BRUNA MATARUCCO SAMPAIO

**Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de
Leishmania infantum chagasi baseado em genes nucleares e
mitocondriais**

São Paulo

2016

BRUNA MATARUCCO SAMPAIO

Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseado em genes nucleares e mitocondriais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Dr. Arlei Marcili

De acordo: _____

Orientador(a)

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3320
FMVZ

Sampaio, Bruna Matarucco
Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseado em genes nucleares e mitocondriais / Bruna Matarucco Sampaio. -- 2016.
56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Dr. Arlei Marcili.

1. Filogenia. 2. *Leishmania infantum chagasi*. 3. Genes. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 27 de janeiro de 2014
CEUAx N. 2475240114

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO PROJETO À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 282.937.948-95

Título do projeto: Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum* chagasi baseado em genes nucleares e mitocondriais

Responsável: Arlei Marcili

Celular: 017997346651 e-mail: amarcili@usp.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, terá o prazo máximo de 30 dias para emissão do parecer. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://orion.fmvz.usp.br/>) por meio da sua senha de acesso.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SAMPAIO, Bruna Matarucco

Título: Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseado em genes nucleares e mitocondriais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esta dissertação a toda minha família, em especial meus pais Jair e Sandra, a minha irmã Cíntia e ao meu namorado Thonny, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir realizar este trabalho e concretizar este sonho.

Ao meu estimado Orientador Arlei Marcili, por ter acreditado em mim e por ter me ensinado tudo o que sei hoje.

Aos meus colegas da equipe de pesquisa, Juliana, Eduardo, e especialmente a Andréa, que tanto me auxiliou

Aos meus colegas de laboratório.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: Renato, Pedro, Marcos, Hilda, Sheila, Sueli, Danival, Virginia, Cristina, Zenaide.

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Faculdade de Saúde Pública que contribuíram de forma determinante para a minha formação;

A minha amada família, meus pais Jair e Sandra, por todo amor e carinho de sempre.

A minha irmã Cíntia, por toda a atenção e cumplicidade.

A meus tios Sônia, Hermelindo, Júnior e Iraci, pelos conselhos e apoio.

A meu primo Rafael, pela preocupação e atenção.

Aos meus avôs Meires e Osmar, Maria e Elpídio, pelo amor descrito nos olhos e pelo abraço apertado que sinto a todo o momento.

Ao meu namorado Thonny, pela compreensão e por todo seu apoio e carinho.

Aos meus amigos pessoais, Mayra Mara, Laiz, Daniel, Eva.

A CAPES pelo auxílio financeiro (bolsa) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP- pelo financiamento do projeto

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.”

Marcel Proust.

RESUMO

SAMPAIO, B. M. **Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseado em genes nucleares e mitocondriais.** [Intraspecific variation and biogeography of Brazilian isolates of *Leishmania infantum chagasi* based on nuclear and mitochondrial genes]. 2016. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As espécies do gênero *Leishmania* parasitam mamíferos do Novo e Velho Mundo e possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias. A Leishmaniose visceral é uma importante zoonose e possui canídeos silvestres e domésticos como importantes reservatórios conhecidos na diversidade genética de *Leishmania infantum chagasi* no Brasil ainda não é conhecida. Leishmaniose é uma doença severa com ampla distribuição geográfica com uma incidência de dois milhões de casos por ano e 350 milhões de pessoas em áreas de risco de infecção. O objetivo deste projeto foi avaliar a variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseados em genes nucleares e mitocondriais. Os marcadores SSUrDNA, gGAPDH, Citocromo b, Hsp 70, Quitinase e ITS1rDNA foram amplificados, sequenciados e comparados filogeneticamente pelos métodos de parcimônia e bayesiana através de análises concatenadas. As sequências obtidas apresentaram variabilidade entre 0 e 1% e a topologia gerada não evidenciou diferenças intraespecíficas entre os isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* e consequentemente padrões biogeográficos. Apesar dos resultados obtidos não refletirem a variabilidade esperada, as diversas sequências obtidas darão subsídios para a determinação e padronização de novos testes diagnósticos da Leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: *Leishmania infantum chagasi*. Filogenia. Leishmaniose. Variação intraespecífica.

ABSTRACT

SAMPAIO, B. M. **Intraspecific variation and biogeography of Brazilian isolates of *Leishmania infantum chagasi* based on nuclear and mitochondrial genes.** [Variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseado em genes nucleares e mitocondriais]. 2016. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The *Leishmania* species parasite mammals in the New World and have life cycles with alternating between vertebrates and invertebrates. Most species develops in blood-sucking arthropods, which may belong to different orders and families. Visceral leishmaniasis is an important zoonosis and has wild and domestic canids as important known reservoirs and genetic diversity of *Leishmania infantum chagasi* in Brazil is not yet known. Leishmaniasis is a severe disease with wide geographical distribution with an incidence of two million cases per year and 350 million people at risk in endemic areas. The aim of this study was to evaluate the intraspecific variation and biogeography based on nuclear and mitochondrial genes. The SSUrDNA markers, gGAPDH, cytochrome b, hsp 70, chitinase and ITS1rDNA were amplified, sequenced and compared phylogenetically by maximum parsimony and Bayesian methods in concatenated analysis. The variability of sequences was 0 to 1%, and the topology generated showed no intraspecific differences between Brazilian strains of *Leishmania infantum chagasi* and consequently biogeographic patterns. Although the results do not reflect the expected variability, the various sequences obtained will provide subsidies for the establishment and standardization of new diagnostic tests of canine visceral leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum chagasi*. Phylogeny. Leishmaniasis. Intraspecific variation.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BAB	Meio agar sangue (“ Blood Agar Base”)
BSA	Albumina bovina sérica
CHCl ₃	Clorofórmio
CytB	Citocromo b
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-trifosfato
dTTP	Desoxitimidina-trifosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
LIT	Meio de cultura Infuso de fígado
M	Molar
mg	Miligrama
MH	Microhematócrito
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
PBS	Salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Fragmentos de restrição de tamanhos polimorficos
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
Sarkosil	Lauril sarcosinato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Solução salina Tris-EDTA
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Tampão citrato de sódio/cloreto de sódio
TAE	Tampão Tris acetato-EDTA
CBT	Coleção Brasileira dos tripanossomatídeos da Universidade de São Paulo

TE	Tampão tris-EDTA
UV	Luz ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	MARCADORES MOLECULARES.....	20
2	ANÁLISE DE VARIABILIDADE MULTIGÊNICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI</i> ATRAVÉS DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS	28
2.1	INTRODUÇÃO.....	29
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.2.1	Cultivo e manutenção dos isolados de <i>Leishmania infantum</i> <i>chagasi</i> utilizados	30
2.2.3	Extração de DNA	30
2.2.4	Reações de PCR e marcadores moleculares para estudos filogenéticos	32
2.2.5	Purificação, clonagem e sequenciamento	32
2.2.6	Alinhamento das sequências obtidas e inferências filogenéticas	33
2.3	RESULTADOS.....	33
2.4	DISCUSSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS	38
3	CONCLUSÃO GERAL	45
	REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

Família Trypanosomatidae e o gênero *Leishmania*

A família Tripanossomatidae é um grupo distinto do Reino Protozoa, constituída por eucariotos unicelulares e flagelados (CAVALIER-SMITH, 2010; MASLOV et al., 2013; BARTHOLOMEU et al., 2014), pertencentes ao filo Euglenozoa e ordem Kinetoplastida (CAVALIER-SMITH, 2010; BARTHOLOMEU et al., 2014). Esta ordem Kinetoplastida caracteriza-se pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da única mitocôndria destes organismos, constituída por moléculas circulares de DNA concatenadas, localizadas na base do flagelo e que contém o DNA mitocondrial (kDNA) (SIMPSON, 1987; STUART; FEAGIN, 1992).

Os tripanossomatídeos incluem diversos parasitas de humanos, responsáveis por doenças que afetam mais de 20 milhões de pessoas e causam incontáveis infecções em outros mamíferos, principalmente nos países em desenvolvimento (BARTHOLOMEU et al., 2014). Estes parasitas, de acordo com a taxonomia tradicional (baseada em parâmetros morfológicos, hospedeiros de origem e nos ciclos de vida), foram divididos em gêneros: protozoários monoxênicos (possuem um único hospedeiro) parasitas de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Kentomonas*, *Blechomonas*, *Sergeia* e *Wallaceina*); e protozoários heteroxênicos, em cujos ciclos ocorre alternância entre hospedeiros invertebrados (geralmente artrópodes hematófagos) e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*) ou entre invertebrados, insetos fitófagos, e um hospedeiro vegetal (*Phytomonas*) (HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976; WALLACE et al., 1983; CAMARGO, 1998; BULAT et al., 1999; SANTOS et al., 2007; MAIA DA SILVA et al., 2010).

O gênero *Leishmania* é constituído por 30 espécies que infectam diferentes vertebrados e são transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae. Está distribuído em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo com exceção da Oceania (ASHFORD, 2000; CUNNINGHAM, 2002;

DESJEUX, 2004). Este é um grupo importante de parasitas causadores de uma doença complexa denominada leishmaniose, cujas manifestações clínicas exibem diferentes graus de gravidade, que variam a partir de lesões assintomáticas, cutâneas, mucocutâneas e viscerais que apresentam alterações sistêmicas (MICHALSKY et al., 2002; MARCILI et al., 2014).

Leishmania é transmitida por flebotomíneos (Diptera; Psychodidae; Phlebotominae) para diferentes espécies de mamíferos e lagartos. A transmissão de *Leishmania* para mamíferos ocorre em dois ciclos: zoonótico e antropológico, e estão divididos em dois subgrupos de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasita no intestino do vetor. Esta divisão está associada com a sua distribuição geográfica e ao desenvolvimento da *Leishmania* no vetor: Subgênero *Viannia* é composta de espécies restritas à região Neotropical e Subgênero *Leishmania* tem espécies distribuídas tanto no Novo como no Velho Mundo (MARCILI et al., 2009a,b,c, 2014).

Considerando as diferentes manifestações clínicas em humanos, as principais espécies de *Leishmania* podem ser classificadas em três complexos: o complexo *L. donovani*, que compreende a *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, responsáveis pela doença visceral; o complexo *L. mexicana* que inclui a *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonenses*, *L. (L.) enrietti*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) aristidesi* as quais são responsáveis pela doença em sua forma cutânea; e o complexo *L. braziliensis* que abrange as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) shawi*, responsáveis pela doença em sua forma mucosa ou mucocutânea (LAINSON; SHAW, 1987).

Leishmania infantum chagasi

Parasitas do gênero *Leishmania*, estão posicionados taxonomicamente no Reino Protista; Subreino Protozoa; Filo Euglenozoa; Classe Kinetoplastea; Ordem Trypanosomatida; Família Trypanosomatidae; Gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). As espécies causadoras de leishmaniose visceral pertencem ao subgênero *Leishmania*

e são representadas pelas espécies *Leishmania donovani*, *L. infantum* (NICOLE 1908) e *L. chagasi* (CUNHA; CHAGAS 1937; CABRERA, 1999).

Segundo Lainson e Shaw (1979) existem várias hipóteses relacionadas à origem de *L. chagasi* nas Américas. Devido a grande semelhança observada entre os agentes causadores de LV no Velho e Novo Mundo, *L. infantum* e *L. chagasi*, foi proposto que *L. chagasi* teria uma origem afro-europeia recente e que o parasita poderia ter sido trazido por cães infectados que acompanhavam os conquistadores portugueses e espanhóis (KILLICK-KENDRICK et al., 1984). Com base no perfil isoenzimático de cepas do parasito isoladas no Novo e Velho Mundo grandes semelhanças entre *L. infantum* e *L. chagasi* foram demonstradas. Lainson et al. (1987) contestam e argumentam que *L. chagasi* já existia muito antes da colonização, uma vez que canídeos silvestres foram encontrados infectados e foram observadas diferenças nos perfis de restrição de kDNA e nas proteínas de superfície de suas promastigotas.

Mauricio et al. (1999) através de estudos genéticos por técnica de amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD), de cepas *L. (L.) chagasi* isoladas de diferentes origens e países da América do Sul, particularmente do Brasil (humanos, cães domésticos e raposa selvagem - *Cercopithecus thous*) e cepas de *L. (L.) infantum* originadas de áreas endêmicas para leishmaniose visceral em países europeus da Bacia do Mediterrâneo, tais como Portugal e Espanha, demonstraram que as sequências de DNA de ambas as espécies de parasita eram idênticas. Por esta razão, concluíram que *L. (L.) chagasi* é sinônimo de *L. (L.) infantum* e, consequentemente, propuseram que *L. (L.) chagasi* não deveria ser considerada uma espécie válida (SILVEIRA; CORBETT, 2010).

Entretanto, Lainson e Shaw defenderam a manutenção do parasita em um nível subespecífico, como *Leishmania (L.) infantum chagasi*, com base em suas características etiológicas, como o habitat silvestre de seu vetor flebotomíneo, *Lutzomyia longipalpis*, e seu reservatório vertebrado natural, a raposa selvagem *Cercopithecus thous* (SILVEIRA; CORBETT, 2010). Além da raposa, outros hospedeiros já foram identificados, como o homem, cães domésticos e animais silvestres (canídeos, felinos e roedores) (DEANE, 1954; CUPOLILLO, 2000; SAVANI et al., 2004; RANGEL, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008; DE LIMA et al., 2008).

Estudo recente baseado em relações filogenéticas dos genes SSU rDNA e gGAPDH com diversos isolados brasileiros e europeus possibilitou a separação de *L. infantum chagasi* de *L. infantum* e, através dos valores de divergência destas sequências e história evolutiva dos hospedeiros vertebrados, foi proposto que *Leishmania (L.) infantum chagasi* teve sua introdução a cerca de cinco centenas de anos atrás, durante a colonização da América do Sul pelos europeus, através de cães domésticos infectados, legitimando a existência da subespécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* como uma unidade taxonômica válida (MARCILI et al., 2014).

Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que se encontra amplamente distribuída no mundo, considerada uma doença tropical negligenciada com ligações fortes e complexas com a pobreza (WHO, 2013), onde a *Leishmania infantum chagasi* é considerada o principal agente etiológico. É uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado. No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos (GONTIJO; MELLO, 2004).

Transmissão endêmica da doença já é relatada em 98 países tropicais e subtropicais, nos cinco continentes, com 350 milhões de pessoas em áreas de risco; a prevalência global é de cerca de 12 milhões em todo o mundo com incidência anual estimada em 0,2-0,4 milhões de casos de LV e 0,7-1,2 milhões de casos de LT. Mais de 90% dos casos mundiais de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (HAJJARAN et al., 2014).

A principal espécie transmissora da *L. infantum chagasi* no Brasil são fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, sub-família *Phebotominae*, espécie: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*. (MACMORRIS-ADIX; MOLLY, 2008). A infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo pela ingestão de formas amastigotas de *Leishmania* existentes no interior de células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (ROGERS et al., 2002). No trato digestivo anterior ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas que se transformam

rapidamente em promastigotas multiplicando-se ainda no sangue ingerido que está envolto por uma matriz peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue, a matriz peritrófica se rompe, liberando as promastigotas que vão colonizar o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas (LAINSON; SHAW, 1987). Através de um novo repasto sanguíneo, as fêmeas flebotomíneo infectada inoculam as formas promastigotas metacíclicas em um novo hospedeiro e ao serem fagocitadas pelos macrófagos, retornam à forma amastigota, multiplicam-se até rompê-los, sendo então, fagocitadas por novos macrófagos. Desta forma, ocorre à disseminação hematogênica para os tecidos ricos em células do SFM, como, linfonodos, fígado, baço e medula óssea (LAINSON; SHAW 1987; CAMARGO-NEVES et al., 2006).

Figura 1 - Ciclo da Leishmaniose

Fonte: Adaptado CDC, 2014.

A LV, forma mais grave da doença, é caracterizada por ataques de febre irregular, perda de peso substancial, inchaço do baço e do fígado, e anemia, e que é conhecido por afetar especialmente crianças. O tratamento para essas doenças existe, no entanto, como a maioria das doenças infecciosas, o custo, a toxicidade e

a resistência são obstáculos constantes para o tratamento em massa (MACMORRIS-ADIX; MOLLY, 2008; BALAÑA-FOUCE et al., 2014).

As manifestações clínicas clássicas da leishmaniose visceral canina são: linfadenomegalia, caquexia, lesões cutâneas, como: alopecia periocular, disqueratinização, hiperqueratoses, úlceras com aspecto de queimaduras, nódulos subcutâneos e erosões (mais freqüentes na ponta da orelha e focinho); onicogribose, anemia, hepato e esplenomegalia, aplasia de medula óssea, trombose, epistaxe, lesões oculares e poliartrites. A leishmaniose pode causar também: dermatite descamativa e seborréica, pneumonia, colite e doença renal crônica (TAFURI et al., 2001). As alterações laboratoriais são semelhantes às que ocorrem no homem. A anemia do tipo normocrônico é freqüente (62% dos casos), leucopenia moderada menos freqüente (33%) e plaquetopenia mais rara, porém associada a fenômenos hemorrágicos (FONTES et al., 2003).

A ampla distribuição desta doença atualmente está relacionada à migração, urbanização e desmatamento, que resultam em desenvolvimento urbano inadequado, que muitas vezes origina favelas e subúrbios pobres, levando a altas densidades populacionais e altas taxas de desnutrição. Associados a estes fatores, existem ainda as más condições de saneamento e aglomerados de lixo que levam a formação de locais propícios ao desenvolvimento dos vetores (MACMORRIS-ADIX; MOLLY, 2008; HAJJARON et al., 2014).

Os locais de reprodução dos flebotomíneos são lugares quentes e úmidos onde existe matéria orgânica, tais como árvores antigas, tocas de roedores, abrigos de animais, rachaduras em paredes e lixo. Nessas comunidades, todos esses habitats podem existir em grande proximidade, criando um ambiente favorável para as espécies vetores da enfermidade. A maior proximidade com animais domésticos, como galinhas, vacas e cães (potenciais reservatórios), também influenciam a dispersão da doença (MACMORRIS-ADIX; MOLLY, 2008).

Segundo Killick-Kendrick e Ward (1999), um flebotomíneo para ser identificado como vetor de *Leishmania* sp., precisa atender alguns princípios: demonstrar antropofilia, contato vetor-humano e caracterização de infecções naturais com a mesma espécie de *Leishmania* no humano e no inseto (DAVIES et al., 2000). No caso do vetor *Lutzomyia longipalpis*, as características do ciclo biológico, hábito hematofágico (fêmea) eclético, elevada antropofilia, adaptação aos ambientes naturais e artificiais, condições peridomiciliares propícias ao seu desenvolvimento

são alguns dos fatores determinantes para atual competência vetorial (KILLICK-KENDRICK, 1999; DIAS et al., 2003; RANGEL, 2005).

1.1 MARCADORES MOLECULARES

Genes nucleares

Um gene nuclear é um gene localizado no núcleo da célula de um eucarioto. O termo é usado para distinguir genes nucleares dos genes mitocondriais, e no caso dos vegetais, também o cloroplasto, hospeda seu próprio sistema genético e pode produzir proteínas a partir do zero (CAO et al., 1994).

Os genes nucleares representam o genoma da célula hospedeira original, enquanto ambas as organelas ainda retêm um pequeno genoma, embora muitos dos genes das organelas se moveram para o núcleo, durante o curso da evolução (MOORE, 1995).

A maioria das proteínas de uma célula é produto de RNA mensageiro transcrito a partir de genes nucleares, incluindo a maioria das proteínas das organelas, que são produzidas no citoplasma como todos os produtos de genes nucleares e, em seguida, transportados para a organela. Genes no núcleo estão dispostos de forma linear sobre cromossomos, que servem como um pré-requisito para a replicação e a regulação da expressão do gene. Como tal, geralmente sob rigoroso controle de número de cópias, replicam uma única vez por ciclo celular (NAYLOR; BROWN, 1997).

Gene ribossômico - SSUrDNA

A sequência do gene ribossômico tem sido muito utilizada para inferir relações filogenéticas entre os tripanossomatídeos e entre estes e representantes de outras famílias da ordem Kinetoplastida e filo Euglenozoa. Os genes nucleares de rDNA dos tripanossomatídeos possuem uma estrutura complexa e característica, com um

dos mais complexos padrões de moléculas maduras de RNA. A estrutura do DNA ribossômico (rDNA) compreende uma unidade de repetição composta por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e espaçadores intergênicos (IGS), que se repetem "in tandem" mais de 100 vezes no genoma (HERNÁNDEZ et al., 1990). Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição, o pré-rRNA, seguido por diversas etapas de processamento originando três moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior) (SCHONIAN et al., 2000).

Nos tripanossomatídeos, a sequência da subunidade 24S é interrompida por um espaçador interno, gerando duas moléculas, 24S α e 24S β . Estas regiões transcritas não conservadas do pré-rRNA correspondem aos espaçadores transcritos internos (ITS) e externo (ETS). As unidades de transcrição dos genes ribossômicos são alternadas por uma região espaçadora, espaçador intergênico (IGS), com tamanho e sequência altamente variáveis (SOGIN et al., 1986; DIETRICH et al., 1993).

Esses genes são utilizados para inferências de relacionamentos filogenéticos, pois são funcionalmente equivalentes em todos os organismos e apresentam domínios com diferentes graus de conservação (SOGIN et al., 1986). A presença de diversas regiões, transcritas ou não, que exibem diferentes graus de conservação, faz desses genes excelentes alvos para identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos (SOUTO et al., 1996; STEVENS et al., 2001). Além disso, o polimorfismo de sítios de enzimas de restrição nos genes ribossômicos de tripanossomatídeos também pode auxiliar na classificação de gêneros.

Gene ribossômico - ITS1

A PCR utilizada para amplificação de espaços internos transcritos (ITS) estão entre os métodos mais utilizados para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* no Velho Mundo (SCHÖNIAN et al., 2011).

Schönian et al., 2003 desenvolveram um método de PCR, visando uma região do espaçador interno transcrito (ITS1), altamente específico e sensível, capaz de

detectar aproximadamente 0,2 parasitas por amostra (SCHÖNIAN et al., 2003) e identificar todas as espécies de *Leishmania* clinicamente relevantes que são distinguidas por sequenciamento de DNA ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do produto da PCR (DÁVILA; MOMEN, 2000; SCHÖNIAN et al., 2000, 2003). A utilização da amplificação de ITS1 usando a enzima de restrição *Hae* III tem sido demonstrada ser capaz de distinguir entre quase todas as espécies de *Leishmania*, embora a distinção de algumas espécies, tais como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, só é possível através de análise da sequência desta região (SCHÖNIAN et al., 2003).

Os espaçadores de ITS são muito mais variáveis que as regiões SSU e LSU. A região entre a SSU e a LSU contém três regiões: ITS1, 5.8S (altamente conservada) e ITS2. As sequências de ITS1 e ITS2 diferem inter e intraespecificamente, sendo excelentes para análises de organismos filogeneticamente próximos assim como alvos para diagnóstico.

Análises do tamanho e de sítios de restrição de ITS rDNA, especialmente ITS1, revelaram-se valiosas no estudo de variabilidade inter e intraespecíficas de flagelados dos gêneros *Trypanossoma* (CUERVO et al., 2009; MAIA DA SILVA et al., 2010).

HSP 70

Proteínas de choque térmico (HSPs) são polipeptídeos evoluídos e conservados que contêm imunógenos poderosos com um papel importante em várias infecções em seres humanos, incluindo aqueles por *Leishmania*. As HSPs são também conhecidas como chaperonas moleculares e foram originalmente identificados devido à sua maior expressão em células chocadas pelo calor (ANDRADE et al., 1989).

As proteínas de choque térmico (HSP) são moléculas que desempenham papéis importantes na dobragem das proteínas, a montagem de complexos de proteínas e a translocação de proteínas através de compartimentos celulares conservados, bem como em vários processos imunológicos (RAFATI et al., 2007).

Em estudos realizados com parasitas foi observado que a HSP70 (proteína de choque térmico de peso molecular 70) é expressa como um mecanismo de defesa celular, possibilitando a sobrevivência do parasita nos diferentes ambientes térmicos aos quais o organismo é exposto em seu ciclo de vida (DORES-SILVA et al., 2015).

A proteína de 70 kDa de choque térmico (HSP70) é conservada entre procariotas e eucariotas, e da proteína bem como o seu gene de codificação foram utilizadas em estudos filogenéticos de diferentes parasitas. Apesar de o uso frequente de identificação de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo com base em polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene de hsp70, ele nunca foi sequenciado extensivamente para estudar as relações evolutivas (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

Estudos anteriores com alinhamentos múltiplos, incluindo um grande número de HSP70 de diferentes organismos e funções divergentes, destacam a conservação universal perto de resíduos específicos dentro da sequência da proteína (KARLIN; BROCCHERI, 1998).

A organização dos loci da HSP70 foi encontrada para ser bem conservada entre *L. infantum* e as outras espécies analisadas, com a exceção de *L. braziliensis*, que mostrou a organização mais divergente. Os dois tipos de genes HSP70 (HSP70-I e HSP70-II) estavam presentes em todas as espécies de *Leishmania*, com exceção para a *L. braziliensis*, que não tem o gene HSP70-II. Com base nos polimorfismos no loci HSP70 é possível diferenciar as espécies do Velho e do Novo Mundo dentro do subgênero *Leishmania*. A análise da expressão indicou que a acumulação dependente da temperatura da HSP70-I mRNAs também é conservada entre as espécies de *Leishmania*, excepto para *L. braziliensis*. No entanto, nesta espécie, a análise da síntese da HSP70 revelou que o RNAm de HSP70 são também preferencialmente traduzida a temperaturas de choque térmico (PRUGNOLLE, 2007).

Quitinase

As quitinases têm sido utilizadas como sendo de importância no desenvolvimento do ciclo de vida e transmissão de uma variedade de organismos dos protozoários (HEITZ et al., 1994).

Na natureza existe uma grande diversidade de quitinases sendo identificadas em bactérias, plantas, algumas classes de invertebrados e todas as classes de vertebrados (PERRAKIS et al., 1994). Diante disso, a maioria das sequências dessas proteínas é altamente conservada em certas regiões e não toleram mutações, no entanto prováveis adaptações devem ter ocorrido nos organismos que as expressam, fazendo com que em determinadas regiões suas sequências de nucleotídeos sejam bastante variáveis (YANG et al., 2004).

Durante o desenvolvimento dentro do intestino médio do vetor flebotomíneo, parasitas de *Leishmania* depois de submetidos a diferenciação e multiplicação deve escapar da matriz peritrófica (PM). Embora a quitinase da *Leishmania* acredita-se participar na promoção da fuga do parasita a partir do PM por indução de degradação de fibras de quitina, é concebível que um derivado de quitinase-flebótomo também pode ter um papel em tal caso (YAN et al., 2008).

A quitina, um polímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc), é o principal componente no exoesqueleto de insetos e também está presente na matriz peritrófica tipo 1 (PM 1) e tipo 2 (PM2), onde ele tem provavelmente um papel estrutural importante. O PM2 é produzido constitutivamente por células especializadas na cárdia (válvula stomodeal), localizado na junção entre o estômago e o intestino médio, enquanto o PM1 é sintetizado geralmente em resposta direta ao sangue e alimentação (TELLAM et al., 1999; SHAO et al., 2001).

Gene codificador da enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH)

Nas espécies da família Trypanosomatidae, as enzimas envolvidas no metabolismo de glicerol são encontradas em organelas peculiares, chamadas glicossomos. O compartilhamento de enzimas da via glicolítica em

tripanossomatídeos contrasta com sua localização citossólica nos demais eucariotos. Em tripanossomas, foram encontrados dois genes que codificam a enzima glicossômica (gGAPDH) e um gene que codifica uma enzima citosólica (cGAPDH) (MICHELS et al., 1986; KENDALL et al., 1990).

Os genes de gGAPDH apresentam duas cópias praticamente idênticas e por codificarem proteínas, estão sujeitos a diferentes pressões seletivas e taxas de evolução se comparados aos genes ribossômicos. Os genes de gGAPDH são excelentes marcadores para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, permitindo alinhamentos confiáveis de sequências de organismos geneticamente distantes (HAMILTON et al., 2004, 2007).

Estudos filogenéticos utilizando sequências de gGAPDH e SSU rRNA de um grande número de espécies de tripanossomatídeos geraram topologias congruentes e análises independentes e combinadas desses genes têm sido recomendadas na descrição de gêneros, subgêneros e espécies de tripanossomatídeos (HAMILTON et al., 2004; VIOLA et al., 2009b; MASLOV et al., 2010).

Genes mitocondriais

DNA mitocondrial nos tripanossomatídeos é conhecido como DNA do cinetoplasto (kDNA) e representa ~20-25% do DNA celular total. Os maxicírculos correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos, codificando as proteínas necessárias para a atividade mitocondrial. Os minicírculos codificam as moléculas de RNAs-guias utilizadas na edição de transcritos de maxicírculos (SIMPSON et al., 1987). Uma característica importante no DNA mitocondrial é sua alta taxa evolutiva, ou seja, de substituições de base é muito alta, quando comparada a do genoma nuclear, que se acredita ser 10 vezes superior a de um gene de cópia única nuclear (MEYER, 1997). A taxa de evolução do DNA mitocondrial não é homogênea entre os seus diferentes genes. Alguns genes acumulam mutações mais rápidas, enquanto os genes de citocromo b estão entre os mais conservados. A ausência de recombinação e sua alta taxa de evolução, heterogênea entre seus genes, fazem com que o DNA mitocondrial seja um excelente marcador para taxonomia e estudos filogenéticos (MEYER, 1997).

Citocromo B

O gene citocromo b, está contido no genoma mitocondrial de uma ampla variedade de formas de vida e codifica a subunidade catalítica central de uma enzima presente na cadeia respiratória mitocondrial. O gene tem sido amplamente utilizado para estudos filogenéticos e identificação de animais e plantas (IRWIN; KOCHER; WILSON, 1991; DEGLI ESPOSTI et al., 1993).

O citocromo b tem sido amplamente utilizado em estudos filogenéticos e filogeográficos e mais recentemente em análises forenses em amostras com DNA muito degradado ou escasso e nas situações onde não é possível obter resultados pelo DNA nuclear. As características deste gene codificante permitem que, através da sua amplificação por PCR e sequenciamento, seja possível a identificação de uma espécie (MEYER, 1995). O citocromo b é a subunidade catalítica central da ubiquinol citocromo c reductase, uma enzima que está presente na cadeia respiratória da mitocôndria e na cadeia respiratória do ciclo foto-redox de muitas bactérias, todos os organismos eucariotos necessitam desta classe de enzima redox, e consequentemente do citocromo b para a conversão de energia (FARIA et al., 2011).

O gene citocromo b é considerado um excelente marcador, amplamente usado como ferramenta em filogenias moleculares e é provavelmente o gene mitocondrial melhor conhecido em relação à estrutura e função de seu produto protéico (DEGLI ESPOSTI et al., 2014). Seu uso se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contêm sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. (LOVEJOY; ARAÚJO, 2000).

Devido ao grande impacto, a leishmaniose é hoje uma das doenças de maior preocupação para a saúde pública, tornando-se fundamental conhecer a origem e filogenia do agente causador, para possibilitar avanços em outras áreas, como a descoberta de novos marcadores moleculares ideais para desenvolvimento de futuros diagnósticos mais eficazes (FIGUEIREDO et al., 2008a).

O gene citocromo b, têm sido utilizado em vários estudos de relações filogenéticas em mamíferos, é o gene que contém as maiores informações de sequências a partir de diferentes espécies de mamíferos disponíveis (IRWIN; KOCHER; WILSON, 1989). A variabilidade de sequências de citocromo b faz com que tenha maior utilidade para a comparação de espécies do mesmo gênero ou da mesma família. Os resultados obtidos em muitos dos estudos filogenéticos em que este gene tem sido utilizado, levou à proposição de novos sistemas de classificação que melhor representem as relações filogenéticas entre as espécies estudadas (ARNASON et al., 1995).

A maioria dos trabalhos utiliza um número muito pequeno de isolados de *L. infantum chagasi* resultando em baixa variabilidade interespecífica e impossibilitando a verificação de padrões biogeográficos dos isolados sulamericanos e principalmente brasileiros e ainda possíveis genótipos relacionados aos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Este estudo viabiliza a análise filogenética e a biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseado em genes mitocondriais e nucleares demonstrando a importância de pesquisas moleculares para doenças de interesse de saúde pública.

2 ANÁLISE DE VARIABILIDADE MULTIGÊNICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI* ATRAVÉS DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS

RESUMO

As espécies do gênero *Leishmania* parasitam mamíferos no Novo Mundo e possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias. A Leishmaniose visceral é uma importante zoonose e possui canídeos silvestres e domésticos como importantes reservatórios conhecidos e a diversidade genética de *L. infantum chagasi* no Brasil ainda não é conhecida. Leishmaniose é uma doença severa com ampla distribuição geográfica com uma incidência de dois milhões de casos por ano e 350 milhões de pessoas em áreas de risco de infecção. O objetivo deste projeto foi avaliar a variação intraespecífica e biogeografia de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* baseados em genes nucleares e mitocondriais. Os marcadores SSUrDNA, gGAPDH, Citocromo b, Hsp 70, Quitinase e ITS1rDNA foram amplificados, sequenciados e comparados filogeneticamente pelos métodos de parcimônia e bayesiana através de análises concatenadas. As sequências obtidas apresentaram variabilidade entre 0 e 1% e a topologia gerada não evidenciou diferenças intraespecíficas entre os isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* e consequentemente padrões biogeográficos. Apesar dos resultados obtidos não refletirem a variabilidade esperada, as diversas sequências obtidas darão subsídios para a determinação e padronização de novos testes diagnósticos da Leishmaniose visceral canina.

2.1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Leishmania* parasitam mamíferos no Velho e Novo Mundo e possuem ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados (SIMPSON, 1987). A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos que podem pertencer a diversas ordens e famílias (BARTHOLOMEU et al., 2014). A Leishmaniose visceral é uma importante zoonose e possui canídeos silvestres e domésticos como importantes reservatórios conhecidos.

No Brasil, país que representa o maior número (90%) dos casos de leishmaniose visceral no Novo Mundo (ROMERO; BOELAERT, 2010), são conhecidas ao menos oito espécies de *Leishmania* responsáveis pela infecção em humanos, onde a *L. (L.) chagasi* é a responsável pela forma visceral da doença no Brasil (GRIMALDI JR., 1991), sendo o principal vetor o mosquito *Lutzomyia longipalpis* (MAURÍCIO et al., 1999; MAURÍCIO et al., 2000; KUHLS et al., 2005; QUISPE-TINTAYA et al., 2005; DANTAS-TORRES et al., 2006, 2007).

Estudos realizados com algumas espécies de leishmanias apontam uma grande complexidade do ciclo silvestre e doméstico em biomas brasileiros, a variabilidade genética de *L. (L.) infantum chagasi* no Brasil ainda não é totalmente conhecida (MAURÍCIO et al., 1999). Ressalta-se o fato que existem poucos trabalhos realizados com amostras de diferentes regiões do país. Ao estudar a filogenia, ou também conhecida de filogênese, é o termo mais utilizado para definir hipóteses de relações evolutivas, ou seja, relações filogenéticas, de um grupo de organismos. Em outras palavras, pode ser definida como o termo que visa determinar as relações ancestrais entre espécies conhecidas e os padrões biogeográficos envolvidos (MARCILI et al., 2014).

Assim, o presente estudo tem por objetivo principal, o conhecimento da variabilidade genética intraespecífica de isolados brasileiros de *Leishmania infantum chagasi* através do estudo filogenético baseado em marcadores nucleares e mitocondriais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Materiais e métodos utilizados durante este trabalho.

2.2.1 Cultivo e manutenção dos isolados de *Leishmania infantum chagasi* utilizados

Os isolados de *L. infantum. chagasi* que foram utilizados neste estudo foram depositados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos locada no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A localidade e hospedeiros dos isolados que foram utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 1. Estes isolados são obtidos de cães domésticos e canídeos silvestres de diversas regiões geográficas brasileiras.

Para a manutenção dos isolados e obtenção de massa de parasitas para os estudos moleculares, os parasitas foram crescidos em fase sólida BAB (blood agar acrescido de 15% sangue de carneiro desfibrinado) e fase líquida de meio LIT líquido suplementado com 20% de soro fetal bovino a (28°C) (MARCILI et al., 2014).

2.2.3 Extração de DNA

Os parasitas obtidos em cultura foram lavados com PBS 1X e a massa de parasitas foi submetida a extração de DNA pelo método de Fenol-Clorofórmio (Gene Quant®) e quantificadas em espectrofotômetro (FERREIRA et al., 2008; VIOLA et al., 2008; LIMA et al., 2012).

Quadro 1 - Isolados de *Leishmania* que foram utilizados neste projeto com hospedeiros e origem geográfica

(continua)

CBT	Hospedeiro		Origem geográfica		Espécie de tripanossomatídeo
01	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Jaboticabal	SP	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
12	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Recreio	RJ	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
13	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Mangaratiba	RJ	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
14	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Ilha Grande	RJ	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
15	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Barra da Tijuca	RJ	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
16	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Recreio	RJ	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
17	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Cuiabá	MT	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
18	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Ilha de Guaratiba	RJ	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
20	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Cuiabá	MT	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
22	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Caucaia	CE	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
23	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Fortaleza	CE	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
24	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Jequié	BA	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
25	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Campo Grande	MS	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
26	<i>Canis familiaris</i>	Cão		DF	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
27	<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro do Mato		PA	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
28	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Teresina	PI	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
29	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Teresina	PI	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
30	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Uruguaiana	RS	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
31	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Uruguaiana	RS	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
34	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Petrolina	PE	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
37	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Petrolina	PE	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
39	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Santarém	PA	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
40	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Santarém	PA	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
43	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Santarém	PA	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
44	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Santarém	PA	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
49	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Campo Grande	MS	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
50	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Campo Grande	MS	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
54	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Teresina	PI	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
55	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Teresina	PI	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
56	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Campo Grande	MS	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
57	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Campo Grande	MS	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
62	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Petrolina	PE	<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
72	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Brasil		<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
73	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Brasil		<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
88	<i>Homo sapiens</i>	Humano	Brasil		<i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>

(conclusão)

CBT	Hospedeiro	Origem geografica	Espécie de tripanossomatídeo
96	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Caxias MA <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
105	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Natal RN <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
106	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Natal RN <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
107	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Natal RN <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
108	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Natal RN <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
124	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Natal RN <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
125	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Natal RN <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
126	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Natal RN <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
153	<i>Canis familiaris</i>	Cão	São Domingos MA <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>
179	<i>Canis familiaris</i>	Cão	Patos PA <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>

(Fonte: SAMPAIO B. M.; 2014)

2.2.4 Reações de PCR e marcadores moleculares para estudos filogenéticos

As reações de PCR (“polymarese chain reaction”) para os marcadores utilizados foram realizadas de acordo com os estudos já realizados e referenciados. As amostras de DNA foram submetidas a reações PCR (“polymerase chain reaction”). Os marcadores utilizados neste estudo foram: SSU rDNA (HERNÁNDEZ et al.; 1990; MASLOV et al., 1996), ITS1 SSUrDNA (SCHÖNIAN et al., 2011), gGAPDH (STEVENS et al., 1999; MAIA DA SILVA et al., 2004a,b), citocromo b (WESTENBERGER et al., 2006), quitinase (YANG et al., 2004) e hsp 70 (ANDRADE et al., 1989).

2.2.5 Purificação, clonagem e sequenciamento

Fragmentos de DNA amplificados por PCR (produtos amplificados em três reações independentes) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com Sybr Safe. Fragmentos de DNA amplificados por PCR, purificados

foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI 3500.

2.2.6 Alinhamento das sequências obtidas e inferências filogenéticas

As sequências obtidas, por PCR, dos diferentes genes utilizados como alvo, foram submetidas a alinhamentos múltiplos pelo programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e manualmente ajustados no programa GeneDoc (NICHOLAS et al., 1997). O alinhamento foi usado para construir árvores filogenéticas usando máxima parcimônia no programa PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002), com 500 réplicas de bootstrap e análise Bayesiana utilizando MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), com 1.000.000 repetições.

2.3 Resultados

Foram obtidos fragmentos de amplificação para os seis marcadores moleculares propostos dos 42 isolados de *Leishmania infantum chagasi* depositados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos. Os 294 fragmentos amplificados foram sequenciados e utilizados na construção dos alinhamentos por cada marcador e concatenado.

A variabilidade intraespecífica variou entre 0 e 1% entre os diferentes marcadores calculada a partir dos alinhamentos de cada gene. A região do ITS1 SSUrDNA apresentou a maior variabilidade (1%) e no gene de gGAPDH não houve diferença e todas as sequencias foram idênticas.

O alinhamento dos seis marcadores concatenados totalizou 5337 pares de bases que foram utilizados nas análises de máxima parcimônia e bayesiana. O

dendograma obtido segregou os isolados de *L. infantum chagasi* em três grupos: 1) composto por três isolados de Santarém no Pará (93% bootstrap e 0.95 de probabilidade a *posteriori*); 2) composto por um isolado de Jequié na Bahia e outro de Campo Grande no Mato Grosso do Sul (84% de bootstrap e 0.90 de probabilidade a *posteriori*); 3) todos os demais isolados utilizados no estudo (100% de bootstrap e 1.0 de probabilidade a *posteriori*). Não foi possível verificar diferenças entre os isolados de cães domésticos e canídeos silvestres (Figura 1).

A baixa de variabilidade entre os isolados através dos genes analisados impossibilita a identificação de padrões e processos evolutivos em *Leishmania infantum chagasi*.

Figura 1 - Dendograma baseado nas sequências de SSUrDNA, ITS1 rDNA, gGAPDH, citodromo B, Hsp70 e quitinase concatenados de 42 isolados de *Leishmania infantum chagasi* utilizados nas análises de máxima parcimônia e Bayesiana com 5337 caracteres. Números dos suportes de ramo estão localizados nos ramos (bootstrap/probabilidade a *posteriori*). Todas as sequências utilizadas neste estudo foram obtidas neste estudo

2.4 DISCUSSÃO

Devido ao grande impacto, a leishmaniose é hoje uma das doenças de maior preocupação para a Saúde Pública, tornando-se fundamental conhecer a origem e filogenia do agente causador, para possibilitar avanços em outras áreas, como a descoberta de novos marcadores moleculares ideais para desenvolvimento de futuros diagnósticos mais eficazes (FIGUEIREDO et al., 2008a).

O gênero *Leishmania* é constituído por cerca de 30 espécies que infectam vertebrados de diferentes ordens (répteis e mamíferos) transmitidas por vários invertebrados hematófagos da família Psychodidae. Está distribuído em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo com exceção da Oceania (ASHFORD, 2000; CUNNINGHAM, 2002; DESJEUX, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a variabilidade intraespecífica de *L. infantum chagasi* variou entre 0 e 1% entre os diferentes marcadores nucleares e mitocondriais utilizados. Os genes citocromo B, chitinase, hsp70, gapdh e ITS1 não apresentaram variabilidade para os isolados analisados de *L. infantum chagasi* brasileiros demonstrando não tratar-se de bons marcadores para estudos de variabilidade intraespecífica ou estudos filogeográficos, mas corrobora os dados obtidos com os genes de SSU rDNA e gGAPDH na segregação dos isolados sul-americanos dos isolados de *L. infantum* europeias.

Tal fato corrobora outros estudos realizados, porém baseados em um único marcador molecular, que demonstra que o gênero *Leishmania infantum chagasi* é pouco variável quando é testada com esses genes mais conservados, porém quando utilizada metodologias mais variáveis, como microssatélites, é possível detectar e visualizar uma variabilidade mais expressiva. Porém, tais metodologias não possibilitam inferências evolutivas.

Os microssatélites são pequenos fragmentos repetidos em tandem distribuídos no genoma dos organismos eucariotos com altas taxas de mutação. O uso de microssatélites como ferramenta molecular para a análise de isolados de *Leishmania* torna-se importante diante deste panorama, uma vez que atualmente existem

poucos estudos utilizando estes marcadores no Brasil. Esta ferramenta tem sido utilizada para a análise da estrutura populacional de *Leishmania* em outros países e tem contribuído para a elucidação de aspectos epidemiológicos, como a dispersão do parasita em áreas endêmicas e a origem de surtos de LV (JAMJOOM et al., 2004; OCHSENREITHER et al., 2006; KUHLS et al., 2007, 2008; MONTROYA et al., 2007; AMRO et al., 2009; FERREIRA et al., 2012). No Brasil a análise de microsatélites possibilitou segregar as espécies do subgênero *Viannia* (KUHLS et al., 2013). Isolados de *Leishmania infantum chagasi* de cães do estado de São Paulo foram separados em duas populações baseados na mesma metodologia (MOTOIE et al., 2013).

Porém é válido ressaltar que a metodologia de microsatélites possibilita o estudo da estrutura populacional de diferentes espécies de *Leishmania*, mas não possibilita as inferências filogenéticas ou a história evolutiva do gênero ou espécies.

A baixa diversidade genotípica observada como resultado da análise por marcadores nucleares e mitocondriais do presente estudo pode ser explicado por todas as amostras analisadas são de áreas endêmicas do Brasil, portanto a distância geográfica entre as regiões de onde cada cepa foi isolada pode estar relacionada com pouca distância genética observada (LUKES et al., 2007).

A utilização dos diferentes marcadores propostos neste estudo não foram suficientemente variáveis para a detecção de subgrupos e correlação biogeográfica, mas alguns destes marcadores foram importantes na segregação dos isolados brasileiros e europeus e revisão taxonômica de *L. infantum chagasi*. Apesar dos três grupos formados não há correlação entre os hospedeiros de origem ou localização geográfica. Tal fato não exclui a metodologia filogenética multigênica, a ausência de variabilidade encontrada reflete o comportamento evolutivo dos marcadores selecionados e a seleção de novos marcadores ou abordagens filogenômicas podem evidenciar padrões biogeográficos.

A variabilidade intraespecífica e os padrões biogeográfico já são bem conhecidos para outras espécies de tripanossomatídeos com ampla distribuição geográfica e evidenciados com um número menor de marcadores, com *Trypanosoma cruzi* (MARCILI et al., 2009a,b,c; RAMIREZ et al., 2012), *T. rangeli* (MAIA da Silva et al., 2004; 2007), *T. theileri* (RODRIGUES et al., 2006, 2010; GARCIA et al., 2011), *T. cruzi marinkellei* (MARCILI et al., 2013) e *T. vivax*

(RODRIGUES et al., 2008). As baixas taxas evolutivas descritas para o gênero *Leishmania* (MARCILI et al., 2014) são corroboradas pelos dados obtidos neste estudo.

Apesar dos resultados obtidos não refletirem a variabilidade esperada, as diversas sequencias obtidas darão subsídios para a determinação e padronização de novos testes diagnósticos da Leishmaniose visceral que ainda não possuem marcadores confiáveis.

REFERÊNCIAS

- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1269–1281, 2000.
- BARTHOLOMEU, D. C.; PAIVA, R. M. C.; MENDES, T. A. O.; DA ROCHA, W. D.; TEIXEIRA, S. M. R. Unveiling the intracellular survival gene kit of Trypanosomatid Parasites. **PLoS Pathog.**, v. 10, n. 12, p. e1004399, 2014. doi: 10.1371/journal.ppat.1004399.
- BOTILDE, Y.; LAURENT, T.; QUISPE TINTAYA, W.; CHICHARRO, C.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; KUHLS, K.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. **Infect Genet Evol.**, v. 6, n. 6, p. 440-6, 2006.
- BULLE, B.; MILLON, L.; BART, J. M.; GÁLLEGO, M.; GAMBARELLI, F.; PORTÚS, M.; SCHNUR, L.; JAFFE, C. L.; FERNANDEZ-BARREDO, S. ALUNDA, J. M.; PIARROUX, R. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. **J Clin Microbiol.**, v. 40, n. 9, p. 3391-7, 2002.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, p. 342-345, 2010.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol.**, v. 72, p. 132–141, 2002.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Vet Parasitol.**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev Soc Bras Med trop.**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DOLEZEL, D.; JIRKU, M.; MASLOV, D. A.; LUKES, J. Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small subunit rRNA sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1943-1951, 2000.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinfo Online**, v. 1, p. 47-50, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/pdf/ebo-01-47.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2015.
- FERREIRA, R. C.; DE SOUZA, A. A.; FREITAS, R. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; BARRET, T. V.; SHAW, J. J.; TEIXEIRA, M. M. G. A phylogenetic lineage of

closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 55, p. 427-435, 2008.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Appl. Soil Ecol.**, v. 40, p. 182-188, 2008.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C.; VAN DER AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, n. 2, p. 238-245, 2010.

GELANEW, T.; CRUZ, I.; KUHLS, K.; ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; HAILU, A.; SCHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing revealed high genetic variability of *Leishmania donovani* strains isolated during and after a Kala-azar epidemic in Libo Kemkem district, northwest Ethiopia. **Microbes Infect.**, v. 13, n. 6, p. 595-601, 2011.

GRIMALDI JR., G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 645-661, 1991.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 44, p. 15-25, 2007.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J.; GIBSON, W. C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **Int J Parasitol.**, v. 34, p. 1393-1404, 2004.

HERNÁNDEZ, R.; RIOS P.; VALDÉS A. M.; PIÑERO D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. **Mol. Biochem Parasitology**, v. 41, n. 2, p. 207-12, 1990.

KENDALL, G.; WILDERSPIN, A. F.; ASHALL, F.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the hotspot topogenic signal model. **EMBO J.**, v. 9, n. 9, p. 2751-8, 1990.

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 1224-1234, 2005.

KUHLS, K.; KEILONAT, L.; OCHSENREITHER, S.; SCHAAR, M.; SCHWEYNOCH, C.; PRESBER, W.; ACHÖNIAN, G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 3, p. 334-43, 2007.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.
- LEBLOIS, R.; KUHLS, K.; FRANÇOIS, O.; SCHÖNIAN, G.; WIRTH, T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. **Infect Genet Evol.**, v. 11, n. 5, p. 1091-5, 2011.
- LIMA, L.; MAIA DA SILVA, F.; NEVES, L.; ATTÍAS, M.; TAKATA, C. S. A.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. G. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. Nov., in african bats closely related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and allied species. **Protist.**, v. 163, p. 856-872, 2012.
- LUKES, J.; MAURICIO, I. L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J. C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J. P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K. W.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F. J.; MILES, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 104, n. 22, p. 9375-80, 2007.
- LUYO-ACERO, H.; UEZATO, M.; OSHIRO, K.; TAKEI, K.; KARIYA, K.; KATAKURA, E.; GOMEZ-LANDIRES, Y.; HASHIGUCHI, S. Nonaka. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. **Parasitology**, v. 128, p. 483–491, 2004.
- LYNN, M. A.; MCMASTER, W. R. *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 3, p. 103-105, 2008.
- MACEDO, A. M.; PIMENTA, J. R.; DE AGUIAR, R. S.; MELO, A. I. R.; CHIARI, E.; ZINGALIS, B.; PENA, S. D.; OLIVEIRA, R. P. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 96, n. 3, p. 407-13, 2001.
- MAIA DA SILVA, F.; NAIFF, R. D.; MARCILI, A.; GORDO, M.; D’AFFONSECA NETO, J. A.; NAIFF, M. F.; FRANCO, A. M. R.; CAMPANER, M.; VALENTE, V.; VALENTE, A. S.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G.; MILES, M. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (*Callitrichidae*), a critically endangered primate of the Amazon rainforest. **Acta Trop.**, v. 107, p. 168–173, 2008.
- MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; ANEZ, N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, n. 5, p. 549-61, 2004b.
- MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A. C.; COURA, J. R.; ANEZ, N.; SHAW, J. J.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and

sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 129, p. 549–561, 2004a.

MARCILI, A.; COSTA, A. P. da; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; LIMA, J. T. R. de; MINERVINO, A. H. H.; MELO, A. T. L.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; GENNARI, S. M. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in mato grosso, brazil. **J Parasit.**, v. 99, n. 6, p. 1071-1076, 2013.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; DA SILVA, F. M.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V. L.; TEIXEIRA, M. M. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641-655, 2009a.

MARCILI, A.; SPERANÇA, M. A.; DA COSTA, A. P.; MADEIRA, M. F.; SOARES, H. S.; SANCHES, C. O.; ACOSTA, I. C.; GIROTTO, A.; MINERVINO, A. H.; HORTA, M. C.; SHAW, J. J.; GENNARI, S. M. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and GAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) infantum chagasi in South America. **Infect Genet Evol.**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. C.; SOUZA, A. I.; DA ROSA, J. A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIlc: new hosts, association with terrestrial ecotopes and spatial clustering. **Infect Genet Evol.**, v. 9, p. 1265-1274, 2009b.

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C.; DA SILVA, F. M.; PINTO, A. Y.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **Int J Parasitol.**, v. 39, p. 615-623, 2009c.

MASLOV, D. A.; LUKES, J.; JIRKU, M.; SIMPSON, L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Mol. Biochem Parasitol.**, v. 75, n. 2, p. 197-205, 1996.

MASLOV, D. A.; YURCHENKO, V. Y.; JIRKÚ, M.; LUKES, J. Two new species of trypanosomatid isolated from Heteroptera in Costa Rica. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 57, p. 177-88, 2010.

MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitol.**, v. 29, p. 43-52, 2013.

MAURICIO I. L.; GAUNT, M. W.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p. 565–576, 2007.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, p. 188-189, 2000.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminants feedstuff evaluation morphology. **Anim Feed Sci Technol.**, v. 79, p. 321-330, 1999.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F.; SECUNDINO, N. F.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, p. 255-259, 2002.

MICHELS, P. A.; POLISZCZAK, A.; OSINGA, K. A.; MISSET, O.; VAN BEEUMEN, J.; WIERENGA, R. K.; BORST, P.; OPPERDOES, F. R. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J.**, v. 5, n. 5, p. 1049-56, 1986.

MOTAZEDIAN, M. H.; NOAMANPOOR, B.; ARDEHALI, S. Characterization of *Leishmania* parasites isolated from provinces of the Islamic Republic of Iran. *East. Mediterr. Health J.*, v. 8, p. 338-344, 2002.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B.; DEERFIELD, D. W. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW. NEWS**, v. 4, n. 2, 1997. Disponível em: <<http://www.citeulike.org/user/fhsantanna/article/3198041>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

QUISPE-TINTAYA, K. W.; LAURENT, T.; DECUYPERE, S. H. M.; BANULS, A. L.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; CANAVATE, C.; CAMPINO, L.; DUJARDIN, J. C. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. **J Infect Dis.**, v. 192, p. 685-692, 2005.

ROBERTS, S. C.; WILSON, M. E.; DONELSON, J. E. Developmentally regulated expression of a novel 59-kDa product of the major surface protease (Msp or gp63) gene family of *Leishmania chagasi*. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 15, p. 8884–8892, 1995.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, p. 215–224, 2006.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, n. 1 p. 1-17, 2010.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

STAMATAKIS, A. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688–2690, 2006.

STEVENS, J. R.; GIBSON, W. C., The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**, v. 15, n. 11, p. 432-7, 1999a.

Swofford, D. L. **PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods)**. Version 4.0. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.

Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

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, p. 157–163, 1991.

Viola, L. B.; Almeida, R. S.; Ferreira, R. C.; Campaner, M.; Takata, C. S.; Rodrigues, A. C.; Paiva, F.; Camargo, E. P.; Teixeira, M. M. G. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (Caiman yacare) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, v. 136, p. 55-65, 3009b.

Viola, L. B.; Campaner, M.; Takata, C. S. A.; Ferreira, R. C.; Rodrigues, A. C.; Freitas, R. A.; Duarte, M. R.; Grego, K. F.; Barret, T. V.; Camargo, E. P.; Teixeira, M. M. G. Phylogeny of snake trypanosome inferred by ssu rdna sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 595-605, 2008.

Westenberger, S. J.; Sturm, N. R.; Campbell, D. A. Trypanosoma cruzi 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. **Int. J. Parasitology**, v. 36, n. 3, p. 337-46, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

3 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos foram analisados individualmente e concatenados, chegando à conclusão que não houve variação intraespecífica e biogeográfica com os genes utilizados nas amostras, se tratando de genes bem conservados; porém este trabalho corrobora com os próximos estudos que devem ser feitos, testando genes menos conservados e também a utilização da técnica de microssatélite.

As sequencias obtidas apresentaram aproximadamente 12.000 pb e idênticas entre si e possuem similaridade de 99% com a sequência de *L. donovani* depositada no GenBank (HQ908267). Os genes citocromo B, catepsina, quitinase, gGAPDH, hsp70 e ITS1 não apresentaram variabilidade para os isolados analisados de *L. infantum chagasi*, mas corrobora os dados obtidos com os genes de SSU rDNA e gGAPDH na segregação dos isolados sul-americanos dos isolados de *L. infantum* europeias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AMPUERO, J.; RIOS, A. P.; CARRANZA-TAMAYO, C. O.; ROMERO, G. A. S. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 992-997, 2009.
- ANDRADE, C. R.; NASCIMENTO, A. E.; MOURA, P. M.; ANDRADE, P. P. *Leishmania donovani donovani* and *Leishmania donovani chagasi* as antigens in a direct agglutination assay for the diagnosis of kala-azar. **Braz J Med Biol Res.**, v. 22, n. 5, p. 611–615, 1989.
- ARNASON, U. K.; BODIN, A.; GULLBERG, C.; LEDJE, A.; MOUCHATY, S. A molecular view of pinniped relationships with particular emphasis on the true seals. **J. Mol. Evol.**, v. 40, p. 78–85, 1995.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 1269–1281, 2000.
- BALANÍA-FOUCE, R.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; FERNÁNDEZ-PRADA, C.; GARCÍA-ESTRADA, C.; REGUERA, R. M. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. **Int J Parasitol Drugs and Drug Resist.**, v. 4, n. 3, p. 326–337, 2014.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. **Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans.** **Adv Parasitol.**, v. 64, p. 1–109, 2007.
- BARTHOLOMEU, D. C.; PAIVA, R. M. C.; MENDES, T. A. O.; DA ROCHA, W. D.; TEIXEIRA, S. M. R. Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 12, p. e1004399, 2014. doi: 10.1371/journal.ppat.1004399.
- BISUGO, M. C.; ARAÚJO, M. F. L.; TANIGUCHI, H. H.; ACUNHA, E.; SANTOS, A. A.; PESSOTO-JUNIOR, M.; KANETO, C. N.; VO CAMARGO, C.; POLIZEL, M. A.; VIGILATO, M. A. N.; NEGREIROS, C. M. S.; OKAGIMA, M.; GONÇALVES, N. M.; LUNDSTEDT, L. P.; ANDREDE, A. M.; LIMA, V. M. F.; TOLEZANO, J. E. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007.
- BULAT, S. A.; MOKROUSOV, I. V.; PODLIPAEV, S. A. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed OCR)

technique and cross dot blot hybridization of PCR products. **Europ J Protozool**, v. 35, p. 319-326, 1999.

BUSSE, I.; PREISFELD, A. Application of spectral analysis to examine phylogenetic signal among euglenid SSU rDNA data sets (Euglenozoa). **Org Divers Evol**, v. 3, p. 1–12, 2003.

BUSSE, I.; PREISFELD, A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. **J Mol Evol.**, v. 55, n. 6, p. 757-767, 2002.

CABRERA, M. A. A. **Ciclo enzoótico da transmissão da Leishmania (Leishmania) chagasi CUNHA & CHAGAS, 1937 no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras.** 1999. 90 p. Tese (Magister Scientiae) - Escola de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.

CAMARGO, E. P. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Adv Parasitol.**, v. 42, p. 29-112, 1998.

CAO, Y.; ADACHI, J.; JANKE, A.; PAABO, S.; HASEGAWA, M. Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene. **J Mol Evol.**, v. 39, p. 519-527, 1994.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, p. 342-345, 2010.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of Trypanosoma cruzi: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Curr. Pharm. Design**, v. 7, p. 1143-1156, 2001.

CUERVO, P.; DE JESUS, J. B.; SABOIA-VAHIA, L.; MENDONCA-LIMA, L.; DOMONT, G. B.; CUPOLILLO, E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of Leishmania (Viannia) braziliensis promastigotes. **J Proteomics**, v. 73, p. 79– 92, 2009.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. **Nova espécie de protozoário do gênero Leishmania patogênico para o homem.** Leishmania chagasi n.sp. Nota prévia. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9,

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol.**, v. 72, p. 132–141, 2002.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR, H. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 4, 2000.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Vet Parasitol.**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev Soc Bras Med trop.**, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DAVILA, A. M.; MOMEN, H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within Leishmania. **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 94, p. 651-654, 2000.

DE LIMA, M. N.; DIAS, C. P.; TORRES, J. P.; DORNELLES, A.; GARCIA, V. A.; SCALCO, F. S.; GUIMARÃES, M. R.; PETRY, R. C.; BROMBERG, E.; CONSTANTINO, L.; BUDNI, P.; DAL-PIZZOL, F.; SCHRÖDER, N. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. **Neurobiol. Aging**, v. 29, n. 7, p. 1052-1059, 2008.

DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Infecção natural do Phlebotomus longipalpis por leishmonas, provavelmente de Leishmania donovani, em foco de calazar, no Ceará. **Hospital**, n. 45, p. 697-702, 1954.

DEGLI, E. M.; CHOUAIA, B.; COMANDATORE, F.; CROTTI, E.; SASSERA, D. P.; LIEVENS, M.-J.; DAFFONCHIO, Daniele.; BANDI, Claudio. Evolution of mitochondria reconstructed from the energy metabolism of living bacteria. **PLOS One**, v. 9, p. 1-22, 2014.

DEGLI, E. M.; DE VRIES, S.; CRIMI, M.; GHELLI, A.; PATARNELLO, T.; MEYER, Axel. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. **Biochim Biophys Acta**, v. 1143, p. 243-271, 1993.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIETRICH, W. F.; LANDER, E. S.; SMITH, J. S.; MOSER, A. R.; GOULD, K. A.; LUONGO, C.; BORENSTEIN, N.; DOVE, W. Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. **Cell**, v. 75, p. 631-639, 1993.

DORES-SILVA, P. R.; BARBOSA, L. R. S.; RAMOS, C. H. I.; BORGES, J. C. Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization. **PLOS One**, v. 10, p. 1-24, 2015.

FARIA, A. R.; COSTA, M. M.; GIUSTA, M. S.; GRIMALDI JR, G.; PENIDO, M. L.; GAZZINELLI R.T.; ANDRADE, H. M. High-Throughput Analysis of Synthetic Peptides

for the Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **Plos Negl Trop Dis.**, v. 5, n. 9, p. 1-9, 2011.

FERREIRA, E. P. B.; DUSI, A. N.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Rhizosphere bacterial communities of potato cultivars evaluated through PCR-DGGE profiles. **Pesq Agropec Bras.**, v. 43, p. 605-612, 2008.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C. P. Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. by co-inoculation *Paenibacillus* x *Rhizobium tropici*). **Appl Soil Ecol.**, v. 40, n. 182-188, 2008.

FONTES, D.; AZEVEDO, C. Leishmaniose canina. São Paulo. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v. 12, n. 4, p. 145-149, 2003. Disponível em: <www.rbpv.ufrrj.br/busca_volume.php?exemplar=27&volume=12>. Acesso: 22 de agosto 2011. Acesso em: 22 ago. 2011.

GRIMALDI JR., G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 645-661, 1991.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rbepid/v7n3/11.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

HAJJARAN, Homa; MOHEBALI, Mehdi; MAMISHI, Setareh; VASIGHEH, Farzaneh; OSHAGHI, Mohammad Ali; NADDAF, Saied Reza; TEIMOURI, Aref; EDRISSIAN, Gholam Hossein; ZAREI, Z. Molecular identification and polymorphism determination of cutaneous and visceral leishmaniasis agents isolated from human and animal Hosts in Iran. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-7, 2013. doi.org/10.1155/2013/789326.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol Phylogenet Evol**, v. 44, p. 15–25, 2007.

HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J.; GIBSON, W. C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 1393–1404, 2004.

HEITZ, T.; SEGOND, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; PRASAD, V.; BRUNNER, F.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis-related (PR) protein: a new plant chitinase/lysozyme. **Mol. Gen. Genet.**, v. 245, p. 246–254, 1994

HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals**: a zoological monograph. Oxford: Blackwell, 1972.

HOLLAR, L.; MASLOV, D. A. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 89, p. 295-299, 1997.

HUGHES, L.; PIONTKIVSKA, H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. **Mol Biol Evol.**, v. 20, p. 644-652, 2003.

IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **J. Mol. Evol.**, v. 32, p. 128-144, 1991.

KARLIN, S.; BROCCHERI, L. Heat shock protein 70 family: Multiple sequence comparisons, function, and evolution. **J Molecular Evolution**, v. 47, p. 565-577, 1998.

KILLICK-KENDRICK, R.; LAINSON, R.; RIOUX, J.A.; SAFJANOVA, V. M. The taxonomy of Leishmania-like parasites of reptiles. In: COLLOQUE INTERNATIONAL *LEISHMANIA*, TAXONOMIE ET PHYLOGENESE: APPLICATIONS ECO-EPIDEMIOLOGIQUES, 1984. Montpellier, Montpellie: IMEE 1984. p. 143-148.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 6196-6200, 1989.

KUHLS, K.; MAURICIO, I. L.; PRATLONG, F.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes Infect**, v. 7, p. 1224-1234, 2005.

KURU, T.; JIRATA, D.; GENETU, A.; BARR, S.; MENGISTU, Y.; ASEFFA, A.; GEDAMU, L. *Leishmania aethiopica*: identification and characterization of cathepsin L-like cysteine protease genes. **Exp Parasitol.**, v. 115, p. 283-90, 2007.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Ecologia das leishmanioses: *Lutzomyia longipalpis* e a eco-epidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Ed.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003-2005. p. 311-336.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1978. p. 1-116.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LOVEJOY, N. R.; DE ARAUJO, M. L. G. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Mol Ecol.**, v. 9, n. 3, p. 259-268, 2000.

MACMORRIS-ADIX, M. Leishmaniasis: A review of the disease and the debate over the origin and dispersal of the causative parasite *Leishmania*. *Macalester Reviews in Biogeography*, v. 1, Article 2, 2008. Disponível em: <<http://digitalcommons.macalester.edu/biogeography/vol1/iss1/2>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

MAIA, C.; DIONÍSIO, L.; AFONSO, M. O.; NETO, L.; CRISTÓVÃO, J. M.; CAMPINO, L. *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 481–487, 2013.

MAIA, C.; GOMES, J.; CRISTÓVÃO, J.; NUNES, M.; MARTINS, A.; REBÊLO, E. Feline leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region. **Portugal Vet. Parasitol.**, v. 174, n. 3-4, p. 336–40, 2010.

MARCILI, A.; COSTA, A. P. da; SOARES, H. S.; ACOSTA, I. C. L.; LIMA, J. T. R. de; MINERVINO, A. H. H.; MELO, A. T. L.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; GENNARI, S. M. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in mato grosso, brazil. **J Parasit.**, v. 99, n. 6, p. 1071-1076, 2013.

MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JUNQUEIRA, A. C.; VELUDO, H. H.; DA SILVA, F. M.; CAMPANER, M.; PAIVA, F.; NUNES, V. L.; TEIXEIRA, M. M. new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, p. 641-655, 2009a.

MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J. S.; JUNQUEIRA, A. C.; SOUZA, A. I.; DA ROSA, J. A.; CAMPANER, M.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIlc: new hosts, association with terrestrial ecotopes and spatial clustering. **Infect Genet Evol.**, v. 9, p. 1265-1274, 2009b.

MARCILI, A.; SPERANÇA, M. A.; DA COSTA, A. P.; MADEIRA, M. F.; SOARES, H. S.; SANCHES, C. O.; ACOSTA, I. C.; GIROTTO, A.; MINERVINO, A. H.; HORTA, M. C.; SHAW, J. J.; GENNARI, S. M. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and GAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) infantum chagasi in South America. **Infect Genet Evol.**, v. 25, p. 44-51, 2014.

MARCILI, A.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; JUNQUEIRA, A. C.; DA SILVA, F. M.; PINTO, A. Y.; NAIFF, R. D.; CAMPANER, M.; COURA, J. R.; CAMARGO, E. P.; MILES, M. A.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **Int J Parasitol.**, v. 39, p. 615-623, 2009c.

MASLOV, D. A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitol**, v. 29, p. 43-52, 2013.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, n. 16, p. 188-189, 2000.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminants feedstuff evaluation morphology. **Anim Feed Sci Technol.**, v. 79, p. 321-330, 1999.

MERZLYAK, E.; YURCHENKO, V.; KOLESNIKOV, A. A.; ALEXANDROV, K.; PODLIPAEV, S.; MASLOV, D. A. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 161-169, 2001.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária**. Interpretação e diagnóstico. São Paulo: Roca, 1995.

MEYER-FERNANDES, J. R.; DUTRA, P. M. L.; RODRIGUES, C. O.; SAADNEHME, J.; LOPES, A. H. C. S. Mg-dependent ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. **Arch Biochem Biophys.**, v. 341, n. 1, p. 40-46, 1997.

MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; PIMENTA, P. F.; SECUNDINO, N. F.; DIAS, E. S. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, p. 255-259, 2002.

MOORE, W. S. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear gene trees. **Evolution**, v. 49, p. 718-726, 1995.

NAYLOR, G. J. P.; BROWN, W. M. Structural biology and phylogenetic estimation. **Nature**, v. 388, p. 527-528, 1997.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine du Kala azar. **CRL Acad Sci.**, v. 146, p. 789, 1908.

PERRAKIS, A.; TEWS, I.; DAUTER, Z.; OPPENHEIM, A. B.; CHET, I.; WILSON, K. S.; VORGIAS, C. E. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. **Structure**, v. 2, p. 1169-1180, 1994.

PIONTKIVSKA, H.; HUGHES, A. L. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: paraphyly of the genus *Trypanosoma*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 144, p. 94-99, 2005.

- PODLIPAEV, S. A.; FROLOV, A. O.; KOLESNIKOV, A. A. *Proteomonas inconstans* n.gen. n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) - a parasite of the bug *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae). **Parasitologija**, St. Petersburg, v. 24, p. 339-345, 1990.
- QUISPE-TINTAYA, K. W.; LAURENT, T.; DECUYPERE, S.; HIDE, M.; BANULS, A. L.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; CANAVATE, C.; CAMPINO, L.; DUJARDIN, J. C. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. **J Infect Dis.**, v. 192, p. 685-692, 2005.
- RAFATI, S.; GHOLAMI, E.; HASSANI, N.; GHAEMIMANESH, F.; TASLIMI, Y.; TAHERI, T.; SOONG, L. *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. **Vaccine**, v. 22, n. 25, p. 4159–4169, 2007.
- RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, p. 215–224, 2006.
- ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 209, p. 1-7, 2002.
- ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America. A systematic review. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2010.
- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, n. 1, p. 1-21. 2002.
- SANTOS, F. N.; BORJA-CABRERA, G. P.; MIYASHIRO, L. M.; GRECHI, J.; REIS, A. B.; MOREIRA, M. A. B.; MORTINS FILHO, O. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MENZ, I.; PESSOA, L. M.; GONÇALVES, P. R.; PALATINIK, M.; PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 6176–6190, 2007.
- SAVANI, E. S. M.; DE OLIVEIRA CAMARGO, M. C.; DE CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; DOS SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; 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 (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 120, n. 3, p. 229-233, 2004.
- SCHÖNIAN, G.; AKUFFO, H.; LEWIN, S.; MAASHO, K.; NYLÉN, S.; PRATLONG, F.; EISENBERGER, C. L.; SCHNUR, L. F.; PRESBER, W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. **Mol Bioch Parasitol.**, v. 106, p. 239-248, 2000.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. **Parasitology**, v. 138, p. 405-145, 2011.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBER, W.; JAFFE, C. L. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 47, p. 349-358, 2003.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Arch Insect Biochem Physiol.**, v. 47, p. 119–125, 2001.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CRESCENTE, J. A.; DE SOUZA, A. A. A.; CAMPOS, M. B.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human Leishmania (L.) infantum chagasi infection in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 104, n. 8, p. 529-535, 2010.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; DE SOUZA, A. A.; CAMPOS, M. B.; CARNEIRO, L. A.; REGO LIMA, L. V.; SANTOS RAMOS, P. K.; DE CASTRO GOMES, C. M.; LAURENTI, M. D.; PEREIRA CORBETT, C. E. Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human Leishmania (L.) infantum chagasi infection in Amazonian Brazil. **Parasitol Res.**, v. 106, n. 2, p. 377-386, 2010.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: Genomic organization,transcription, replication, and evolution. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 363-382, 1987.

SOGIN, M. L.; ELWOOD, H. J.; GUNDERSON, J. H. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 1383-1387, 1986.

STUART, K.; FEAGIN, J. E. Mitochondria1 DNA of kinetoplastids. **Int Rev Cytol.**, v. 141, p. 65-88, 1992.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELOC, M. N.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TELLAM, R. L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, n. 2, p. 87-101, 1999.

VERMELHO, A. B.; SIMONE S. G.; LEVY, C. M. D.; SANTOS, A. L. S.; DE MELO, A. C. N.; SILVA JR, F. P.; BOM, E. P.; BRANQUINHA, M. H. Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development. **Curr. Enzyme Inhibition.**, v. 3, p. 19-46, 2007.

VICKERMAN, K.; PRESTON, T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976. p. 35-130.

VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; FERREIRA, R. C.; RODRIGUES, A. C.; FREITAS, R. A.; DUARTE, R. M.; GREGO, K. F.; BARRETT, T. V.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of snakettrypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible trans-mission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. **Parasitology**, v. 135, p. 595–605, 2008.

YAN, J.; CHENG, Q.; NARASHIMHAN, S.; LI, C. B.; AKSOY, S. Cloning and functional expression of a fat body-specific chitinase cDNA from the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 32, n. 9, p. 979-989, 2008.

YANG, H.; BOERSMA, J. G.; YOU, M.; BUIRCHELL, B. J.; SWEETINGHAM, M. W. Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). **Mol Breed**, v. 14, p. 145-151, 2004.

WALLACE, F. G.; CAMARGO, E. P.; MCGHEE, R. B.; ROITMAN, I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **J Protozool.**, v. 30, p. 308-313, 1983.