas após infecção experimental de camundongos com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*. Essa quantificação foi efetuada pela amplificação por PCR em tempo real de um segmento do gene *gapd*, utilizando iniciadores comuns a todos os mamíferos. Esses testes mostraram que amostras de tecidos mantidas em tampão NET, no qual a concentração de EDTA é de 50 mM, foram capazes de produzir DNA com qualidade significativamente maior para amplificação do que as outras soluções de acondicionamento dos tecidos.

A determinação da carga parasitária pela detecção de SSU rDNA de *Leishmania* nessas amostras indicou que os tecidos mantidos em NET ou em etanol 70% foram os que produziram maior quantidade de alvos detectáveis. Apesar da fixação em etanol também ter resultado em amostras de DNA satisfatórias, em termos de quantidade e pureza do DNA, essa fixação apresentou diferenças quando o agente infeccioso era *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*. A carga parasitária em lesões causadas por esses agentes reflete a biologia dos parasitas: espécies do subgênero *L. (Leishmania)* se desenvolvem de forma rápida, acometendo o hospedeiro mamífero com lesões extensas, enquanto as espécies do subgênero *L. (Viannia)* se desenvolvem de forma relativamente mais lenta, produzindo lesões mais tênues (LAINSON; SHAW, 1987). Por isso, as amostras obtidas das infecções experimentais por *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis* continham quantidades diferentes de DNA alvo e a degradação desse alvo pode ter ocorrido em proporções diferentes para essas amostras, ou seja o DNA de *L. (V.) braziliensis*, por estar mais diluído, pode ter sido degradado de forma mais intensa.

Apesar de produzir amostras com quantidades indetectáveis de DNA de *L. (V.) braziliensis*, a conservação com tampão NET foi também a que produziu amostras com maior quantidade de DNA alvo íntegro (Figura 3B). Esses resultados, junto aos observados nos testes de detecção de DNA do hospedeiro mamífero, podem indicar a escolha do tampão NET, como uma opção simples e eficiente de conservação de amostras biológicas que serão submetidas a testes de detecção de DNA de *Leishmania* por PCR.

A purificação de ácidos nucleicos de células ou tecidos é uma fase essencial nos protocolos de diagnóstico por técnicas de biologia molecular. Pureza e integridade do DNA extraído são parâmetros de grande influência no resultado das técnicas que serão nele aplicadas, como a PCR (WALKER; RAPLEY, 1999). Assim, busca-se a obtenção de massa para realização dos testes; integridade das moléculas, principalmente quando o DNA será utilizado para a detecção de alvos cuja extensão é maior de 500 bp, garantindo dessa maneira que a molécula integra permita essa extensão; e pureza da preparação, não só deixando livre de contaminantes como restos proteicos, nucleotídeos livres, RNA quebrado que podem atrapalhar a reação, mas principalmente, evitando a presença de contaminantes teciduais como a hemoglobina, contaminantes residuais dos processos de purificação como solventes orgânicos ou outros inibidores da *Taq* DNA polimerase (WILSON, 1997).

Neste trabalho, as amostras obtidas pelos três métodos de extração foram avaliados pela amplificação de *gapd* de camundongos e SSU rDNA de *Leishmania*. Apesar de apresentarem diferentes rendimentos na purificação do DNA (Tabela III), as amostras geraram moldes que foram amplificados de modo similar, sem apresentarem diferenças significativas na eficácia da PCR (Figuras 1B, 2B, 3C e 3D). Assim, para amostras a serem diagnosticadas, a escolha do método de extração de DNA pode ser feita de acordo com as vantagens que cada protocolo oferece.

O *kit* comercial de colunas de sílica utilizado neste trabalho foi a opção de método que rendeu menor quantidade de DNA purificado, porém essa quantidade foi suficiente para gerar DNA molde suficiente para os testes realizados. Aparentemente, o DNA obtido por essa técnica é mais limpo de contaminante,

principalmente inibidores de polimerases, o que pode resultar numa eficácia de PCR maior, mesmo partindo de um menor número de moléculas iniciais do alvo. A principal vantagem dessa escolha é a praticidade e a otimização do tempo de processo. Por outro lado, a utilização de *kits* é uma opção mais cara em termos de custos financeiros quando comparada às outras metodologias empregadas neste trabalho. Os métodos de extração orgânica com fenol-clorofórmio e precipitação proteica por *salting-out* produziram quantidades maiores de DNA purificado com relação ao *kit* comercial, com purezas semelhantes (Tabela III), e com qualidades semelhantes no que se refere a produção de alvos amplificáveis por testes de PCR (Figuras 1B, 2B, 3C e 3D). O método de precipitação de proteínas por *salting-out* é descrito como vantajoso sobre os outros dois por ser barato, não-tóxico por não utilizar solventes orgânicos, passível de ser realizado em curto espaço de tempo (ROTUREAU; GEGO; CARME, 2005) e pode ser escolhido como opção entre os métodos de extração de DNA.

O passo seguinte deste estudo foi comparar os alvos a serem utilizados nos ensaios de PCR. A partir de DNA genômico purificado de cepas estabelecidas e certificadas de *Leishmania* spp. e outros organismos relacionados, foram testados três alvos de DNA, com a finalidade de se observar a sensibilidade e a especificidade de testes, inicialmente por PCR convencional. Oligonucleotídeos complementares à subunidade menor do ribossomo de tripanossomatídeos, SSU rDNA, foram capazes de amplificar um produto específico na presença de 50 fg de DNA genômico de *Leishmania*, massa correspondente a uma quantidade menor do que um parasita, considerando-se o número de cópias deste alvo no genoma haploide como 150 e que o genoma de um parasita é diploide e tem aproximadamente 116 fg de DNA, dos quais 16 fg corresponde a kDNA e 100 fg a DNA nuclear (FLOETER-WINTER; CRUZ, 2011). Essa sensibilidade foi observada mesmo na presença de 50 ng do DNA do hospedeiro vertebrado (Figura 4A, D).

O SSU rDNA foi o alvo mais sensível e específico quando comparado aos outros dois alvos testados, *g6pd* e kDNA. Os iniciadores baseados na sequência do gene *g6pd* foram capazes de amplificar fragmentos específicos em amostras com 50 pg de DNA genômico do parasita, na presença ou não de DNA de hospedeiro

(Figura 4B, E), o que corresponde a 500 parasitas. Esse resultado não é surpresa, uma vez que esse é um gene de cópia única no genoma haploide do parasita.

Já as reações de PCR realizadas com oligonucleotídeos derivados de kDNA, cujo número de cópias é cerca de 100 vezes mais abundante do que o SSU rDNA, mostraram maior sensibilidade com relação às realizadas com os outros alvos. No entanto, geraram produtos inespecíficos na presença de DNA de hospedeiro (Figura 4C, F), certamente devido a associações inespecíficas que não puderam ser eliminadas nem em temperaturas de associação mais elevadas do que o T_m predito dos iniciadores, uma vez que a elevação da temperatura também diminua a amplificação específica (resultados não apresentados). Esse tipo de resultado deve ser evitado uma vez que exige um pesquisador experimentado na análise do resultado.

O tamanho do amplicom também parece influenciar na sensibilidade da detecção do DNA de parasitas por PCR. Como já mencionado, a integridade do DNA é importante quando o produto a ser amplificado é maior do que 500 bp, uma vez que quebras do DNA, durante a purificação podem separar os dois iniciadores. A amplificação de um fragmento de 116 pb do SSU rDNA de *L. (L.) amazonensis* foi detectada em amostras com 50 fg de DNA genômico utilizado como molde, enquanto que a amplificação de um fragmento de 540 pb do mesmo gene só foi detectada em amostras com 1 pg de DNA genômico. Logo, o SSU rDNA, entre os alvos testados neste trabalho, foi a opção que gerou melhor resultado no que se refere a sensibilidade e especificidade.

Ainda, a utilização de técnica de *nested* PCR, que consiste de uma primeira amplificação do alvo, seguida de uma segunda amplificação com oligonucleotídeos internos à sequência do primeiro produto, é uma estratégia que pode ser utilizada para melhorar a especificidade e sensibilidade da reação. O emprego de dois pares de oligonucleotídeos complementares ao SSU rDNA, em uma *nested* PCR foi capaz de aumentar ainda mais a sensibilidade dos testes de PCR convencional, permitindo a detecção de *L. (L.) amazonensis* em amostras com 10 ag de DNA do parasita, quantidade que corresponde a um décimo de parasita (Figura 5). Entre os testes padronizados e executados neste trabalho, essa foi a estratégia que resultou em

maior sensibilidade, podendo ser indicada para amostras com baixa carga parasitária, como ocorre em infecções por *L. (V.) braziliensis*.

A utilização simultânea de oligonucleotídeos complementares a diferentes alvos de DNA foram também testadas com o objetivo de se obter mais de uma informação sobre a identidade de parasitas em uma única reação. Esse tipo de estratégia pode ser utilizada quando não existem outras informações que possam balizar o que se busca na amostra, tais como aspectos clínicos da lesão (tipo e localização) ou epidemiológicos (áreas geográficas onde se deu a infecção), dando uma primeira ferramenta para ser refinada com a associação de outros testes *a posteriori*. Assim, a PCR multiplex padronizada foi capaz de identificar o gênero *Leishmania* entre outros organismos da mesma família, discriminando os subgêneros *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)*. Dessa forma, pode se ter um indicativo, se o passo seguinte utilizará o alvo SSU rDNA, para separar *L. amazonensis* de *L. chagasi*, ou testes para discriminar as espécies do subgênero *L. (Viannia)*. Ainda integra este teste multiplex iniciadores de hospedeiro mamífero, que permitem indicar, pela amplificação de um fragmento de *gapd*, se a amostra de DNA está passível de amplificação, isto é, livre de possíveis inibidores de *Taq* DNA polimerase, o que valida como resultado negativo uma amostra que não amplifica os alvos de *Leishmania*.

O sequenciamento de segmentos gênicos gerados por PCR é uma das estratégias que utilizamos para distinguir os organismos do subgênero *L. (Leishmania)*, determinando os polimorfismos encontrados no fragmento amplificado da região SSU rDNA. Embora essa estratégia tenha se tornado relativamente simples no processo de identificação de organismos, os custos e a mão-de-obra especializada envolvidos ainda são fatores limitantes para que seja indicada como rotina diagnóstica. Nesse contexto, tem-se desenvolvido métodos associados a PCR em tempo real que permitem a detecção de diferenças na composição nucleotídica de amplicons sem a necessidade de sequenciá-los e de forma automatizável.

Apesar de ser descrita em diversos trabalhos como uma técnica capaz de discriminar mutações pontuais extremamente sensível e específica por Wiedmann et al. (1994), os ensaios de LCR realizados neste trabalho não foram capazes de discriminar seguramente as espécies estudadas. Nessa técnica há a necessidade de

um dos oligonucleotídeos se associar corretamente ao segmento complementar, sendo o último nucleotídeo da sequência aquele que distingue o polimorfismo. Aparentemente, os iniciadores utilizados aqui neste trabalho permitiam a ligação do fragmento adjacente, mesmo quando o esse nucleotídeo não se encontrava pareado. Alguns trabalhos relatam essa ligação inespecífica, independente de DNA molde, de sondas utilizadas em LCR, como principal desvantagem do método (ABRAVAYA et al., 1995; YI et al., 2012). A ligação inespecífica inerente ao método, somada à alta sensibilidade das amplificações por PCR pode ser o motivo determinante da falta de especificidade dos ensaios aqui realizados.

Outra maneira de explorar polimorfismos é a determinação da composição de C+G do produto de PCR. O método de HRM (*High Resolution Melting*) vem sendo utilizado com sucesso nessa determinação e, embora ainda seja escassa a literatura que descreve essa metodologia como estratégia na identificação dos agentes causadores das leishmanioses, sua utilização foi descrita para a discriminação de cepas diferentes de *L. (L.) infantum*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major* com base nas diferenças nucleotídicas de amplicons do gene 7SL RNA e para a identificação de diferentes cepas de *L. (L.) donovani* através das diferenças entre amplicons do gene HASPB (BOUSSLIMI et al., 2012; NASEREDDIN; JAFFE, 2010; ZACKAY et al., 2013). A única limitação do método é a necessidade de um equipamento de PCR em tempo real que permita programar a realização da curva de dissociação do produto final de PCR, com intervalos de 0,2°C de variação. As principais vantagens do método são rapidez, baixo custo e potencial de automatização. As análises de variações nos amplicons são realizadas em poucas horas por um *software* do próprio equipamento durante a reação de PCR e, portanto, sem custo adicional. Por ser uma variação da técnica de PCR em tempo real, o método pode, em uma única reação, detectar, quantificar e identificar *Leishmania* em amostras e, por não ser necessária a manipulação dos amplicons, a contaminação, tão comum em laboratórios que realizam PCR e manipulam o produto produzido em massa, pode ser evitada.

As análises de HRM realizadas neste trabalho, abordando diferenças nucleotídicas do gene SSU rDNA, foram capazes de discriminar *L. (L.) chagasi* de *L. (L.) amazonensis* e das espécies do subgênero *L. (Viannia)*. Além disso, análises

realizadas a partir das curvas de dissociação de *g6pd* de *Leishmania* possibilitaram a discriminação em padrões distintos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e das demais espécies do subgênero *L. (Viannia)*. Esses resultados podem indicar a utilização da técnica de HRM como uma opção bastante viável entre os métodos utilizados atualmente na identificação das espécies causadoras de leishmanioses no Brasil. Outros alvos de DNA também podem ser analisados com o propósito de se identificar sequências que permitam uma resolução maior de discriminação dessas espécies.

Concluindo, a avaliação de protocolos de conservação e extração de DNA de amostras, a determinação de alvos de DNA eficazes na detecção e o desenvolvimento de protocolo de identificação de *Leishmania*, por meio de testes realizados sistematicamente em amostras padronizadas, permitiu a elaboração de um algoritmo com procedimentos otimizados para o diagnóstico de leishmanioses (Figura 16).

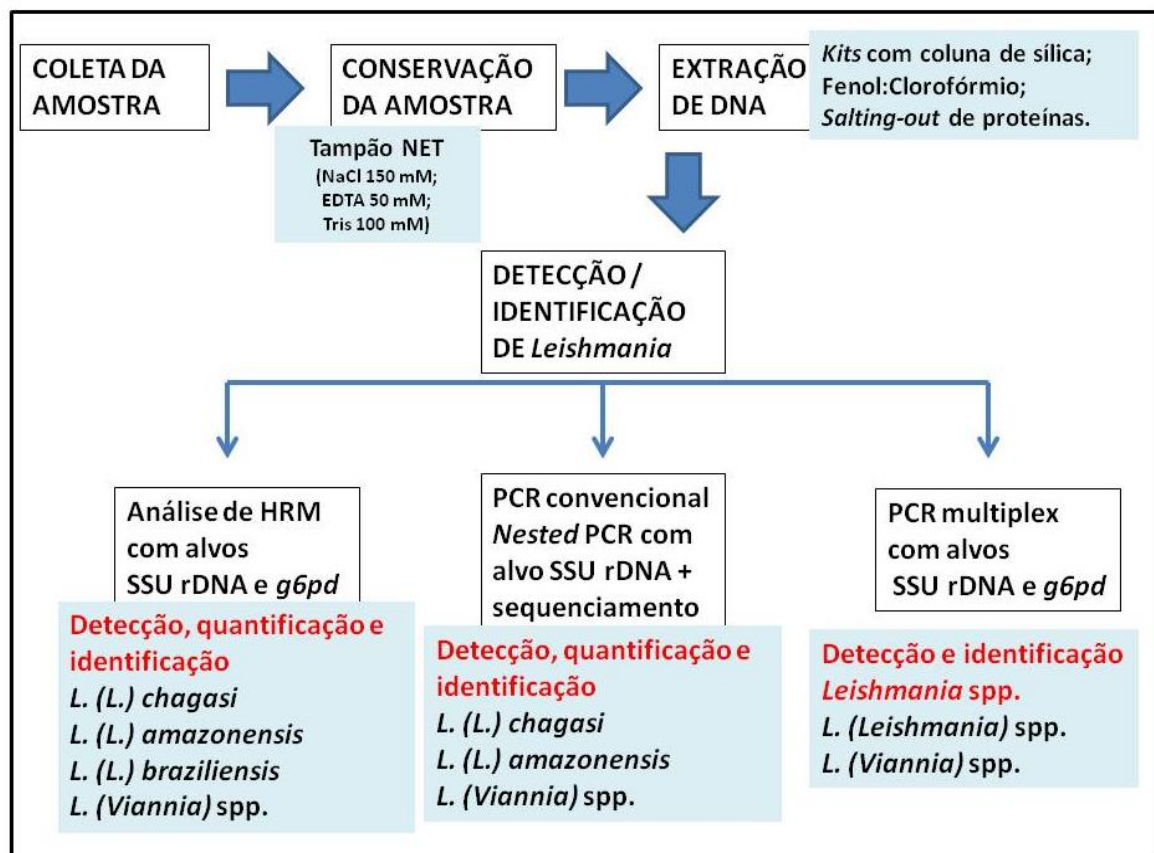


Figura 16. Proposta de algoritmo para o diagnóstico de leishmanioses. Procedimentos para a detecção, quantificação e identificação de *Leishmania* spp. utilizando métodos testados sistematicamente em amostras padronizadas obtidas de infecções experimentais.

6 CONCLUSÕES

- A utilização do tampão NET (NaCl 150 mM, EDTA 50 mM e Tris 100 mM, pH 7,4) é uma opção eficaz e simples para manutenção e conservação de amostras que serão submetidas a processos de extração e purificação de DNA para diagnóstico de leishmaniose por reações em cadeia da polimerase (PCR).
- Os três protocolos de extração e purificação de DNA testados, um *kit* comercial de colunas de sílica; precipitação proteica por *salting-out*; e extração orgânica com fenol-clorofórmio, produziram DNA com qualidades semelhantes quando avaliados pela amplificação de alvos específicos por PCR. Podem, portanto, ser escolhidos de acordo com as vantagens que oferecem.
- O emprego de oligonucleotídeos baseados na sequência do gene SSU rDNA gerou melhores resultados no que se refere a sensibilidade e especificidade, com relação aos alvos *g6pd* e kDNA, em ensaios de detecção de *Leishmania* por PCR convencional. Além disso, a utilização de um protocolo de *nested* PCR com esse alvo aumentou a sensibilidade do teste, detectando a presença de 10 ag de DNA de *Leishmania*, quantidade correspondente a um décimo de parasita.
- A PCR multiplex desenvolvida neste trabalho permitiu, em amostras com misturas de DNA de parasitas e de hospedeiro, a detecção e identificação de *Leishmania* entre outros organismos da mesma família, a discriminação dos subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* e a indicação da qualidade da amostra pela amplificação de um segmento de DNA do hospedeiro.
- Apesar de ser uma técnica descrita como sensível e específica para a detecção de mutações pontuais no DNA, os ensaios de LCR (reação de ligação em cadeia) realizados neste trabalho não foram capazes de discriminar as mutações da posição 1721 do gene SSU rDNA de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*.

- A técnica de HRM (dissociação em alta resolução), abordando diferenças nucleotídicas do gene SSU rDNA, foi capazes de discriminar *L. (L.) chagasi* de *L. (L.) amazonensis* e das espécies do subgênero *L. (Viannia)* e, abordando diferenças no gene *g6pd*, possibilitou a discriminação de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e das demais espécies do subgênero *L. (Viannia)*.

REFERÊNCIAS

- ABRAVAYA K.; CARRINO, J. J.; MULDOON, S.; LEE, H. H. Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR). **Nucleic Acids Res.**, v. 23, n. 4, p. 675-682, 1995.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; DE ANDRADE, H. F. JR.; BACHA, H.; PAGLIARI, C.; FERNANDES, E. R.; DUARTE, M. I.; NETO, V. A.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; CELESTE, B. J.; OLIVEIRA, J.; QUIROGA, M. M.; MASCHERETTI, M.; BOULOS, M. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin-embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. **Int. J. Dermatol.**, v. 48, n. 10, p. 1091-1095, 2009.
- BACHA, H. A.; TUON, F. F.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; OLIVEIRA, J.; NICODEMO, A. C.; QUIROGA, M. M.; MASCHERETTI, M.; BOULOS, M.; AMATO, V. S. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, n. 3, p. 173-178, 2011.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BARANY, F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 189-193, 1991.
- BOUSSLIMI, N.; BEN-AYED, S.; BEN-ABDA, I.; AOUN, K.; BOURATBINE, A. Natural infection of North African gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 6, p. 962-965, 2012.
- BRANDÃO-FILHO, S. P.; BRITO, M. E. ; CARVALHO, F. G ; ISHIKAWA, E. A. ; CUPOLILLO, E. ; FLOETER-WINTER, L. ; SHAW, J. J. 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.**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.
- CAMARGO, E. P.; SBRAVATE, C.; TEIXEIRA, M. M.; ULIANA, S. R.; SOARES, M. B.; AFFONSO, H. T ; FLOETER-WINTER, L. M. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. **J. Parasitol.**, v. 78, n. 1, p. 40-48, 1992.
- 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.**, v. 41, n. 2, p. 540-546, 2003.

CASTILHO, T. M.; CAMARGO, L. M. A.; MCMAHON-PRATTI, D.; PRATTI, D.; SHAW, J. J.; FLOTER-WINTER, L. M. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 1, p. 122-132,

CHANCE, M. L. ; PETERS, W. ; SHCHORY, L. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I : Observations on DNA. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 68, n. 3, p. 307-316, 1974.

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, n. 1, p. 12-17, 2004.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 117-118, 2006.

DIETRICH, P.; DUSSAN, M. P.; FLOTER-WINTER, L. M.; AFFONSO, M. H.; CAMARGO, E. P.; SOARES, M. B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 42, n. 1, p. 13-19, 1990.

DOS SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

FLOETER-WINTER, L. M. Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 7, n. 73, 2010. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa73_leishmania.htm>. Acesso em: 3 maio 2013.

FLOTER-WINTER, L. M.; CRUZ, A. K. Biologia molecular da Leishmania: genoma da Leishmania. In: Barral, A.; Costa, J. M. L. (Eds). **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**. FioCruz, Salvador, p. 24-38, 2011.

FORATTINI, O. P. Sobre os reservatórios naturais da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 2, n. 4, p. 195-203, 1960.

GALATI, E. A. B. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Patol. Trop.**, v. 32, n. 2, p. 235-261, 2003.

GARCEZ, L. M.; SOARES, D. C.; CHAGAS, A. P.; DE SOUZA, G. C.; MIRANDA, J. F.; FRAIHA, H.; FLOETER-WINTER, L. M.; NUNES, H. M.; ZAMPIERE, R. A.; SHAW, J. J. Etiology of cutaneous leishmaniasis and anthrophilic vectors in Juruti, Para State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 10, p. 2291-2295, 2009.

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

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.** São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

HARRIS, E.; KROPP, G.; BELLI, A.; RODRIGUEZ, B.; AGABIAN, N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 7, p. 1989-1995, 1998.

HERVÁS, J. ; CHACON-M DE LARA, F. ; SÁNCHEZ-ISARRIA, M. A. ; PELLICER, S.; CARRASCO, L. ; CASTILLO, J. A. ; GOMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. **J. Fel. Med. Surg.**, v. 1, p. 101–105, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 78, p. 747-755, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Academic Press, London, v. 1, p.1-120, 1987.

LAINSON, R.; DYE, C.; SHAW, J. J.; MACDONALD, D. W.; COURTENAY, O.; SOUZA, A. A.; SILVEIRA, F. T. Amazonian visceral leishmaniasis--distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 135-137, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. In: COX, F. E. G.; KREIER, J. P.; WAKELIN, D. (Ed.). **Microbiology and microbial infections, parasitology**. London: Topley & Wilson's, 2005. p. 313-349.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LOPEZ, M.; INGA, R.; CANGALAYA, M.; ECHEVARRIA, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; ORREGO, C.; AREVALO, J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, n. 3, p. 348-356, 1993.

MACEDO, A. M.; MELO, M. N.; GOMES, R. F.; PENA, S. D. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 53, p. 63-70, 1992.

MASSOIA E.; PARDIÑAS, U. F. El estado sistemático de algunos muroideos estudiados por Ameghino en 1889. Revalidación del genero *Necromys* (Mammalia, Rodentia, Cricetidae). Ameguiniana. **Rev. Asoc. Paleontol. Argent.** Buenos Aires, v. 30, p. 407-418, 1993.

MCCMAHON-PRATT, D.; BENNETT, E.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. **J. Immunol.**, v. 129, n. 3, p. 926-927, 1982.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2000, 62 p.

MINISTERIO DA SAUDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. [Monografia na internet] Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lv_grave_nc.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2013.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M. ; ROMANHA, A. J., SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

MORSY, T. A.; ABOU EL SEOUD, S. M. Natural infection in two pet cats in a house of a zoonotic cutaneous leishmaniasis patient in Imbaba area, Giza Governorate, Egypt. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 24, p. 199–204, 1994.

NASEREDDIN, A.; JAFFE, C. L. Rapid diagnosis of Old World Leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 6, p. 2240-2242, 2010.

NICODEMO, A. C.; AMATO, V. S.; FLOETER-WINTER, L. M.; ZAMPIERI, R. A.; FERNANDES, E. R.; DUARTE, M. I. Are the severe injuries of cutaneous leishmaniasis caused by an exacerbated Th1 response? **Parasite Immunol.**, v. 34, n. 8-9, p. 440-443, 2012.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIEVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Vet. Parasitol.**, v. 75, n. 2, p. 273–277, 1998.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DOS SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.

PASSOS, V. M. A. ; LASMAR, E. B. ; GONTIJO, C. M. F. ; FERNANDES, O. ; DEGRAVE, W. 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. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 91, p. 19–20, 1996.

PITA-PEREIRA, D.; ALVES, C. R.; SOUZA, M. B.; BRAZIL, R. P.; BERTHO, A. L.; DE FIGUEIREDO BARBOSA, A.; BRITTO, C. C. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*

in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 99, n. 12, p. 905-913, 2005.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.**, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008.

PITA-PEREIRA, D. D.; SOUZA, G. D.; PEREIRA, T. A.; ZWETSCH, A.; BRITTO, C.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia* (*Pintomyia*) *fischeri* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a probable vector of American cutaneous leishmaniasis: detection of natural infection by *Leishmania* (*Viannia*) DNA in specimens from the municipality of Porto Alegre (RS), Brazil, using multiplex PCR assay. **Acta Trop.**, v. 120, n. 3, p. 273-275, 2011.

POLI, A.; ABRAMO, F.; BARSOTTI, P.; LEVA, S.; GRAMICCIA, M.; LUDOVISI, A.; MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Vet. Parasitol.**, v. 106, n. 3, p. 181-191, 2002.

REITHINGER, R.; DUJARDIN ; J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 731 p.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G. ; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 65, p.111-125, 1990.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I.; MARÍN, C.; VARGAS, F.; CÓRDOVA, O.; BARRERA, M.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R.; ALUNDA, J. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico and Spain. **Exp Parasitol.**, v. 112, n. 1, p. 44-51, 2006.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, v. 2, n. 2237, p. 1261-1262, 1903.

ROTUREAU, B.; GEGO, A.; CARME, B. Trypanosomatid protozoa: a simplified DNA isolation procedure. **Exp Parasitol.**, v. 111, n. 3, p. 207-209, 2005.

SAF'JANOVA, V. M. Classification of the genus *Leishmania* Ross. In: **The Leishmanias, Protozoology**. Leningrad: Academy of Sciences; All Union Society of Protozoologists, p. 95-101, 1982.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; COULSON, A. R.. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J. Mol. Biol.**, v. 94, n. 3, p. 441-448, 1975.

SAVANI, E. S. M. M.; CAMARGO, M. C. G. O.; CARVALHO, M. R ; ZAMPIERE, R. A.; SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R. N.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, Sao Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.

SAVANI, E. S.; NUNES, V. L.; GALATI, E. A ; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A ; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 160, p. 18-24, 2009.

SCHONIAN, G.; SCHWEYNOCH, C.; ZLATEVA, K.; OSKAM, L.; KROON, N.; GRÄSER, Y.; PRESBER, W. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 77, n. 1, p.19-29, 1996. Erratum in : **Mol Biochem Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 273-274, 1996.

SCHONIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends Parasitol.**, v. 26, n. 10, p. 466-469, 2010.

SILVA, M. A. L.; MEDEIROS, R. A.; BRANDÃO-FILHO, S.; DE MELO, F. L.; MEDEIROS, Z. Molecular targets used in PCR for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. **Rev. El. Farm.**, v. 7, n. 3, p. 01-15, 2010.

SMITH, L. J.; BRAYLANA, R. C.; NUTKIS, J. E.; EDMUNSON, K. B.; DOWNING, J. R.; WAKELAND, E. K. Extraction of cellular DNA from human cells and tissues fixed in ethanol. **Anal. Biochem.**, v. 160, n. 1, p. 135-138, 1987.

TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Exp. Parasitol.**, v. 114, n. 4, p. 279-288, 2006.

TIBAYRENC, M. ; AYALA, F. J. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitol Today**, v. 7, n. 9, p. 228-232, 1991.

TOKUDA, Y.; NAKAMURA, T.; SATONAKA, K.; DOI, K.; BABA, S.; SUGIYAMA, T. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 748-751, 1990.

TUON, F. F.; SABBAGA AMATO, V.; FLOETER-WINTER, L. M.; DE ANDRADE ZAMPIERI, R.; AMATO NETO, V.; SIQUEIRA FRANÇA, F. O; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids - first report. **Int. J. Dermatol.**, v. 46, n. 6, p. 628-630, 2007.

ULIANA, S. R.; AFFONSO, M. H.; CAMARGO, E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Exp. Parasitol.**, v. 72, n. 2, p. 157-163, 1991.

ULIANA S. R.; NELSON K.; BEVERLEY S. M.; CAMARGO E. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 324-330, 1994.

ULIANA, S. R.; ISHIKAWA, E.; STEMPLIUK, V. A.; DE SOUZA, A.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. Geographical distribution of neotropical *Leishmania* of the subgenus *Leishmania* analysed by ribosomal oligonucleotide probes. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 3, p. 261-264, 2000.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999. 334 p.

WIEDMANN, M.; WILSON, W. J.; CZAJKA, J.; LUO, J.; BARANY, F.; BATT, C. A. Ligase chain reaction (LCR)--overview and applications. **PCR Methods Appl.**, v. 3, n. 4, p. S51-64, 1994.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **App. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. OMS – Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis**. Disponível em:< <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 14 abr. 2013.

YI, P.; JIANG, H.; LI, L.; DAI, F.; ZHENG, Y.; HAN, J.; CHEN, Z. A new genotyping method for detecting low abundance single nucleotide mutations based on gap ligase chain reaction and quantitative PCR assay. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 62, p. 161-167, 2012.

ZACKAY, A.; NASEREDDIN, A. ; TAKELE, Y.; TADESSE, D.; HAILU, W.; HURISSA, Z.; YIFRU, S.; WELDEGEGBREAL, T.; DIRO, E. ; KASSAHUN, A.; HAILU, A.; JAFFE, C. L. Polymorphism in the HASPB repeat region of East African *Leishmania donovani* strains. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 1, p. e2031, 2013.