LILIAN DE FARIAS

**Utilização do alvo *hsp70* em técnicas de biologia molecular para
diferenciação de subgêneros de *Leishmania spp***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientador: Dr. José Angelo Lauletta
Lindoso

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Farias, Lilian de

Utilização do alvo *hsp70* em técnicas de biologia molecular para diferenciação de subgêneros de *Leishmania ssp* / Lilian de Farias. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso.

Descritores: 1.Reação em cadeia da polimerase 2.Proteínas de choque térmico
HSP70 3.Leishmania 4.Leishmaniose tegumentar difusa

USP/FM/DBD-030/15

Aos meus eternos e queridos pais

**“Eu não estou longe, apenas estou
do outro lado do Caminho...”**

Às minhas irmãs pelo apoio e incentivo

Ao Mario pela paciência e companherismo

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Angelo Laulleta Lindoso, pelos ensinamentos científicos e pessoais, pela amizade dentro e fora do laboratório, por aceitar orientar este estudo e por em todos os momentos me incentivar a dar o passo seguinte.

Ao Prof. Paulo César Cotrim, pela oportunidade e por toda ajuda e sugestões prestadas ao longo desses anos.

À Profa. Hiro Goto pela disponibilização integral do laboratório e pela harmoniosa convivência.

À Profa. Lucile Maria Floeter-Winter e ao Ms. Ricardo Andrade Zampieri, por me receberem tão bem no laboratório e por sempre estarem disponíveis a dividir os seus conhecimentos com uma humildade admirável.

Ao departamento de documentação do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, pela cooperação nas reservas e consultas de prontuários médicos de pacientes.

À todos integrantes do Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – IMT/SP, Mussia, Marcela, Willian, Thaynan, Dra. Kelly, Dra. Juliana, Edite, Mariane, Dr. Eduardo, Dra. Luiza, Dra. Flaviane, Dr. Adriano, Christiane, Beatriz, Edna, Beth, Dra. Sandra, Simone, Renata, Dayane, Débora, Ive, Egon, Eunice, Dra. Carmen, Dra. Guita e tantos outros, por me ensinarem que além de muito trabalho, existe uma grande amizade.

À todos vocês, meu muito obrigado!

“Tudo para glória de Deus e o bem estar da humanidade”

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Epidemiologia	01
1.2 Parasito	02
1.3 Vetores	03
1.4 Reservatórios.....	04
1.5 Aspectos Biológicos	04
1.6 Aspectos específicos das espécies	05
1.7 Tratamento	07
1.8 Diagnóstico	07
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral	12
3.2 Objetivos Específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Materiais	12
4.1.1 Amostras de cultura de promastigotas de cepas referência	13
4.1.2 Amostras de cultura de cepas referência e de outros patógenos..	14
4.1.3 Amostras de promastigotas obtidas a partir de espécimes clínicas	14
4.1.4 Amostra de DNA de controles negativos	14
4.1.5 Considerações éticas	14
4.2 Métodos	15
4.2.1 Cultura de promastigotas	15
4.2.2 Extração de DNA	15
4.2.3 Verificação da qualidade das amostras de DNA obtidas	16
4.2.4 Construção de iniciadores direcionados ao gene alvo <i>hsp70</i>	16

4.2.5	Protocolo de qPCR	18
4.2.6	Protocolo de HRM	19
4.2.7	Protocolo de PCR multiplex	19
4.2.7.1	Padronização do ensaio 1 de PCR com iniciadores FW1 e RW2	19
4.2.7.2	Padronização do ensaio 2 de PCR com iniciadores FW1 e RW3	20
4.2.7.3	Padronização do ensaio 3 de PCR multiplex com iniciadores FW1, RW2 e RW3	21
4.2.8	Eletroforese	21
4.2.9	Controle dos ensaios	22
4.2.10	Avaliação da especificidade dos ensaios	22
4.2.11	Avaliação da sensibilidade dos ensaios	22
4.2.12	Avaliação da sensibilidade dos ensaios na presença de diferentes concentrações de DNA de <i>Leishmania</i> em DNA humano	22
4.2.13	Reação de Sequenciamento	23
5.	RESULTADOS	24
5.1	Local de associação dos iniciadores no gene alvo <i>hsp70</i>	24
5.2	Detecção e diferenciação de subgêneros de <i>Leishmania</i> pelo ensaio de qPCR	30
5.2.1	Padronização do ensaio de qPCR com amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos.....	30
5.2.2	Ensaio de qPCR com amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas	33
5.3	Detecção e diferenciação de subgêneros de <i>Leishmania</i> pelo ensaio de HRM	36
5.3.1	Padronização do ensaio de HRM com amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos	36
5.3.2	Ensaio de HRM com amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas	38
5.3.3	Avaliação da sensibilidade do ensaio HRM	39

5.3.4	Avaliação da sensibilidade do ensaio HRM na presença de diferentes concentrações de DNA de <i>Leishmania</i> em amostras de DNA humano	40
5.4	Detecção e diferenciação de subgêneros de <i>Leishmania</i> pelo ensaio de PCR multiplex	42
5.4.1	Padronização do ensaio 1 de PCR multiplex com iniciadores FW1 e RW2 com amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos	42
5.4.2	Padronização do ensaio 2 de PCR multiplex com iniciadores FW1 e RW3 com amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos	44
5.4.3	Padronização do ensaio 3 de PCR multiplex com iniciadores FW1, RW2 e RW3 com amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos	45
5.4.4	Sequenciamento dos fragmentos do ensaio de PCR multiplex	46
5.4.5	Ensaio de PCR multiplex com iniciadores FW1, RW2 e RW3 em amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas ...	46
5.4.6	Avaliação da sensibilidade do ensaio de PCR multiplex	48
5.4.7	Avaliação da sensibilidade do ensaio de PCR multiplex na presença de diferentes concentrações de DNA de <i>Leishmania</i> em amostras de DNA humano	48
5.5	Avaliação comparativa dos três ensaios para a detecção e Identificação do subgênero <i>Leishmania</i>	49
6.	DISCUSSÃO	50
7.	CONCLUSÃO	57
8.	ANEXO	58
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de incidência de LT no Brasil.....	02
Figura 2	Alinhamento do alvo <i>hsp70</i> de <i>Leishmania</i> com os iniciadores FE1 e RE2 construídos para o ensaio qPCR	25
Figura 3	Alinhamento do alvo <i>hsp70</i> de <i>Leishmania</i> com os iniciadores FR1 e RR2 construídos para o ensaio HRM	27
Figura 4	Alinhamento do alvo <i>hsp70</i> <i>Leishmania</i> com os iniciadores FW1, RW2 e RW3 construídos para o ensaio PCR multiplex	29
Figura 5	Curva padrão para o ensaio de qPCR com amostras de promastigotas de cepas de referência, relacionando a concentração da amostra com o ciclo limiar da reação	30
Figura 6	Gráfico da curva de amplificação da qPCR utilizando os iniciadores FE1 e RE2 em amostras de cepas referência	31
Figura 7	Gráfico da curva de dissociação da qPCR utilizando os iniciadores FE1 e RE2 em amostras de cepas referência	32
Figura 8	Gráfico da curva de amplificação da qPCR utilizando os iniciadores FE1e RE2 em amostras de cepas referência de <i>Leishmania</i> e amostras de DNA de espécimes clínicas	34
Figura 9	Gráfico HRM utilizando os iniciadores FR1 e RR2 em amostras de <i>Leishmania</i> e outros patógenos	37
Figura 10	Gráfico HRM utilizando os iniciadores FR1 e RR2 em amostras de <i>Leishmania</i> e espécimes clínicas	39
Figura 11	Gráfico HRM de avaliação da sensibilidade	40
Figura 12	Gráfico HRM de avaliação da sensibilidade na presença de diferentes concentrações de DNA de <i>Leishmania</i> em amostras de DNA humano	41
Figura 13	Ensaio 1 da padronização do PCR	43
Figura 14	Ensaio 2 da padronização do PCR	44
Figura 15	Ensaio de padronização do PCR multiplex	45
Figura 16	Ensaio de PCR multiplex em amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas	47
Figura 17	Avaliação da sensibilidade do ensaio PCR multiplex	48

Figura 18	Avaliação da sensibilidade do ensaio PCR multiplex na presença de diferentes concentrações de DNA de <i>Leishmania</i> em amostras de DNA humano	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies de <i>Leishmania</i> e seus respectivos números no <i>GenBank</i> 17
Tabela 2	Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio de qPCR 18
Tabela 3	Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio de HRM 19
Tabela 4	Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio 1 da padronização do ensaio de PCR 20
Tabela 5	Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio 2 da padronização do ensaio de PCR 20
Tabela 6	Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio 3 da padronização do ensaio de PCR multiplex 21
Tabela 7	Dados referentes a média C_t , quantificação e valor T_m das amostras submetidas ao ensaio de qPCR 33
Tabela 8	Dados referente a média de C_t das amostras de promastigotas obtidas a partir de amostras de espécimes clínicas 35
Tabela 9	Dados referente a média T_m e desvio padrão das amostras de promastigotas de cepas referência 37

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor que
>	Maior que
A	Adenina
AD	Aglutinação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
fg	Fentogramas
G	Guanina
g	Giros
HRM	High Resolution Melting
IFI	Imunofluorescência Indireta
kDa	Kilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LT	Leishmaniose tegumentar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
pb	Pares de base
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picogramas

qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa/ Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	Temperatura média de fusão (melting)
μL	Microlitro

RESUMO

Farias, Lilian de. Utilização do alvo *hsp70* em técnicas de biologia molecular para diferenciação de subgêneros de *Leishmania spp* (Dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A leishmaniose tegumentar é uma zoonose que ocorre endemicamente em 88 países, caracterizando-se como um grave problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais. Estima-se que o número de pessoas infectadas por *Leishmania* seja de cerca de 12 milhões e que ocorram entre 700 mil a 1,2 milhões de novos casos anualmente. O Brasil apresenta a maior prevalência de leishmaniose tegumentar na América, sendo que já foram identificadas seis espécies como causadoras de leishmaniose tegumentar: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*. Apesar de termos diferentes espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil e com diferentes formas clínicas, a discriminação das espécies de *Leishmania* responsáveis por determinada lesão ainda é um desafio.

Utilizando as técnicas qPCR, HRM e PCR multiplex, com pares de oligonucleotídeos contruídos e direcionados para o gene alvo *hsp70*, propomos uma alternativa para os ensaios utilizados atualmente para a identificação de *Leishmania* e diferenciação dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* em cultura de promastigota.

A identificação do subgênero *Leishmania* obtida nos nossos resultados em amostras de cepas referência e em amostras de isolados de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, correspondem ao obtido por PCR-RFLP direcionada para o alvo kDNA com a enzima de restrição *HaeIII* realizada num estudo anterior. No entanto, este estudo permitiu a identificação do subgênero em apenas um passo, o que contribui para a redução do tempo, custo e manuseio de amostras. Diante desses resultados, sugere-se a validação da técnica em DNA de amostras de amastigotas de lesões tegumentares de pacientes diagnosticados com esta doença.

Descritores: 1.Reação em cadeia da polimerase 2.Proteínas de choque térmico HSP70 3.Leishmania 4.Leishmaniose tegumentar difusa

ABSTRACT

Farias, Lilian de. Utilização do alvo *hsp70* em técnicas de biologia molecular para diferenciação de subgêneros de *Leishmania spp* (Dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

The cutaneous leishmaniasis is a zoonotic disease that is endemic in 88 countries, characterized as a serious public health problem in tropical and subtropical countries. It is estimated that the number of people infected by *Leishmania* to be about 12 million, occurring between 700 thousand to 1.2 million new cases annually. Brazil has the highest prevalence of cutaneous leishmaniasis in America and six species have been identified as causes of cutaneous leishmaniasis: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*. Although we have different species that cause cutaneous leishmaniasis in Brazil and with different clinical forms, discrimination against *Leishmania* species responsible for certain injury is still a challenge.

Using the techniques qPCR, HRM and multiplex PCR with oligonucleotide engineer to the target gene *hsp70*, propose an alternative to the currently used assays for *Leishmania* identification and *Leishmania* and *Viannia* subgenus differentiation in parasite promastigote culture.

The identification of *Leishmania* subgenus obtained in our results with parasite promastigote culture of reference strains samples and isolates in patients with suspected tegumentary leishmaniasis attended at the Institute of Infectious Diseases Emilio Ribas, corresponded to that obtained by PCR-RFLP directed to the target kDNA with *HaeIII* restriction enzyme carried out in a previous study. However, this review allowed the identification of the subgenus in just one step, contributing to the reduction of time, cost and handling of samples. Given these results, we suggest the validation of this technique in DNA of amastigote samples from tegumentary lesions of patients diagnosed with this disease.

Descriptors: 1.Reação em cadeia da polimerase 2.Heat shock protein HSP70
3.Leishmania 4.Leishmaniose tegumentar difusa

1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças infecciosas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que se manifesta sob duas formas clínicas diferentes: leishmaniose tegumentar (LT) que acomete a pele ou mucosa e leishmaniose visceral (LV) que afeta os órgãos fígado e baço (Utzinger et al. , 2012).

1.1 Epidemiologia

A LT é uma zoonose que ocorre endemicamente em 88 países, sendo que 90% dos casos são relatados no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, caracterizando-se como um grave problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais e uma das endemias prioritárias para Organização Mundial de Saúde. Estima-se que o número de pessoas infectadas por *Leishmania* seja de cerca de 12 milhões e que ocorram entre 700 mil a 1,2 milhões de novos casos anualmente, sendo que há 310 milhões de pessoas vivendo em área de risco de infecção (World Healthy Organization, 2014). No Brasil, a LT está presente nas cinco regiões (Figura 1), com média anual de 30.000 novos casos notificados e atualmente encontra-se em franca expansão territorial (Lindoso e Lindoso, 2009), apresentando três perfis epidemiológicos distintos, relacionados à transmissão: a) Silvestre, em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); b) Ocupacional ou lazer, em que a transmissão está associada a exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo; (antropozoonose); c) Rural ou periurbana, em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose)(Brasil, 2007).

Figura 1: Mapa de incidência de LT no Brasil. Taxa de incidência por 10.000 durante um período de 10 anos (2001-2010). (Karagiannis-Voules et al. , 2013)

1.2 Parasito

A doença é causada por protozoários flagelados, pertencentes a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, o qual se divide em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Esta divisão baseia-se no desenvolvimento do parasito no tubo digestório do vetor, que pode ser na região peripilária ou suprapilária. As espécies do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se no tubo digestório anterior e médio, na região suprapilária, já as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* desenvolvem-se no tubo digestório médio e posterior, na região peripilária (Lainson e Shaw, 1987). No subgênero *Leishmania* estão classificadas as espécies que causam a forma visceral ou tegumentar da doença e podem ser encontradas na Ásia, África, Europa e América. Já no subgênero *Viannia* estão classificadas as espécies que causam somente a forma tegumentar da doença e são encontradas somente nas Américas. No Brasil, já foram identificadas seis espécies de *Leishmania* como agentes etiológicos da LT (Basano, 2004; Silva, 2013): *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*,

Leishmania (Viannia) guyanensis, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*.

A *Leishmania* apresenta-se sob duas formas distintas morfológicamente: amastigota que é observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e, promastigota que é encontrada no tubo digestório do inseto vetor. A forma amastigota é intracelular, multiplica-se em macrófagos do hospedeiro vertebrado e apresenta dimensões de 2 a 6 µm de comprimento por 1,5 a 3 µm de largura. Possui formato oval, flagelo curto e interiorizado, núcleo arredondado e excêntrico e cinetoplasto anterior ao núcleo. Já a forma promastigota multiplica-se no tubo digestório do hospedeiro invertebrado e apresenta dimensões de 14 a 20 µm de comprimento por 1,5 a 4 µm de largura, formato alongado, flagelo longo na extremidade anterior, núcleo no terço médio e cinetoplasto na posição anterior ao núcleo (Grimaldi e Tesh, 1993; Rey, 2002). Apresentam suas informações gênicas em dois compartimentos distintos. No núcleo, há o DNA genômico que contém as informações responsáveis pela manutenção básica do organismo e no cinetoplasto há o kDNA, composto por maxi-círculos e mini-círculos, que guardam e regulam parte das informações necessárias para o funcionamento mitocondrial (Cruz, 2011). O cariótipo molecular de *Leishmania* foi determinado como apresentando 36 cromossomos que variam de tamanho entre 0,35 MB até 3,0 MB (Wincker et al. , 1996), sendo que o tamanho estimado do genoma da *Leishmania* é da ordem de 32,8 MB, com pouca variação entre as espécies já estudadas, e peso molecular de 83,15fg (Jara et al. , 2013), os cromossomos não apresentam o alto grau de compactação observado em outros eucariotos (Cruz, 2011).

1.3 Vetores

Os vetores da *Leishmania* são insetos pequenos medindo de 2 a 3 mm, corcundas, possuem o corpo revestido de cerdas e apresentam coloração clara (Rey, 2002). Das 500 espécies de flebotomíneos conhecidas, apenas 30 foram descritas como vetores de *Leishmania* (Desjeux, 2004). Esses insetos são classificados na ordem *Díptera*, família *Psychodidae* e na sub-família *Phlebotominae* e transmitem ao homem patógenos causadores de leishmanioses, bartonelose (verruga peruana) e febre papatasi (febre dos três

dias), tendo como agentes etiológicos protozoários, bactérias e vírus respectivamente. Apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientes silvestres, rurais e urbanos. No caso específico de vetores de leishmanioses, dois gêneros tem importância médica e veterinária: *Phlebotomus* na Europa, Ásia e África e *Lutzomyia* (Lu) nas Américas (Dias, 2011). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da LT são: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. Migonei* e *Lu. wellcomei* (Brasil, 2007).

1.4 Reservatórios

Os reservatórios, de maneira geral, são mamíferos silvestres e sinantrópicos, embora alguns animais domésticos também aparentam atuar como reservatórios secundários. Em áreas endêmicas para LT nas Américas, dentre as dezenas de espécies de mamíferos silvestres encontradas naturalmente infectadas por alguma espécie de *Leishmania*, predominam roedores, marsupiais, edentados, primatas e carnívoros (Brandao Filho et al. , 2011).

1.5 Aspectos Biológicos

O ciclo de vida de *Leishmania* é heteroxênico, isto é, o parasita se desenvolve no inseto vetor hematófago e no hospedeiro vertebrado. Ao realizar o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, a fêmea do inseto vetor ingere junto com o sangue as formas amastigotas, estas se diferenciam em promastigostas procíclicas e se aderem ao tubo digestório do inseto, evitando a sua expulsão. Quando atingem alta densidade populacional, essas formas migram para as partes anteriores do tubo digestório do inseto, atingindo o aparelho sugador, probóscide, e diferenciam-se em promastigota metacíclica (forma infectante). Ao picar um animal suscetível, esses parasitas são regurgitados no local da picada e inoculados no tecido epitelial do hospedeiro, esses parasitos são, então, fagocitados por macrófagos do hospedeiro vertebrado que se diferenciam em amastigotas multiplicando-se por divisões binárias dentro dos fagolisossomos. A célula parasitada se rompe liberando formas amastigotas que irão infectar outras células. Depois de estabelecida a

infecção, ocorre a disseminação por via linfática e/ou sanguínea, facilitando assim, a infecção de flebótomos em uma nova hematofagia, perpetuando o ciclo (Ashford, 2000; Rey, 2002; Silveira et al. , 2002).

No homem, a manifestação clínica da leishmaniose resulta de um desequilíbrio na relação parasito/hospedeiro, estando intimamente relacionado ao mecanismo de defesa do hospedeiro. Já nos reservatórios, parece haver uma relativa adaptação imunológica, traduzindo-se geralmente em doença autolimitada ou inaparente (Desjeux, 1996).

Dependendo da resposta imune do hospedeiro, da espécie de *Leishmania* e da quantidade do inóculo, a LT pode se manifestar de diferentes formas clínicas: forma cutânea localizada, cutânea difusa, cutânea disseminada ou recidiva cútis (Goto e Lindoso, 2010). A lesão típica é caracterizada pela formação de uma úlcera cutânea, única ou múltiplas, de difícil cicatrização no local da picada pelo flebotomíneo infectado. Após um tempo variável de evolução (6 a 24 meses) pode ocorrer cicatrização espontânea, a qual geralmente se observa uma imunidade duradoura contra a infecção pela mesma espécie. No Brasil, cerca de 3 a 8% dos casos de leishmaniose cutânea podem evoluir para uma forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa (Carvalho et al. , 2006).

1.6 Aspectos específicos das espécies

As diferentes espécies de *Leishmania* que estão presentes no continente americano, apresentam ciclos de transmissão heterogêneos que variam de acordo com a região geográfica, envolvendo diversas ordens de mamíferos como reservatórios, diversos vetores do gênero *Lutzomyia*, além de apresentarem particularidade nas suas manifestações clínicas (Lainson e Shaw, 1987; Brandao Filho et al., 2011) como se segue:

A *L. amazonensis* distribui-se predominantemente em florestas primárias e secundárias da Amazônia, sobretudo em áreas de igapós e várzeas, registros ocasionais têm sido verificados nos estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia, Paraná e Santa Catarina. Roedores e marsupiais são os principais reservatórios primários e há raros relatos de infecção natural em cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis catus*), o *Lu. flaviscutellata* é um dos principais vetores. O parasito já foi descrito em todas as formas clínicas cutânea da doença,

sendo que é a única causadora da leishmaniose cutânea difusa no Brasil. (Grimaldi et al. , 1989; Brandao Filho et al., 2011).

A *L. braziliensis* é a mais importante das espécies associadas a LT, pois apresenta ampla distribuição ocorrendo em diversas regiões das Américas. O parasito tem sido ocasionalmente relatado em alguns mamíferos silvestres e sinantrópicos, entre os quais roedores e marsupiais, também investiga-se a importância de animais domésticos, especialmente cães e equinos como possíveis reservatórios naturais ou, mais apropriadamente, como potenciais fontes de infecção nas áreas endêmicas. Este aspecto talvez seja responsável pela maior prevalência desta espécie em todo o território nacional. Diversas espécies de flebotomíneos já foram indicadas como provável vetor dessa espécie, entre elas: *Lu. pessoai*, *Lu. migonei*, *Ps. wellcomei*. O parasito causa diferentes formas clínicas de LT e é a principal espécie causadora de leishmaniose mucosa na América Latina (Grimaldi et al., 1989; Brandao Filho et al., 2011; Guerra et al. , 2011).

A *L. guyanensis* é uma espécie essencialmente silvestre e tem distribuição geográfica no Brasil restrita ao norte da bacia do rio Amazonas que se estende até as Guianas e Venezuela, causa a leishmaniose cutânea e mais recentemente foi isolada também em casos de leishmaniose mucosa. (Brandao Filho et al., 2011; Guerra et al., 2011).

A *L. lainsoni* tem sido verificada apenas na região Amazônica do Brasil, seu principal reservatório é a paca (*Agouti paca*) e o vetor responsável é *Lu. umbiquitalis*. O parasita causa predominantemente lesões cutâneas simples (Brandao Filho et al., 2011).

A *L. naiffi* apresenta distribuição nos estados do Pará e Amazonas. O tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) é o único reservatório conhecido e os principais vetores são *Lu. paraensis* e *Lu. ayrozai*. O parasita causa pequenas lesões cutâneas simples e ulceradas, que muitas vezes curam espontaneamente (Brandao Filho et al., 2011).

A *L. shawi*, tem distribuição localizada ao sul do rio Amazonas. Infecções naturais têm sido observadas em animais arbóreos. O vetor dessa espécie ainda não foi identificado. O parasito causa geralmente lesões cutâneas simples, mas foram observados casos de múltiplas lesões ulceradas e nodulares (Brandao Filho et al., 2011).

1.7 Tratamento

O tratamento de todas as formas clínicas da LT, independente da espécie de *Leishmania* causadora, baseia-se na escolha entre as três principais drogas disponíveis atualmente: antimonial pentavalente, anfotericina B ou pentamidina (Goto e Lindoso, 2010) e mais recentemente a droga miltefosina tem apresentado ação tanto contra *L. braziliensis* quanto *L. guyanensis* (Chrusciak-Talhari et al. , 2011; Machado et al. , 2011).

1.8 Diagnóstico

Apesar de termos diferentes espécies causadoras de LT no Brasil e com diferentes formas clínicas, o diagnóstico continua sendo baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e exames laboratoriais (Goto e Lindoso, 2010), sendo que, a discriminação das espécies de *Leishmania* responsáveis por determinada lesão ainda é um desafio. Os métodos clássicos para identificação da espécie são baseados no perfil de migração de isoenzimas ou através da identificação por anticorpo monoclonal (Chance et al. , 1974; McMahon-Pratt et al. , 1982). Estes métodos são lentos, dificultosos e que requerem crescimento de parasitos em culturas de promastigotas para a análise da expressão fenotípica (Chance, 1995). Além disso, existe a necessidade de se estabelecer a cultura, uma vez que a maioria dos anticorpos reconhece apenas antígenos presentes em formas promastigotas que não são expressos em amastigotas (Floeter-Winter, 2010).

O diagnóstico direto baseia-se na observação de amastigotas pela citologia em aspirado, esfregaços ou raspado de lesões e apresenta sensibilidade e especificidade variável decorrente do tempo de evolução da lesão, das condições da espécime clínica e da qualificação do técnico responsável pela leitura da lâmina. (Ashford, 2000; Weigle et al. , 2002)

A sensibilidade da cultura varia entre 60% a 70% devido a pele estar mais exposta ao ambiente, o que facilita a contaminação por fungos e bactérias (Silva, 2013) e o tempo de leitura pode ser de até 28 dias, dessa forma, tornando o diagnóstico mais demorado, além de não diferenciar as espécies (Ashford, 2000; Weigle et al., 2002).

O diagnóstico imunológico baseia-se na detecção de anticorpos contra *Leishmania* e na resposta celular do hospedeiro contra o parasito. A detecção

de anticorpos *anti-Leishmania* pode ser realizada por Imunofluorescência Indireta (IFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Aglutinação Direta (AD) (Rey, 2002). Estes ensaios apresentam baixa positividade, em torno de 50%, e também dependem da espécie envolvida, sendo os títulos mais baixos na infecção por *L. guyanensis* (Silva, 2013). A resposta celular contra o parasito baseia-se na reação de hipersensibilidade cutânea tardia, conhecido como Teste de Montenegro e é um valioso recurso diagnóstico nos casos de leishmaniose mucosa, onde os parasitos são escassos ou ausentes. No entanto, o teste se torna apenas positivo em torno de quatro meses após o início da lesão cutânea, não diferencia doença atual de pregressa e nem distingue doença de infecção, além de ser negativo nas formas de leishmaniose cutânea difusa e em pacientes imunossuprimidos (Furtado, 1994; Gontijo e de Carvalho, 2003).

Na busca por um método mais rápido, específico e sensível, o diagnóstico molecular começou a ser utilizado como uma ferramenta que pudesse ser empregada na rotina laboratorial diagnóstica. Apesar de diferentes técnicas moleculares terem sido avaliadas para o diagnóstico de LT, a PCR constitui a principal técnica molecular utilizada, por apresentar vantagens como a rapidez, sensibilidade e elevada especificidade, quando comparada as técnicas convencionais baseadas em pesquisa direta e cultura (Belli et al. , 1998; Singh, 2006; Reithinger e Dujardin, 2007; Satow et al. , 2013).

Diversas sequências alvos e diferentes protocolos de PCR foram descritos para a detecção de DNA de *Leishmania*. Os alvos de amplificação utilizados mais frequente são: o DNA mini-circulo do cinetoplasto (kDNA) (Lopez et al. , 1993; Mary et al. , 2004), o RNA subunidade ribossômica (SSUrRNA) (Uliana et al. , 1991; Uliana et al. , 1994), gene da desidrogenase de glicose-6-fosfato (*g6pd*) (Castilho et al. , 2003) e o gene *hsp70* (da Silva et al. , 2010; Fraga et al. , 2010; Montalvo et al. , 2010).

O alvo kDNA é um dos mais empregados para o diagnóstico molecular da leishmaniose no Brasil, possui alta sensibilidade na detecção de *Leishmania*, devido ao seu elevado número de cópias (da Silva et al., 2010), porém não é o mais indicado para a diferenciação de todas as espécies (Volpini et al. , 2004; Cruz et al. , 2013) descreveram um ensaio de PCR-RFLP baseado neste alvo com a utilização da enzima *HaeIII*, para diferenciação das

espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Schonian et al. , 2003) também realizaram PCR-RFLP com a enzima *HaeIII*, porém tendo como alvo o ITS-1 e obteve a diferenciação das espécies de *Leishmania* clinicamente relevantes. No entanto, os padrões de PCR-RFLP do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*) e complexos *L. braziliensis*, *L. guyanensis* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Viannia) peruviana*) são quase idênticos, e diante disto (Schonian et al. , 2011) propuseram o sequenciamento do produto de PCR para a diferenciação de espécies.

Uliana et al., 1991 construiu iniciadores direcionadas ao alvo SSUrDNA, que combinados com digestão enzimática com a enzima *PvuII* e hidridização por *Southern Blot* possibilitou a diferenciação do gênero de *Leishmania*, já Castilho et al., 2003 e 2008 descreveram sondas direcionadas ao gene alvo *g6pd* que codifica a Glicose-6-fosfato-desidrogenase, uma enzima que atua na via das pentoses (PPP), o que possibilita a diferenciação do subgênero *Viannia*, e dentre esses, a identificação da espécie *L. braziliensis*. Utilizando-se desses protocolos (de Lima et al. , 2011) detectou DNA de *Leishmania* em amostras parafinadas e diferenciou os subgêneros de *Leishmania* através de clonagem e sequenciamento.

O gene *hsp*, alvo de interesse desse estudo, codifica as proteínas classificadas como choque térmico (*heat-shock*), que desempenham um papel importante no dobramento, montagem, localização intracelular, secreção, regulação, estabilização e degradação de outras proteínas (Young et al. , 2004). Uma delas, a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) tem sequência e função altamente conservadas em procariotos e eucariotos, demonstrando grande importância como molécula chaperona no transporte e dobramento de proteínas. Devido as suas características, o gene *hsp70* tem sido apresentado em ensaios de PCR-RFLP como uma ferramenta universal para a discriminação das espécies de *Leishmania* (Garcia et al. , 2004; Montalvo et al., 2010; Montalvo et al. , 2012; Silva et al. , 2012) descreveu um ensaio com a utilização da enzima *HaeIII* que demonstrou ser útil para a diferenciação das espécies do subgênero *Viannia*, porém obteve baixa efetividade para as espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*, e sendo que, tratando-se da técnica PCR-RFLP, se faz necessário a realização de mais uma etapa do ensaio após a PCR, a etapa de restrição enzimática. Com o

intuito de aprimorar a identificação, Montalvo et al., 2012 desenvolveram três novas abordagens baseadas em PCR-RFLP capazes de diagnosticar e identificar as mais relevantes espécies de *Leishmania*, sendo que esse estudo apresentou melhoria da eficiência de amplificação nas amostras clínicas em comparação ao descrito anteriormente por (Garcia et al., 2004). Portanto, observa-se que o método mais comumente empregado para diferenciação das espécies de *Leishmania*, baseia-se no uso de PCR-RFLP e quando este não é suficiente para a diferenciação, utiliza-se o sequenciamento do produto amplificado do alvo escolhido.

Na busca por métodos mais rápidos e sem o uso de enzimas de restrição, iniciou-se o desenvolvimento de ensaios de PCR em tempo real (qPCR) combinado com *High Resolution Melting* (HRM), que é um método capaz de detectar diferenças na composição nucleotídica de produtos específicos de qPCR (Zampieri, 2013), como metodologias capazes de discriminar as diferentes espécies de *Leishmania*. O ITS-1 foi o alvo selecionado por (Talmi-Frank et al. , 2010) que descreveram um ensaio capaz de diferenciar as espécies de *Leishmania* causadoras de LT nos continentes europeu, africano e asiático (*L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) tropica*, *L. (Leishmania) aethiopica* e *L. (Leishmania) infantum*), exceto a diferenciação de *L. donovani* e *L. infantum*; já o alvo kDNA foi analisado por (Pita-Pereira et al. , 2012) para diferenciação dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e também por (Ceccarelli et al. , 2014), que utilizando amostras de lesões cutâneas de cães com leishmaniose, compararam iniciadores já descritos na literatura (Mary et al., 2004) com novos iniciadores e diferenciaram os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, como também as espécies *L. infantum* e *L. amazonensis*.

Neste contexto, utilizando-se de três diferentes métodos que já foram utilizados em estudos anteriores para a detecção e identificação de *Leishmania*: qPCR, HRM e PCR multiplex, propomos neste estudo novos iniciadores direcionados ao gene *hsp70* padronizados de forma simples, rápidas e eficiente e que poderão contribuir para o apoio ao diagnóstico da LT, resultando em diminuição de tempo, custos e manuseio de amostras.

2. JUSTIFICATIVA

Os métodos laboratoriais mais utilizados atualmente para o diagnóstico da leishmaniose apesar de serem simples, não diferenciam o subgênero do parasito infectante, sendo que, essa identificação é crucial para o prognóstico, a epidemiologia e a escolha da terapia pelo clínico (Berman, 1997) sendo essas as principais justificativas do nosso trabalho:

- Prognóstico: A identificação do subgênero do parasito da lesão indica ao clínico o provável agente etiológico envolvido e as possibilidades de evolução da doença: cutânea (suas diferentes formas) ou mucocutânea.

- Epidemiologia: A detecção diferencial dos subgêneros das espécies de *Leishmania* em áreas endêmicas é essencial para o conhecimento da circulação dos diferentes subgêneros numa determinada região, visto que *L. braziliensis* e *L. amazonensis* são referidos por terem distribuição nacional (Gomes et al. , 2008) e compartilharem áreas de transmissão.

- Escolha da terapia: Há evidências de que a resposta ao tratamento da LT depende da espécie e cepa de *Leishmania* envolvida (Romero et al. , 2001; Soto et al. , 2004; Yardley et al. , 2005), demonstraram que *L. braziliensis* é mais sensível a ação de antimônio pentavalente do que *L. guyanensis*. (Soto et al. , 2002) estabeleceu que miltefosina foi efetivo contra *L. panamensis* (>90% cura), mas não teve efeito contra *L. braziliensis*. Estes resultados de diferentes respostas terapêuticas as diversas espécies de *Leishmania*, frente ao mesmo medicamento, é uma importante justificativa para que se desenvolva um método rápido e capaz de discriminar subgêneros do parasito no contexto clínico e epidemiológico e dessa forma, contribuir para indicação da melhor escolha terapêutica.

Outro ponto importante a ser considerado é dispormos de um método de PCR que diminua para apenas uma etapa de manipulação de amostra, diante de duas etapas (amplificação e digestão enzimática) realizadas atualmente nos ensaios de PCR-RFLP. Dessa forma, possibilita-se a diminuição dos riscos de contaminação da amostra, da exposição do profissional com intercalantes de DNA que são substâncias cancerígenas e o tempo para a obtenção dos resultados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Padronizar ensaios de PCR para diferenciação dos subgêneros de *Leishmania* causadoras de LT no Brasil, tendo como alvo o gene *hsp70*.

3.2 Objetivos Específicos

Padronizar os ensaios qPCR, HRM e PCR multiplex em amostras de cultura de promastigotas provenientes de cepas referência e de amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas, utilizando iniciadores direcionados ao gene alvo *hsp70* para a diferenciação dos subgêneros do agente etiológico causador da LT no Brasil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Amostras de cultura de promastigotas de cepas referência:

Foram isolados parasitos de amostras provenientes da coleção de promastigotas de *Leishmania* do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Neste estudo foram utilizadas as seguintes cepas referência:

- a) *Leishmania* (L.) *amazonensis*: cepa MHO/BR/73/M2269
- b) *Leishmania* (V.) *braziliensis*: cepa MHOM/BR/75/M2903
- c) *Leishmania* (V.) *guyanensis*: cepa MHOM/BR/1975/M4147
- d) *Leishmania* (V.) *lainsoni*: cepa MHOM/BR/1981/M6426
- e) *Leishmania* (V.) *naiffi*: cepa MDAS/BR/1979/M5533
- f) *Leishmania* (V.) *shawii*: cepa MCEB/BR/1984/M8408

4.1.2 Amostras de cultura de cepas de referência de outros patógenos:

Para determinação da especificidade dos ensaios apresentados foram utilizadas amostras de DNA de patógenos disponibilizadas por outros laboratórios:

- a) *Crithidia fasciculata*: Cepa TCC 039 - Obtido junto a coleção de tripanosomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas - USP (gentilmente cedida pela Profa. Martha Geraldtes Teixeira).
- b) *Leptomonas seymouri*: Cepa TC 011E - Obtido junto a coleção de tripanosomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas - USP (gentilmente cedida pela Profa. Martha Geraldtes Teixeira).
- c) *Plasmodium falciparum*: Cepa Palo Alto. Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT-USP (gentilmente cedida pela Dra. Sandra do Lago Moraes).
- d) *Trypanosoma cruzi*: Cepa Y. Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT-USP (gentilmente cedida pela Profa. Thelma Suely Okay).
- e) *Toxoplasma gondii*: Cepa RH. Laboratório de Protozoologia do IMT-USP (gentilmente cedido pelo Prof. Heitor Franco de Andrade Júnior).
- f) *Plasmodium falciparum*: Cepa Palo Alto. Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT-USP (gentilmente cedida pela Dra. Sandra do Lago Moraes).
- g) *Paracoccidioides braziliensis*: Coleção de cultura de fungos patogênicos sob o nº. 361 do Laboratório de Micologia Médica – LIM 53 do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (gentilmente cedida pela Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro).
- h) *Histoplasma capsulatum*: Coleção de cultura de fungos patogênicos sob o nº 589 do Laboratório de Micologia Médica – LIM 53 do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (gentilmente cedida pela Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro).

- i) *Fonsecae pedrosoi*: Coleção de cultura de fungos patogênicos sob o nº 859 do Laboratório de Micologia Médica – LIM 53 do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo (gentilmente cedida pela Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro).

4.1.3 Amostras de promastigotas obtidas a partir de espécimes clínicas:

Foram isolados promastigotas de 20 amostras a partir de cultura de parasitos de lesões tegumentares de pacientes atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo – SP. As amostras que apresentavam em seus prontuários médicos dados clínicos como: sexo, idade, procedência, hipótese diagnóstica de LT, cultura de promastigota positiva e PCR-RFLP com o alvo kDNA positivo foram selecionadas para participar do estudo. Essas amostras se encontram armazenadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e já haviam sido utilizadas para o diagnóstico de LT pelos métodos convencionais (cultura de promastigotas) e PCR-RFLP tendo como alvo o kDNA e digestão enzimática pela enzima *HaeIII* (Satow et al., 2013). Neste estudo, estas amostras foram utilizadas para detecção de DNA de *Leishmania* pelos ensaios qPCR, HRM e PCR Multiplex utilizando como alvo o gene *hsp70*.

4.1.4 Amostra de DNA de controles negativos:

Selecionamos DNA de amostras de sangue humano de voluntário sem história atual ou pregressa de infecção por *Leishmania*. Essas amostras também se encontram armazenadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Neste estudo, estas amostras foram utilizadas como controle negativo e também serviram para avaliar a especificidade e sensibilidade dos ensaios.

4.1.5 Considerações éticas:

A participação dos pacientes foi feita de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/CNS), resolução número 196 de 10/10/1996. O estudo foi aprovado através da emissão do parecer nº 579.201/2014 da Comissão de Ética em Pesquisa da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como também, pela emissão do parecer nº 326/2009 do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultura de promastigotas:

Todas as amostras de culturas das cepas de referência e as provenientes de lesão tegumentar de amostras clínicas escolhidas para participarem desse estudo, que estavam armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas a 26°C em meio M199 (Sigma, Estados Unidos) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (Sigma, Estados Unidos) até alcançarem uma concentração de 10^7 parasito/mL. As promastigotas foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado e o pellet utilizado para extração de DNA.

4.2.2 Extração de DNA:

As amostras de promastigotas foram submetidas ao procedimento de extração de DNA utilizando-se o kit de Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 300 x g, o sobrenadante desprezado e acrescido 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), 20 µL de proteinase K e 200 µL do tampão de lise “AL” da Qiamp. Essa solução foi homogeneizada e colocada em repouso por 10 minutos a 56°C. Em seguida foi acrescido 200 µL de etanol absoluto e a mistura foi homogeneizada. 600 µL dessa solução foram transferidos para a coluna do kit QIAamp, e em seguida realizada centrifugação a 1 minuto por 6.000 x g. Após a centrifugação, o filtrado foi desprezado e acrescido 500 µL do tampão *wash* 1, a coluna foi centrifugada a 1 minuto por 6.000 x g. O filtrado foi desprezado novamente e então acrescentado a 500 µL do tampão *wash* 2. A centrifugação foi repetida a 20.000 x g por 3 minutos e o filtrado desprezado. Foi acrescido 200 µL do tampão de eluição “AE”, e a solução deixada em temperatura ambiente por 5 minutos, e em seguida centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. O filtrado obtido

após a centrifugação (contendo o DNA) foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.2.3 Análise da quantificação e da qualidade das amostras de DNA obtidas:

As amostras de DNA obtidas das extrações de promastigotas foram quantificadas pela medida de absorbância em 260 nm no equipamento de espectrofotometria UV-VIS modelo Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). Utilizou-se 1 µL do tampão de eluição “AE” como branco e 1 µL de DNA da amostra a ser quantificada. Foram consideradas para prosseguir nas próximas etapas do estudo, as amostras que obtiveram concentração entre 20 e 50 ng/µL e grau de pureza na razão 260/280 acima de 1,8.

4.2.4 Construção de iniciadores direcionados ao gene alvo *hsp70*:

Os iniciadores direcionados para o gene alvo *hsp70* disponíveis na literatura que tem como objetivo discriminar subgêneros das espécies de *Leishmania* foram desenvolvidos para serem utilizados em ensaios de PCR-RFLP e sequenciamento. Como neste estudo propomos a identificação e discriminação dos subgêneros de *Leishmania* em apenas um ensaio, realizamos a construção de iniciadores direcionados ao gene alvo *hsp70* que pudessem ser utilizados nos ensaios qPCR, HRM, PCR multiplex.

Inicialmente foi realizado um estudo *in silico* para a construção desses iniciadores. Foi utilizada a ferramenta eletrônica BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) no endereço eletrônico: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para aquisição das sequências do gene *hsp70* das espécies de *Leishmania* que são de interesse desse estudo e que estão depositados no *GenBank* sob os números descritos na tabela 1.

Tabela 1: Espécies de *Leishmania* e seus respectivos números no *GenBank*

Espécie	Nº GenBank
<i>L. (L.) amazonensis</i>	EU599090.1; L14604.1; L14605.1
<i>L.(V.) braziliensis</i>	FN395043.1;FN395040.1; FN395041.1; FN395042.1; EU599088.1; FN395043.1; M87878.1; XM_001566275.1
<i>L.(V.) guyanensis</i>	FN395051.1; FN395052.1; FN395053.1; EU599093.1
<i>L.(V.) lainsoni</i>	FN395047.1; FN395048
<i>L.(V.) naiffi</i>	FN395056.2
<i>L.(V.) shawi</i>	GU071175.1; GU071177.1

As sequências genômicas obtidas foram sobrepostas pela ferramenta eletrônica *Clustal Omega* disponível no site do *European Bioinformatics Institute* no endereço eletrônico: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Esta sobreposição nos permitiu selecionar determinados locais genômicos para a associação de iniciadores específicos para cada ensaio padronizado:

- qPCR: Neste ensaio foram selecionados locais onde haviam sequências repetitivas em ambos subgêneros para a associação de iniciadores *forward* e *reverse*.

- HRM: Neste ensaio foram selecionados locais onde havia sequências repetitivas em ambos os subgêneros para a associação de iniciadores *forward* e *reverse*, havendo uma diferença no nucleotídeo na sequência interna do produto sintetizado, sendo o nucleotídeo Adenina (A) para o subgênero *Leishmania* e o nucleotídeo Guanina (G) para o subgênero *Viannia*.

- PCR multiplex: Neste ensaio foi selecionado um local onde havia sequência repetitiva em ambos os subgêneros para a associação do iniciador *forward* e locais de sequências polimórficas para uma associação específica do iniciador *reverse* para o subgênero *Viannia* e outro local para uma associação específica do iniciador *reverse* para o subgênero *Leishmania*.

Ainda com a utilização da ferramenta eletrônica *Clustal Omega*, realizamos novamente uma sobreposição das sequências genômicas com os iniciadores construídos para confirmação do local exato onde ocorre o alinhamento entre os iniciadores e o gene alvo *hsp70* do parasito.

Após essa análise, submetemos novamente os iniciadores a ferramenta eletrônica BLAST para a verificação de sua especificidade, ou seja, se os

iniciadores construídos não amplificariam sequências genômicas de outros organismos. Além dessa análise, também submetemos a sequência dos iniciadores à análise de controle de qualidade disponível no software *Primer Express* (Life Technologies, Estados Unidos) para a verificação da presença de *hairpin* (interações moleculares dentro do iniciador), *self-dimers* (interações intermoleculares entre dois pares de iniciadores com a mesma sequência no mesmo sentido, apresentando homologia a si mesmo), *cross-dimers* (interações moleculares entre os iniciadores *forward* e *reverse*, apresentando homologia entre eles), confirmação do tamanho do produto amplificado e da Temperatura média de fusão (*melting*) ideal (T_m). Os iniciadores que obtiveram o índice *Penalty* < 100 foram os selecionados para serem testados nas próximas etapas do estudo.

4.2.5 Protocolo de qPCR

As reações de qPCR tiveram volume final de 15 μ L, sendo: 2,0 μ L de H₂O, 10 μ L Hotstart-IT SYBR Green qPCR Master Mix 2X (USB, Estados Unidos) 0,5 μ L de 10 mM de cada iniciador e 2,0 μ L de DNA na concentração de 20 a 50 ng/ μ L. As reações foram realizadas em termociclador modelo qTower (AnalytikJena, Alemanha).

Os iniciadores utilizados nesse ensaio e suas condições estão descritos na tabela 2:

Tabela 2: Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio de qPCR

Iniciadores	Sequência	1 ciclo	35 ciclos		1 ciclo	Produto
		D	A	E	CD	
FE1 (<i>Forward</i>)	CCCTCGTGTCTGGACTTCTT	95°C	95°C	60°C	60°C a	125pb
RE1 (<i>Reverse</i>)	CTCRGTCTGCTTGCTCTTG	2 min.	30 seg.	30 seg.	95°C	

D-Desnaturação, A - Associação, E-Extensão, CD-Curva de Dissociação, min. - minuto, seg. – segundos, pb – pares de base

4.2.6 Protocolo de HRM

O ensaio de HRM teve volume final de 20 µL, sendo: 6,40 µL de H₂O, 10,0 µL de MeltDoctor High Resolution Melting Reagents (Life Technologies, Estados Unidos), 0,8 µL de 5mM de cada iniciador e 2,0 µL de DNA na concentração de 20 a 50 ng/µL.

Os ensaios foram realizados em termociclador modelo PikoReal 96 (Thermo Scientific, Estados Unidos), os iniciadores utilizados nesse ensaio e suas condições estão descritos na tabela 3:

Tabela 3: Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio de HRM

Iniciadores	Sequência	1 ciclo	40 ciclos		1 ciclo	1 ciclo	Produto
		D I	D	A	EF	CD	
FR1 (<i>Forward</i>)	TGATGACGGCGCTGATCA	94°C	94°C	60°C	60°C	60-95°C	65pb
RR2 (<i>Reverse</i>)	ACGTCGAGAAGATCTGGCTCTT	5 min.	30seg	30seg	1min.	0,2°C 10min	

DI – Desnaturação Inicial, D – Desnaturação, A – Associação, EF – Extensão Final, CD – Curva de Dissociação
min – minuto pb – pares de base

4.2.7 Protocolo de PCR multiplex

Para uma adequada padronização do ensaio PCR multiplex, primeiramente padronizamos o ensaio com cada par de iniciadores separadamente e após essa etapa, realizamos a padronização do ensaio com os todos os iniciadores numa mesma reação, diante disso, realizamos três diferentes ensaios, sendo:

4.2.7.1 Padronização do ensaio 1 de PCR com iniciadores FW1 e RW2:

A reação de PCR teve volume final de 25 µL, sendo: 16,8 µL de H₂O, 0,75 µL MgCl₂ 50mM, 1,5 µL de 10mM de cada iniciador FW1 e RW2, 0,2 µL da enzima Taq Polimerase 5U (Thermo Scientific, Estados Unidos), 2,5 µL de tampão da enzima 10X, 0,75 µL de DNTP's 10mM e 1,0 µL de DNA na concentração de 20 a 50 ng/µL.

As reações foram realizadas em termociclador modelo Veriti (Life Technologies, Estados Unidos), os iniciadores utilizados nesse ensaio e suas condições estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio 1 da padronização do ensaio de PCR

Iniciadores	Sequência	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo	Produto
		D I	D	A	E	EF	
FW1 (<i>Forward</i>)	AGAGCCAGATCTTCTCGACGTA	94°C	94°C	64°C	72°C	72°C.	392pb
RW2 (<i>Reverse</i>)	GGAGACCGTGTTCTTCATCGAG	7 min.	30seg	30seg	30seg	7min.	

DI – Desnaturação Inicial, D – Desnaturação, A – Associação, E – Extensão, EF – Extensão Final min – minuto, pb – pares de base

4.2.7.2 Padronização do ensaio 2 de PCR com iniciadores FW1 e RW3:

A reação da PCR teve volume final de 25 µL, sendo: 16,8 µL de H₂O, 0,75 µL MgCl₂ 25mM, 1,5 µL de 10mM de cada iniciador FW1 e RW3, 0,2 µL da enzima Taq Polimerase 5U (Thermo Scientific, Estados Unidos), 2,5 µL de tampão da enzima 10X, 0,75 µL de DNTP's 10mM e 1,0 µL de DNA na concentração de 20 a 50 ng/µL.

As reações foram realizadas em termociclador modelo Veriti (Life Technologies, Estados Unidos), os iniciadores utilizados nesse ensaio e suas condições estão na tabela 5:

Tabela 5: Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio 2 da padronização do ensaio de PCR

Iniciadores	Sequência	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo	Produto
		D I	D	A	E	EF	
FW1 (<i>Forward</i>)	AGAGCCAGATCTTCTCGACGTA	94°C	94°C	64°C	72°C	72°C	316pb
RW3 (<i>Reverse</i>)	TCGTCCGCCTCGTACTTCATTG	7 min	30seg	30seg	30seg	7 min	

DI – Desnaturação Inicial, D – Desnaturação, A – Associação, E – Extensão, EF – Extensão Final min – minuto pb – pares de base

4.2.7.3 Padronização do ensaio 3 de PCR multiplex com iniciadores FW1, RW2 e RW3:

A reação de PCR multiplex teve volume final de 25 µL, sendo: 15,3 µL de H₂O, 0,75 µL MgCl₂ 25mM, 3,0 µL de 10mM do iniciador FW1, 1,5 µL de 10mM de cada iniciador RW2 e RW3, 0,2 µL da enzima Taq Polimerase 5U (Thermo Scientific, Estados Unidos), 2,5 µL de tampão da enzima 10X, 0,75 µL de DNTP's 10mM e 1,0 µL de DNA na concentração de 20 a 50 ng/µL.

As reações foram realizadas em termociclador modelo Veriti (Life Technologies, Estados Unidos), os iniciadores utilizados nesse ensaio e suas condições estão descritos na tabela 6:

Tabela 6: Sequência de iniciadores e condições aplicadas ao ensaio 3 da padronização do ensaio de PCR multiplex

Iniciadores	Sequência	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo	Produto
		D I	D	A	E	EF	
FW1 (<i>Forward</i>)	AGAGCCAGATCTTCTCGACGTA	94°C 7 min.	94°C 30seg	64°C 30seg	72°C 30seg	72°C 7 min	392pb
RW2 (<i>Reverse</i>)	GGAGACCGTGTTCTTCATCGAG						316pb
RW3(<i>Reverse</i>)	TCGTCCGCCTCGTACTTCATTG						

DI – Desnaturação Inicial, D – Desnaturação, A – Associação, E – Extensão, EF – Extensão Final, min – minuto
pb – pares de base

4.2.8 Eletroforese

Uma alíquota de 5,0 µL do produto de PCR foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema de eletroforese vertical Mini Protean Tetra Cell (BioRad, Estados Unidos) em tampão TAE 1M (Tris-Acetato-EDTA) aplicada a tensão de 80 Volts durante 2 horas, sendo posteriormente corados com brometo de etídio a 0,5 µg/mL durante 30 minutos. Utilizamos o equipamento Alphamager (Alpha Innotech, Estados Unidos) para visualização dos resultados e aquisição das imagens.

4.2.9 Controle dos ensaios

Para evitar contaminação de amostras, as etapas de extração de DNA de amostras, preparação da solução de mix de PCR e adição do DNA na solução de mix de PCR foram realizadas em ambientes diferentes.

4.2.10 Avaliação da especificidade dos ensaios

Para avaliar a especificidade dos iniciadores e dos protocolos desenvolvidos, 20 a 50 ng/μL de DNA total dos tripanossomatídeos: *T. cruzi*, *L. seymouri*, *C. fasciculata* e dos patógenos: *T. gondii*, *P. falciparum*, *P. braziliensis*, *H. capsulatum* e *F. pedrosoi* também foram submetidos aos ensaios.

4.2.11 Avaliação da sensibilidade dos ensaios

Para avaliar o limiar de detecção dos ensaios, foram realizadas diluições seriadas em tampão TE (Tris-EDTA) de DNA total extraído de cultura de promastigotas de cepas referência dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

A concentração inicial foi de 20 ng/μL que foram posteriormente diluídas em tampão TE pelo fator 10X em 6 diferentes pontos até a concentração final de 200 fg/μL, valor aproximado do genoma de dois parasitas de *Leishmania* (Jara et al., 2013), as amostras foram submetidas aos protocolos de HRM e PCR Multiplex.

4.2.12 Avaliação da sensibilidade dos ensaios na presença de diferentes concentrações de DNA de *Leishmania* em DNA humano

Com o intuito de verificar se a detecção de DNA de *Leishmania* pode variar na dependência de um volume maior de disponibilidade de DNA de hospedeiro no DNA total extraído, foram realizadas diluições seriadas de DNA de *Leishmania* extraído de cultura de promastigotas de cepas referência dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* em DNA humano extraído de sangue total de indivíduo saudável e sem história pregressa de infecção por *Leishmania*.

Em todas as amostras mantivemos a concentração de DNA humano em 20 ng/μL e diluímos o DNA de *Leishmania* pelo fator 10X em 6 diferentes pontos, a concentração inicial de DNA de *Leishmania* foi de 20 ng/μL e a concentração final de 200 fg/μL valor aproximado do genoma de dois parasitas

de *Leishmania* (Jara et al., 2013), as amostras foram submetidas aos protocolos de HRM e PCR Multiplex.

4.2.13 Reação de Sequenciamento

Para confirmarmos se os produtos resultantes da amplificação do ensaio da PCR multiplex eram as sequências genômicas do gene alvo *hsp70*, os produtos de PCR provenientes das amostras de cepas referência de *L. amazonensis* e *L. naiffi* foram submetidos ao sequenciamento. Inicialmente, os fragmentos foram purificados com o kit comercial InnuPure Gel Extraction Kit (AnalytikJena, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, foram aplicados 20 µL do produto de PCR em gel de agarose a 1% Low Melting (USB, Estados Unidos) para a realização de eletroforese em 80 V durante 2 horas, 300 mg do gel de agarose onde a banda se localizava, foram extraídos e transferidos para um microtubo de 1,5 ml e adicionado 650 µL da solução *Gel Solubilizer* que foi então, incubado a 50°C por 10 minutos até a completa dissolução. Após essa etapa, a solução foi transferida para a coluna Spin Filter do kit e adicionado 50 µL da solução *Binding Optimizer*, centrifugado por 10.000 x g por 1 minuto, o filtrado foi descartado e então adicionado 700 µL da solução *Washing Solution LS* e centrifugado por 10.000 x g por 1 minuto. Essa etapa foi novamente realizada para que não se mantivesse traços de etanol na solução. O filtrado foi descartado e então adicionado 10 µL da solução *Elution Buffer* que foi então incubado a temperatura ambiente por 2 minutos. Após centrifugação de 8.000 x g por 1 minuto, o filtrado foi mantido a 4°C e enviado ao Setor de Serviços de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco da Universidade de São Paulo. Os produtos dessa reação foram submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies, Estados Unidos), utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Estados Unidos). As sequências foram analisadas pelo software Chromas Lite Versão 2.1.1, e então, utilizando a ferramenta eletrônica Clustal Omega os resultados foram submetidos a análise comparativa com as sequências disponível no GenBank para a verificação do grau de homologia entre elas.

5. RESULTADOS

5.1 Local de associação dos iniciadores no gene alvo *hsp70*

Os diversos iniciadores construídos se associaram a sequência do gene alvo *hsp70* do genoma das diferentes espécies de *Leishmania* de interesse desse estudo. Os iniciadores FE1 e RE2 construídos para serem utilizados no ensaio qPCR associam-se ao genoma de *Leishmania* a partir da região 2596 pb até a região de 2720 pb, reconhecendo todas as espécies de *Leishmania* na avaliação *in silico* e tendo como produto esperado do resultado da PCR um fragmento de 124pb (Figura 2).

O alinhamento entre os iniciadores construídos e o gene alvo *hsp70* *Leishmania* está demonstrado na figura 2. O iniciador *forward* FE1 está demonstrado na última linha da figura 2 e seu alinhamento com o gene alvo *hsp70* está demonstrado pelo retângulo amarelo. A base degenerada N que se apresenta na sequência do genoma da espécie *L. braziliensis* (GenBank FN395041.1) não ocasionou inespecificidade ao iniciador, visto que, o significado dessa base degenerada é a presença de qualquer um dos nucleotídeos existentes, além disso, a base degenerada se localiza fora das extremidades do iniciador, o que não interfere na ligação específica do iniciador com a sequência alvo. O iniciador *reverse* RE2 está demonstrado na linha 9 da figura 3 e seu alinhamento com o gene alvo *hsp70* está demonstrado pelo retângulo vermelho. As duas espécies de *L. shawi* (GenBank GU071175.1; GU071177.1) apresentam alteração do nucleotídeo Guanina (G) para o nucleotídeo Adenina (A) em uma das extremidades do iniciador, portanto foi incluída uma base degenerada R, que significa a associação com os nucleotídeos G ou A, na sequência do iniciador no local em que apresenta essa alteração.

Figura 2: Alinhamento do alvo *hsp70* de *Leishmania* com os iniciadores FE1 e RE2
construídos para o ensaio qPCR. Retângulo amarelo: Alinhamento do iniciador *forward* FE1
 com o genoma das espécies de *Leishmania*. Retângulo vermelho: Alinhamento do iniciador
reverse RE2 com o genoma das espécies de *Leishmania*

Os iniciadores FR1 e RR2 destinados a serem utilizados no ensaio HRM associam-se ao genoma da *Leishmania* a partir da região 2779pb até a região de 2844pb, reconhecendo todas as espécies de *Leishmania* analisadas *in silico* e tendo como produto esperado do resultado da PCR um fragmento de 66pb.

O alinhamento entre os iniciadores construídos e o gene alvo *hsp70* *Leishmania* está demonstrado na figura 3. O iniciador *forward* FR1 está demonstrado na linha 18 da figura 3 e seu alinhamento com o gene alvo *hsp70* está demonstrado pelo retângulo amarelo. O iniciador *reverse* RE2 está demonstrado na linha 17 da figura 3 e seu alinhamento com o gene alvo *hsp70* está demonstrado pelo retângulo vermelho. O retângulo verde intermediário apresentado na figura 3 demonstra a alteração de nucleotídeos entre os subgêneros *Leishmania* (que apresenta o nucleotídeo Adenina) e *Viannia* (que apresenta o nucleotídeo Guanina), essa alteração de nucleotídeos é imprescindível para o sucesso do ensaio de HRM, visto que, o ensaio se baseia na diferenciação de temperatura necessária para quebra de ligações de pontes de hidrogênio existente entre as ligações de nucleotídeos.

Figura 3: Alinhamento do alvo *hsp70* de *Leishmania* com os iniciadores FR1 e RR2 construídos para o ensaio HRM. Retângulo amarelo: Alinhamento do iniciador *forward* FR1 com o genoma das espécies de *Leishmania*. Retângulo verde intermediário: Alteração nucleotídica entre os subgêneros *Viannia* (nucleotídeo Guanina) e *Leishmania* (nucleotídeo Adenina). Retângulo vermelho: Alinhamento do iniciador *reverse* RR2 com o genoma das espécies de *Leishmania*.

Os iniciadores FW1 e RW2 destinados a serem utilizados no ensaio PCR multiplex associam-se ao genoma da *Leishmania* a partir da região 825pb até a região de 1141pb, reconhecendo todas as espécies de *Leishmania* avaliadas *in silico* e tendo como produto esperado do resultado da PCR um fragmento de 392 pb.

Os iniciadores FW1 e RW3 a serem utilizados no ensaio PCR multiplex associam-se ao genoma da *Leishmania* a partir da região 825pb até a região de 1216pb, reconhecendo apenas a espécie *L. amazonensis* e tendo como produto esperado do resultado da PCR um fragmento de 316pb.

O alinhamento entre os iniciadores construídos e o gene alvo *hsp70* *Leishmania* esta demonstrado na figura 4. O iniciador *forward* FW1 está demonstrado na última linha da figura 4A e seu alinhamento com o gene alvo *hsp70* está demonstrado pelo retângulo amarelo. O iniciador *reverse* RW3 está demonstrado na linha 12 da figura 4C e seu alinhamento com o gene alvo *hsp70* está demonstrado pelo retângulo verde. O iniciador *reverse* RW2 está demonstrado na linha 11 da figura 4C e seu alinhamento com o gene alvo *hsp70* está demonstrado pelo retângulo vermelho.

Figura 4: Alinhamento do alvo *hsp70* *Leishmania* com os iniciadores FW1, RW2 e RW3
construídos para o ensaio PCR multiplex. Retângulo amarelo: Alinhamento do iniciador *forward* FW1 com o genoma das espécies de *Leishmania*. Retângulo verde: Alinhamento do iniciador *forward* RW3 com o genoma das espécies de *Leishmania*. Retângulo vermelho: Alinhamento do iniciador *reverse* RW2 com o genoma das espécies de *Leishmania*.

5.2 Detecção e diferenciação de subgêneros de *Leishmania* pelo ensaio de qPCR

5.2.1 Padronização do ensaio de qPCR com amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos:

A curva padrão do ensaio foi construída utilizando amostras de DNA extraído de cultura de promastigotas de *Leishmania* de cepas referência que foram diluídas em série em tampão TE pelo fator 5X em cinco diferentes pontos e quantificadas pela medida de absorbância em 260 nm no equipamento de espectrofotometria UV-VIS modelo Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos), sendo o primeiro ponto de 50 ng/μL e o último ponto de 0,08 ng/μL, o ponto P3 foi desconsiderado da análise por apresentar valor fora da curva padrão (Figura 5).

Figura 5: Curva padrão para o ensaio de qPCR com amostras de promastigotas de cepas de referência, relacionando a concentração da amostra com o ciclo limiar da reação.

Após a construção da curva padrão da reação e a definição das condições da qPCR, foi submetido a este ensaio DNA de cepas referência de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *T. cruzi*, *C. fasciculata*, *L. seymouri*, *T. gondii*, *P. falciparum*. As amostras foram submetidas em duplicatas e o resultado final refere-se à média dos resultados individuais de cada amostra.

O gráfico de amplificação das amostras está apresentado na figura 6. A amplificação das amostras de DNA das diferentes espécies de *Leishmania* ocorreu entre os *Cycle threshold* (C_t) 15 e 20 (Linha 1), para as amostras de DNA de *Leishmania* utilizadas para a construção da curva padrão, a

amplificação ocorreu entre o Ct 17 e 27 (Linha 2), as amostras de DNA de *L. seymouri* e *C. fasciculata* também apresentaram amplificação, porém para a amostra de *L. seymouri* (Linha 3) a amplificação ocorreu a partir do Ct 25 e para a amostra de *C. fasciculata* (Linha 4) a partir do Ct 35, ambas as espécies diferenciaram-se das amostras de DNA de *Leishmania*.

Figura 6: Gráfico da curva de amplificação da qPCR utilizando os iniciadores FE1 e RE2 em amostras de cepas referência. O gráfico apresenta diferentes valores de Ct das amostras. Quadro 1: Amostras de DNA de *Leishmania*, Linha 2: Amostras da curva padrão, Linha 3: Amostras de DNA *L. seymouri*, Linha 4: Amostras de DNA *C. fasciculata*.

Após a etapa de curva de amplificação, foi realizada a etapa de curva de dissociação da qPCR, que nos fornece o valor de temperatura de melting (T_m) e possibilita verificar se os iniciadores FE1 e RE2 se associam em outro local do genoma da *Leishmania* que não o de interesse do estudo. A figura 7 apresenta o gráfico da curva de dissociação da qPCR onde é possível observar que houve apenas um pico de dissociação, ou seja, a associação dos iniciadores FE1 e RE2 ocorreu em apenas um único local do genoma da *Leishmania*, não produzindo produtos inespecíficos.

Figura 7: Gráfico da curva de dissociação da qPCR utilizando os iniciadores FE1 e RE2 em amostras de cepas referência. O gráfico apresenta diferentes valores de T_m das amostras. Quadro 1: Amostras de DNA de *Leishmania*. Quadro 2: Amostra da curva padrão, Linha 3: Amostras de DNA *L. seymouri*

Ainda na figura 7 é possível verificar que as amostras de DNA das diferentes espécies de *Leishmania* (Quadro 1) apresentaram valor de resultado dentro da faixa de valores T_m das amostras da curva padrão (Quadro 2), porém todas apresentaram valor de T_m muito semelhante, entre 87,4°C e 87,9°C, impossibilitando a diferenciação dos subgêneros *Leishmania*.

A amostra de DNA de *L. seymouri* (Linha 3) apresentou valor de T_m de 88,1°C, a diferença de valor de T_m entre as diferentes espécies de *Leishmania* e o patógeno *L. seymouri* foi de apenas 0,2°C, o que também impossibilitou a diferenciação das espécies de *Leishmania* com este patógeno.

A amostra de DNA de *C. fasciculata* e as amostras dos demais patógenos analisados, apresentaram baixa ou nenhuma curva de amplificação e consequentemente não apresentaram valor de T_m .

O desempenho desse ensaio para a detecção e quantificação de DNA de amostras de *Leishmania* em cultura de promastigotas se mostrou satisfatório, porém não foi possível diferenciar os subgêneros das espécies de *Leishmania* (Tabela 7).

Tabela 7: Dados referentes a média C_t , quantificação e valor T_m das amostras submetidas ao ensaio de qPCR

AMOSTRA	MÉDIA C_t	CONCENTRAÇÃO PADRÃO (ng/ μ L)	MÉDIA DA CONCENTRAÇÃO (ng/ μ L)	CURVA DE DISSOCIAÇÃO (T_m)
P1	17,97	50	46,01	87,8
P2	20,08	10	10,31	87,8
P4	24,31	0,4	0,50	87,4
P5	27,18	0,08	0,06	87,4
<i>L. amazonensis</i>	17,79	-	52,52	87,9
<i>L. braziliensis</i>	16,43	-	137,98	87,3
<i>L. guyanensis</i>	17,09	-	86,28	87,5
<i>L. lainsoni</i>	18,28	-	36,97	87,8
NEG	-	-	-	-
<i>C. fasciculata</i>	35,09	-	-	-
<i>L. seymouri</i>	25,01	-	0,317	88,1
<i>P. falciparum</i>	-	-	-	-
<i>T. cruzi</i>	-	-	-	-
<i>T. gondii</i>	-	-	-	-

5.2.2 Ensaio de qPCR com amostras de promastiotas provenientes de espécimes clínicas:

Após a padronização do ensaio de qPCR utilizando-se amostras de promastigotas de cepas referência de *Leishmania* e de outros patógenos, iniciou-se a análise das amostras de promastigotas obtidas a partir de espécimes clínicas e foram consideradas como sendo amostra positiva de DNA pertencente a *Leishmania*, as amostras que apresentaram valor de C_t entre 15°C e 25°C e valor de $T_m < 88^\circ\text{C}$.

Foram submetidas ao ensaio, duplicata das amostras de DNA de cepas referência de *L. amazonensis* e *L. lainsoni* como controle positivo e das 20 amostras de promastigotas de *Leishmania* provenientes de espécimes clínicas, o resultado final refere-se à média dos resultados individuais de cada amostra.

Figura 8: Gráfico da curva de amplificação da qPCR utilizando os iniciadores FE1 e RE2 em amostras de cepas referência de *Leishmania* e amostras de DNA de espécimes clínicos. O gráfico apresenta diferentes valores de C_t das amostras. Quadro 1: Amostras de DNA de cepas referência de *Leishmania*. Linha 2: Amostras da curva padrão. Quadro 3: Amostra de DNA de espécimes clínicos.

Diante do critério estabelecido, das 20 amostras de DNA de promastigotas de *Leishmania* de espécimes clínicas, 19 amostras foram consideradas positivas, pois apresentaram resultados correspondentes aos critérios de positividade para a etapa curva de amplificação e apenas uma amostra (ER267) foi considerada negativa, pois não apresentou resultado de valor C_t (Tabela 8).

Tabela 8: Dados referente a média de C_t das amostras de promastigotas obtidas a partir de amostras de espécimes clínicas.

AMOSTRA	MÉDIA C_t	CONCENTRAÇÃO PADRÃO (ng/ μ L)	LEITURA DA CONCENTRAÇÃO (ng/ μ L)
P1	19,04	50	39,89
P2	20,09	10	15,84
P4	22,72	0,4	0,63
P5	26,1	0,08	0,08
ER10	19,3	-	31,65
ER23	17,93	-	105,94
ER44	21,62	-	4,12
ER98	22,76	-	1,51
ER108	24,43	-	0,34
ER114	22,85	-	1,40
ER117	21,37	-	5,15
ER118	18,78	-	50,12
ER125	20,71	-	9,15
ER135	19,83	-	19,86
ER176	20,1	-	15,68
ER186	19,61	-	24,22
ER192	24,78	-	0,25
ER196	17,65	-	135,16
ER198	21,37	-	5,15
ER200	20,49	-	11,11
ER214	17,48	-	157,53
ER215	18,99	-	41,79
ER226	19,49	-	26,89
ER267	-	-	-
<i>L. amazonensis</i>	17,55	-	173,11
<i>L. lainsoni</i>	17,38	-	171,44

Esse ensaio proporcionou a detecção e quantificação de DNA de *Leishmania* em 90,5% das amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas. De acordo com o ensaio *in silico* de construção de iniciadores, também neste ensaio não houve diferenciação de subgêneros, assim como, no ensaio utilizando-se amostras de promastigotas de *Leishmania* de cepas referência.

5.3 Detecção e diferenciação de subgêneros de *Leishmania* pelo ensaio de HRM

Como o ensaio de qPCR utilizando-se os iniciadores FE1 e RE2 não proporcionou a diferenciação entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, iniciou-se a padronização da técnica de HRM, utilizando-se os iniciadores FR1 e RR2.

5.3.1 Padronização do ensaio de HRM com amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos:

Neste ensaio foram utilizadas cepas referência de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* e de outros patógenos: *C. fasciculata*, *L. seymouri*, *T. cruzi*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *P. braziliensis*, *H. capsulatum*, *F. pedrosoi*. As amostras foram submetidas em duplicatas e o resultado final refere-se à média dos resultados individuais de cada amostra.

Igualmente a técnica de qPCR, após a etapa de curva de amplificação foi realizada a etapa de curva de dissociação para obtenção do valor T_m , esse valor indica se os iniciadores FR1 e RR2 não se associam em outro local do genoma da *Leishmania* que não o de interesse do estudo e também para verificação se haveria diferença de valor de T_m entre as amostras pertencentes aos diferentes subgêneros de *Leishmania* e as amostras de outros patógenos. Os valores das curvas de dissociação dos amplicons gerados nesse ensaio estão representados na tabela 9 e figura 9:

Tabela 9: Dados referente a média Tm e desvio padrão das amostras de promastigotas de cepas referência:

QUADRO	AMOSTRA	CURVA DE DISSOCIAÇÃO (T _m)
1	<i>P. falciparum</i>	79,65 +/- 0,26
2	<i>L. amazonensis</i>	79,80 +/- 0,01
3	<i>T. cruzi</i>	79,95 +/- 0,18
4	<i>L. seymouri</i>	80,01 +/- 0,04
	<i>T. gondii</i>	80,25 +/- 0,05
5	<i>L. braziliensis</i>	80,31 +/- 0,03
	<i>L. guyanensis</i>	80,31 +/- 0,007
	<i>L. lainsoni</i>	80,31 +/- 0,02
	<i>L. naiffi</i>	80,31 +/- 0,007
	<i>L. shawi</i>	80,33 +/- 0,007
6	<i>C. fasciculata</i>	80,63 +/- 0,06

Figura 9: Gráfico HRM utilizando os iniciadores FR1 e RR2 em amostras de *Leishmania* e outros patógenos. A: Intensidade de fluorescência em função da temperatura. B: Diagrama de dispersão individual das amostras. Quadro 1: *P. falciparum*; quadro 2: *L. amazonensis*, quadro 3: *T. cruzi*; quadro 4: *T. gondii*, *L. seymouri*, quadro 5: *L. Viannia* e quadro 6: *C. fasciculata*.

As amostras analisadas apresentaram valor de T_m entre 79,39°C a 80,69°C. Algumas amostras apresentaram faixa de confiança sobrepostas, não sendo possível diferenciá-las, este fenômeno pode ser observado entre as amostras das espécies *P. falciparum*, *L. amazonensis* e *T. cruzi*, como também com as amostras *L. seymouri* e *T. gondii*. As amostras das espécies pertencentes ao gênero *Viannia* e da espécie *C. fasciculata* não apresentaram esse fenômeno, possibilitando diferenciá-las das demais espécies analisadas. As amostras de DNA das espécies *F. pedrosoi*, *P. braziliensis*, *H. capsulatum* e controle negativo (H_2O) não apresentaram amplificação durante a etapa de curva de amplificação e consequentemente não apresentaram valor de T_m durante a etapa de curva de dissociação.

5.3.2 Ensaio de HRM com amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas

Após a padronização do ensaio de HRM, utilizando-se amostras de cultura de *Leishmania* de cepas referências e de outros patógenos, iniciou-se a análise das amostras de promastigotas obtidas a partir de espécimes clínicas de pacientes. As amostras foram submetidas em duplicatas e o resultado final refere-se a média dos resultados individuais de cada amostra. Consideramos como sendo amostra de DNA pertencente ao subgênero *Leishmania* as amostras que apresentaram valor de T_m de 79,80°C +/- 0,01°C e amostras de DNA pertencentes ao subgênero *Viannia* as amostras que apresentaram valor de T_m entre 80,31°C +/- 0,03°C a 80,33°C +/- 0,007°C.

Figura 10: Gráfico HRM utilizando os iniciadores FR1 e RR2 em amostras de *Leishmania* e espécimes clínicas. A: Intensidade de fluorescência em função da temperatura. B: Diagrama de dispersão individual das amostras. Quadro 1: Amostra controle de *L. amazonensis*; quadro 2: amostra controle de *L. braziliensis* e amostras clínicas.

Diante desse critério, observa-se que todas as amostras foram consideradas positivas para o subgênero *Viannia*, pois todas apresentaram valor de T_m semelhante ao valor de T_m da amostra de controle positivo de *L. braziliensis*.

5.3.3 Avaliação da sensibilidade do ensaio HRM

Para avaliarmos a sensibilidade do ensaio HRM, submetemos ao ensaio as amostras descritas no item 4.2.11, utilizamos o mesmo critério anterior para a discriminação das amostras, ou seja, para subgênero *Leishmania* as amostras que apresentaram valor de $79,80^{\circ}\text{C} \pm 0,01^{\circ}\text{C}$ e para subgênero *Viannia* as amostras que apresentaram valor de T_m entre $80,31^{\circ}\text{C} \pm 0,03^{\circ}\text{C}$ a $80,33^{\circ}\text{C} \pm 0,007^{\circ}\text{C}$.

Apesar do ensaio detectar todas as amostras diluídas, as mesmas apresentaram deslocamento da faixa de T_m em relação as amostras não diluídas, ou seja, as amostras de *L. amazonensis* apresentaram valor de T_m de 80,16°C +/- 0,07°C, portanto valor de deslocamento de + 0,28°C em relação as amostras não diluídas, e as amostras de *L. naiffi* apresentaram valor de T_m de 80,62°C +/- 0,03°C, portanto o valor de deslocamento de + 0,35°C em relação as amostras não diluídas (Figura 11).

Figura 11: Gráfico HRM de avaliação da sensibilidade. A: Intensidade de fluorescência em função da temperatura. B: Diagrama de dispersão individual das amostras. Quadro 1: Amostras diluídas de *L. amazonensis*; quadro 2: amostras diluídas de *L. naiffi*.

5.3.4 Avaliação da sensibilidade do ensaio HRM na presença de diferentes concentrações de DNA de *Leishmania* em amostras de DNA humano

Para avaliarmos a sensibilidade do ensaio HRM em amostras de cultura de cepas referência de *Leishmania* na presença de diferentes concentrações de DNA humano, submetemos ao ensaio as amostras descritas no item 4.2.12.

Igualmente no ensaio com diluições de amostras em tampão TE, o ensaio conseguiu detectar todas as amostras diluídas, porém as mesmas apresentaram similaridade de padrão de deslocamento da faixa de T_m em relação as amostras não diluídas, ou seja, as amostras de *L. amazonensis* apresentaram valor de T_m de $80,55^{\circ}\text{C} \pm 0,02^{\circ}\text{C}$, portanto valor de deslocamento de $+ 0,72^{\circ}\text{C}$ em relação as amostras não diluídas e as amostras de *L. naiffi* apresentaram valor de T_m de $80,02^{\circ}\text{C} \pm 0,04^{\circ}\text{C}$, portanto valor de deslocamento de $+ 0,35^{\circ}\text{C}$ em relação as amostras não diluídas (Figura 12).

Figura 12: Gráfico HRM de avaliação da sensibilidade na presença de diferentes concentrações de DNA de *Leishmania* em amostras de DNA humano. A: Intensidade de fluorescência em função da temperatura. B: Diagrama de dispersão individual das amostras. Quadro 1: Amostras diluídas de *L. amazonensis* na presença de DNA humano, quadro 2: amostras diluídas de *L. naiffi* na presença de DNA humano.

5.4 Detecção e diferenciação de subgêneros de *Leishmania* pelo ensaio de PCR multiplex

Os resultados apresentados pelo ensaio HRM proporcionaram a diferenciação dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, porém apresentou valor de T_m dentro de uma faixa estreita com relação aos patógenos *T. cruzi*, *T. gondii* e *L. seymouri*. Diante disso, iniciamos a padronização do ensaio PCR multiplex para aumentar, ou até mesmo eliminar, proximidade entre resultados de diferenciação de *Leishmania* desses patógenos.

5.4.1 Ensaio 1 da padronização de PCR utilizando os iniciadores FW1 e RW2 em amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos.

Para padronização deste ensaio foram utilizadas amostras de cepas referência de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* e de outros patógenos: *T. cruzi*, *C. fasciculata*, *L. seymouri*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *P. braziliensis*, *H. capsulatum* e *F. pedrosoi*.

Neste ensaio utilizamos os iniciadores FW1 e RW2 e os resultados demonstraram amplificação de um fragmento de 392 pb para todas as amostras de DNA de *Leishmania*. Esses resultados apresentam conformidade com os resultados obtidos com o estudo *in silico* de construção de iniciadores, que demonstravam cruzamento dos iniciadores com o genoma de todas as espécies de *Leishmania* (Figura 13A).

As amostras contendo DNA dos patógenos *C. fasciculata* e *L. seymouri* também apresentaram amplificação de fragmento de 392 pb (Figura 13B), discordando dos resultados obtidos com o estudo *in silico* de desenho de iniciadores, que não demonstravam cruzamento desses iniciadores com o genoma desses organismos, porém esses resultados positivos comprovam a proximidade filôgenica desses organismos. As demais amostras de patógenos submetidas ao ensaio, sendo elas, as amostras de DNA de *T. cruzi*, *P. falciparum*, *T. gondii* (Figura 13B), *P. braziliensis*, *H. capsulatum* e *F. pedrosoi* (Figura 13C) não apresentaram amplificação de fragmentos.

Figura 13: Ensaio 1 da padronização do PCR. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% utilizando os iniciadores FW1 e RW2. A: Linha 1: Peso molecular 100pb, linha 2: amostra *L. amazonensis*, linha 3: *L. braziliensis*, linha 4: *L. guyanensis*, linha 5: amostra *L. lainsoni*, linha 6: amostra *L. naiffi*, linha 7: amostra *L. shawi* e linha 8: amostra H₂O. B: Linha 1: Ladder 100pb, linha 2: amostra *P. falciparum*, linha 3: amostra *C. fasciculata*, linha 4: amostra *T. cruzi*, linha 5: amostra *T. gondii*, linha 6: amostra *L. seymouri* e linha 7: amostra H₂O. C: Linha 1: amostra Ladder 100pb, linha 2: amostra *P. braziliensis*, linha 3: amostra *H. capsulatum*, linha 4: amostra *F. pedrosoi* e linha 5: amostra H₂O.

5.4.2 Ensaio 2 da padronização de PCR utilizando os iniciadores FW1 e RW3 em amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos:

Para padronização deste ensaio foram utilizadas amostras de cepas referência de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi* e de outros patógenos: *T. cruzi*, *C. fasciculata*, *L. seymouri*, *T. gondii*, *P. falciparum*, *P. braziliensis*, *H. capsulatum* e *F. pedrosoi*.

Neste ensaio foram utilizados os iniciadores FW1 e RW3 e os resultados demonstram amplificação de um fragmento de 316 pb apenas para a amostra de DNA de *L. amazonensis* (Figura 14A).

As demais amostras contendo DNA de espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* e de outros patógenos não apresentaram amplificação (Figura 14A e 14B).

Figura 14: Ensaio 2 da padronização do PCR. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% utilizando os iniciadores FW1 e RW3. A: Linha 1: Peso molecular 100pb, linha 2: amostra *L. amazonensis*, linha 3: *L. braziliensis*, linha 4: *L. guyanensis*, linha 5: amostra *L. lainsoni*; linha 6: amostra *L. naiffi*, linha 7: amostra *L. shawi* e linha 8: amostra H₂O. B: Linha 1: Ladder 100pb, linha 2: amostra *P. falciparum*, linha 3: amostra *C. fasciculata*, linha 4: amostra *T. cruzi*, linha 5: amostra *T. gondii*, linha 6: amostra *L. seymouri* e linha 7: amostra *P. braziliensis*, linha 8: amostra *H. capsulatum*, linha 9: amostra *F. pedrosoi* e linha 10: H₂O.

Este resultado demonstra que o par de iniciadores utilizado neste ensaio é específico para o subgênero *Leishmania*, possibilitando a diferenciação desse subgênero com o subgênero *Viannia* e com os outros patógenos analisados.

5.4.3 Ensaio de padronização do PCR multiplex utilizando os iniciadores FW1, RW2 e RW3 em amostras de promastigotas de cepas referência e amostras de outros patógenos

Para padronização deste ensaio foram utilizadas amostras de cepas referência de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi* e dos patógenos *C. fasciculata*, *L. seymouri*.

Neste ensaio foram utilizados os iniciadores FW1, RW2 e RW3. Os resultados demonstram que para a amostra de DNA da espécie *L. amazonensis* houve a amplificação de dois fragmentos, o primeiro fragmento de 316 pb e o segundo fragmento de 392 pb (Linha 10 da figura 15) e para as demais amostras o resultado demonstra apenas um fragmento de 392 pb (Linha 2 a 8 da figura 15).

Figura 15: Ensaio de padronização do PCR multiplex. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% utilizando os iniciadores FW1, RW2 e RW3. Linha 1: Peso molecular 100pb, linha 2: *L. braziliensis*, linha 3: *L. guyanensis*, linha 4: amostra *L. lainsoni*, linha 5: amostra *L. naiffi*, linha 6: amostra *L. shawi*, linha 7: amostra *C. fasciculata*, linha 8: amostra de *L. seymouri*, linha 9: H₂O e linha 10: *L. amazonensis*.

5.4.4 Sequenciamento dos fragmentos do ensaio de PCR multiplex:

Utilizando a ferramenta BLAST realizamos a análise comparativa dos resultados obtidos pelo sequenciamento com as amostras de *hsp70* *Leishmania* disponíveis no *GenBank*. Essa análise apresentou a homologia de 98% entre as amostras, confirmando que os produtos amplificados correspondem a sequência do gene alvo *hsp70*.

5.4.5 Ensaio de PCR multiplex com iniciadores FW1, RW2 e RW3 em amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas:

Com a padronização da PCR multiplex em cepas referência e com a confirmação pelo sequenciamento de que o produto de PCR amplificado era proveniente do gene alvo *hsp70*, avaliamos as 20 amostras de DNA de promastigotas provenientes de espécimes clínicas.

Consideramos como sendo amostra de DNA pertencente ao subgênero *Leishmania* as amostras que apresentaram dois fragmentos, o primeiro de 316 pb e o segundo fragmento de 392 pb e amostras de DNA pertencentes ao subgênero *Viannia* as amostras que apresentaram apenas o fragmento de 392 pb. Diante desse critério, das 20 amostras submetidas ao ensaio, 19 amostras apresentaram padrão idêntico ao controle positivo do subgênero *Viannia* e apenas a amostra clínica (ER196) (Linha 4 da figura 16A), apresentou padrão idêntico ao controle positivo do subgênero *Leishmania*.

Figura 16: Ensaio de PCR multiplex em amostras de promastigotas provenientes de espécimes clínicas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% utilizando os iniciadores FW1, RW2 e RW3. A: Linha 1: Ladder 100pb, linha 2: amostra controle de *L. amazonensis*; linha 3: amostra controle de *L. naiffi*, linhas 4-9: amostras clínicas. B: Linha 1: Ladder 100pb, linha 2: amostra controle de *L. amazonensis*; linha 3: amostra controle de *L. naiffi*, linhas 4-13: amostras clínicas, linha 14: H₂O C: Linha 1: Ladder 100pb, linha 2: amostra controle de *L. amazonensis*; linha 3: amostra controle de *L. naiffi*, linhas 4-7: amostras clínicas.

5.4.6 Avaliação da sensibilidade do ensaio de PCR multiplex

Para este ensaio foram utilizadas amostras de cepas referência de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. naiffi*.

Conforme esperado, no primeiro ensaio utilizando tampão TE como diluente, as amostras de DNA de *L. amazonensis* apresentaram dois fragmentos, o primeiro de 316 pb e o segundo de 392 pb e as amostras de DNA de *L. naiffi* apresentaram apenas o fragmento de 392 pb.

O ensaio se mostrou mais sensível para amostras de DNA de *L. naiffi*, em que o limite de detecção foi de 2 pg/μL (Linha 13 da figura 17), já com a amostra de DNA de *L. amazonensis* o limite de detecção foi de 20 pg/μL (Linha 5 da figura 17).

Figura 17: Avaliação da sensibilidade do ensaio PCR multiplex. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% dos fragmentos de PCR multiplex. Linha 1: amostra Ladder 100pb; linhas 2 a 7: amostras diluídas de *L. amazonensis*; linhas 8 a 13: amostras diluídas de *L. naiffi*, linha 14: H₂O.

5.4.7 Avaliação da sensibilidade do ensaio PCR multiplex na presença de diferentes concentrações de DNA de *Leishmania* em amostras de DNA humano

Avaliamos também a sensibilidade do ensaio nas amostras diluídas de cultura de cepas referência de *Leishmania* na presença de amostras de DNA humano (item 4.2.12). Conforme esperado, as amostras de DNA de *L. amazonensis* apresentaram dois fragmentos, o primeiro de 316 pb e o segundo de 392 pb e as amostras de DNA de *L. naiffi* apresentaram apenas um fragmento de 392 pb. O ensaio demonstrou sensibilidade semelhante para ambos os subgêneros, foi possível detectar dois pg/μL de DNA de *L.*

amazonensis (Linha 7 da figura 18) e *L. naiffi* (Linha 13 da figura 18), porém a amostra de *L. naiffi* apresentou fragmentos de PCR com maior nitidez.

Figura 18: Avaliação da sensibilidade do ensaio PCR multiplex na presença de diferentes concentrações de DNA de *Leishmania* em amostras de DNA humano. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% dos fragmentos de PCR multiplex. Linhas 1,2, 4-7: amostras diluídas de *L. amazonensis*; Linha 3: amostra Ladder 100pb; linhas 8 a 13: amostras diluídas de *L. naiffi*, linha 14: H₂O.

5.5 Análise comparativa dos três ensaios para a detecção e identificação do subgênero *Leishmania*

Ao final da análise dos resultados dos três ensaios desenvolvidos foi obtido um banco de dados contendo as informações das amostras analisadas, sendo possível identificar se houve ou não positividade para *Leishmania* e qual o subgênero de *Leishmania* presente na amostra (ANEXO A).

Das 6 amostras promastigotas de cepas referência de espécies de *Leishmania*, todas apresentaram concordância da positividade nos três ensaios desenvolvidos. Com relação a identificação dos subgêneros de *Leishmania*, os ensaios HRM e PCR multiplex apresentaram correta identificação e concordância de resultados, já o ensaio qPCR não possibilitou esse tipo de análise.

Dos 8 diferentes patógenos testados, as amostras de *C. fasciculata* e *L. seymouri* apresentaram positividade nos três ensaios desenvolvidos, sendo que na qPCR a positividade ocorreu em diferente faixa de Ct das amostras controle de DNA de *Leishmania*, no PCR multiplex a positividade foi idêntica ao padrão da amostra controle de *L. Viannia* e no ensaio de HRM, igualmente a qPCR, apresentou positividade em diferente faixa de T_m das amostras controle

de DNA de *L. Leishmania*, também no ensaio de HRM houve positividade das amostras *P. falciparum*, *T. cruzi* e *T. gondii* na mesma faixa de T_m ao padrão da amostra controle de *L. Leishmania*.

Das 20 amostras promastigota provenientes de espécimes clínicas, 19 amostras obtiveram concordância com relação a positividade da presença de DNA de *Leishmania* em todos os ensaios aplicados para detecção de DNA, somente a amostra ER267 apresentou discordância de resultado, pois não apresentou curva de amplificação no ensaio qPCR. Com relação a identificação do subgênero *Leishmania*, das 20 amostras analisadas, 19 obtiveram concordância de resultados, apenas a amostra ER196 apresentou discordância, ou seja, apresentou padrão idêntico a amostra controle de subgênero *Viannia* no ensaio HRM e padrão idêntico a amostra controle de subgênero *Leishmania* no ensaios PCR multiplex. Diante disso, analisamos o estudo apresentado por Satow et al., 2013, que utilizou essa mesma amostra para identificação da espécie *L. braziliensis* e o resultado obtido foi como sendo uma amostra de não *L. braziliensis*. Esse resultado concorda com o nosso resultado do ensaio de PCR multiplex, portanto, a amostra foi considerada como pertencente ao subgênero *Leishmania*.

6. DISCUSSÃO

As técnicas de biologia molecular para identificação e diferenciação de subgêneros de *Leishmania*, em sua maioria são restritas aos laboratórios de pesquisa. Ao desenvolver esses três ensaios de identificação e diferenciação de subgêneros de *Leishmania* procurávamos tornar essa análise mais acessível, simples e eficiente. As etapas que envolviam a detecção de DNA do parasito incluíam a coleta e processamento das cepas referência e de promastigotas provenientes de amostras clínicas, purificação do material genético, detecção e amplificação do gene alvo e análise de resultados. Como a padronização das primeiras etapas não era um dos objetivos do nosso estudo optamos por utilizar a metodologia já previamente estabelecida em nosso laboratório (Satow et al., 2013) e nos atentarmos em padronizar e simplificar a metodologia para a detecção, amplificação e análise dos

resultados do gene alvo, pois essa é a etapa mais dificultosa e demorada da análise laboratorial.

Para amostras de controle positivo optamos por utilizar cepas referência das espécies de *Leishmania* que causam LT no Brasil que já possuíam o gene *hsp70* publicado no *GenBank* e que já haviam sido utilizadas em estudos anteriores com sucesso para o propósito de identificação de *Leishmania*. (Fraga et al., 2010) utilizou as mesmas cepas referência de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* para construir a filogenia das espécies de *Leishmania* baseadas no gene *hsp70*, (Tsukayama et al. , 2009) as de *L. guyanensis* para identificação de polimorfismos genéticos e (Graca et al. , 2012) as de *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi* em seu estudo de desenvolvimento de uma ferramenta diagnóstica para LT. A utilização de cepas referências em estudos de validação de metodologias é de fundamental importância para definição de padrões a serem empregadas nas etapas posteriores, quando da utilização de amostras desconhecidas.

O passo seguinte desse estudo foi selecionar o gene alvo e construir os iniciadores a serem utilizados nos ensaios. Escolhemos o gene *hsp70*, devido à apresentação de algumas vantagens em relação aos outros alvos: o gene apresenta repetições *in tandem* e poucas variações, discrimina todas as espécies relevantes de *Leishmania* de ambos os subgêneros e a técnica de PCR pode ser otimizada diretamente das amostras clínicas (Folgueira e Requena, 2007; Montalvo et al., 2012; Odiwuor et al. , 2012). É importante ressaltar que esse gene já tinha sido utilizado para diferenciação de espécies de *Leishmania*, porém em estudos utilizando a técnica de PCR-RFLP (Garcia et al., 2004; Graca et al., 2012), sequenciamento (Van der Auwera et al. , 2013) e mais recentemente com a técnica de HRM (Hernandez et al. , 2014). Com o intuito de padronizar ensaios que consistem em apenas uma etapa de manuseio de amostras, optamos por construir nossos próprios iniciadores e desenvolvê-los em ensaios substitutos aos que já haviam sido descritos na literatura. A partir dos resultados *in silico*, iniciamos a aplicação desses iniciadores em amostras de cepas referência, que possibilitaram a determinação dos subgêneros de acordo com as espécies já definidas para essas cepas. Esta fase de caracterização foi fundamental para empregarmos esses mesmos iniciadores em promastigotas provenientes de amostras

clínicas, em que não se conhecia a espécie de *Leishmania* causadora da lesão. Outro ponto fundamental na seleção de iniciadores é que os mesmos sejam específicos para a espécie estudada. O teste de especificidade, embora seja de grande importância para a avaliação da padronização de um novo ensaio de PCR, normalmente não é descrito na maioria dos artigos publicados em nossa linha de pesquisa, sendo então, um diferencial do nosso estudo utilizar amostras de DNA de parasitos que possam apresentar reatividade cruzada com *Leishmania*, tais como, *L. seymouri*, *C. fasciculata* e *T. cruzi* parasitos pertencentes à mesma família *Trypanosomatidae* (McGhee e Cosgrove, 1980); *P. falciparum* ou *T. gondii* protozoários que causam doenças nas mesmas áreas de ocorrência de LT (Lindoso e Lindoso, 2009; Rodrigues et al. , 2014) ou então *P. braziliensis*, *H. capsulatum* e *F. pedrosoi* patógenos que podem ocasionar manifestações clínicas semelhantes a LT (Edrissian et al. , 1990; Markle e Makhoul, 2004; Bhutto et al. , 2009).

Quando os iniciadores foram aplicados na qPCR em cepas referência de *Leishmania* e de outro patógenos, os mesmos foram capazes de discriminar *Leishmania* de outros patógenos, somente *L. seymouri* amplificou valor de C_t válido com estes iniciadores. Este resultado de reconhecimento de *L. seymouri* comprova a similaridade filogenética com a *Leishmania*, sendo que essa similaridade também foi observada em estudos imunológico desenvolvido com a técnica de ELISA, em que antígenos de *C. fasciculata*, *Crithidia lucilliae*, e *L. seymouri* obtiveram 100% de reatividade cruzada com soro de pacientes com LT (Ferreira et al. , 2014). Estes resultados demonstram que os iniciadores empregados neste ensaio apresentam especificidade elevada e pode ser utilizado para uma nova etapa de padronização do ensaio em espécimes clínicas, com o objetivo de aplicá-lo na prática do diagnóstico de LT, visto que não há reatividade com patógenos que causam doença humana.

Com relação a análise de resultados das amostras clínicas, esse ensaio apresentou falha na detecção de DNA de parasito em uma das amostras analisadas. A presença de DNA na amostra era confiável, visto que havia sido dosada por espectrometria após a extração de DNA, porém mesmo realizando o ensaio de qPCR em duplicata não houve positividade da amostra. Sugerimos que essa inibição pode ter ocorrido devido à não associação do par de oligonucleotídeo FE1 e RE2 com essa amostra, pois pode se tratar de uma

espécie de *Leishmania* que apresente mutação na região de associação de um dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de qPCR. Interessantemente essa mesma amostra foi positiva nos ensaios de HRM e PCR Multiplex, pois provavelmente essa mutação não foi suficiente para impedir a associação dos pares de oligonucleotídeos utilizados nestas outras técnicas, os quais, são diferentes dos oligonucleotídeos utilizados na técnica de qPCR.

Após obtermos os resultados da qPCR, iniciamos a análise por HRM. Este ensaio aborda a detecção de uma simples alteração nucleotídica e é mais uma alternativa viável para a detecção e identificação dos subgêneros e espécies de *Leishmania*. Alguns autores tem buscado esta metodologia com a finalidade de discriminar as espécies de *Leishmania*, utilizando diferentes alvos. (Pita-Pereira et al., 2012) avaliando o alvo kDNA por HRM observaram que é possível diferenciar os subgêneros de *Leishmania* a partir de amostras clínicas humanas. Já (Hernandez et al., 2014) analisando o alvo *hsp70* por HRM, identificou diferentes espécies de *Leishmania* em cepas referência e amostras clínicas de pacientes com LT. Utilizando os iniciadores construídos para o ensaio de HRM, foi possível diferenciar os subgêneros *Leishmania* de *Viannia*, no entanto houve reatividade com *P. falciparum* e *T. cruzi* na mesma faixa de T_m de *L. amazonensis*. Na literatura observa-se que dependendo do gene alvo escolhido existe a possibilidade de amplificação do genoma de *T. cruzi*, como exemplo, o estudo apresentado por (Talmi-Frank et al., 2010) analisando o gene alvo ITS-1 também apresentou amplificação de produtos de PCR do patógeno *T. cruzi* e dos patógenos *Trichophyton equinum* e *C. fasciculata*, porém em faixa de T_m diferente da faixa de T_m de *Leishmania*. Já (Ceccarelli et al., 2014) ao utilizarem amostras de cães com LV, tendo como alvo o kDNA não observaram amplificação do genoma de *T. cruzi*. Os autores não utilizaram amostra de *P. falciparum* em seus ensaios de especificidade. A reação cruzada observada em nosso estudo discorda do resultado *in silico* de construção de oligonucleotídeos, em que não apresentava reação cruzada com o genoma desses organismos, diante desse fato, sugerimos que para a identificação diferencial entre *Leishmania* e esses organismos, seja utilizado o método PCR multiplex que também foi padronizado nesse estudo.

A análise de resultados do HRM em promastigotas provenientes de espécimes clínicas demonstrou que todas as amostras apresentaram perfil

sugestivo para o subgênero *Viannia*. Esse resultado já era esperado e pode ser explicado por alguns fatores: existem cinco espécies pertencentes ao gênero *Viannia* e apenas uma espécie pertencente ao gênero *Leishmania* causadoras de LT no Brasil (Basano, 2004) a espécie *L. braziliensis*, que pertence a esse subgênero, é a principal espécie causadora de leishmaniose tegumentar no Brasil (Brandao Filho et al., 2011) e sete amostras das 20 analisadas eram provenientes de lesão de mucosa, mais comumente ocasionada por parasitos pertencentes a esse subgênero (Amato et al. , 2007). Os nossos resultados de detecção de maior número de amostras do subgênero *Viannia*, são corroborados por (Graca et al., 2012) que ao analisarem amostras de pacientes com LT, com os alvos *hsp70*, kDNA e ITS-1 observaram que a maioria das amostras pertenciam ao subgênero *Viannia*. Certamente, os nossos resultados e os resultados obtidos por esse autor confirmam que a maior circulação de *Leishmania* no Brasil é do subgênero *Viannia* e provavelmente da espécie *L. braziliensis*.

Nossas análises de sensibilidade e disponibilidade de DNA do parasito em relação ao DNA do hospedeiro no ensaio de HRM foram capazes de detectar aproximadamente até dois parasitos/ μ L, no entanto observamos deslocamento do valor de T_m com relação as amostras não diluídas de cepas referência. Até o momento, não observamos na literatura nenhum resultado de HRM utilizando amostras com diluição seriada. Essa ausência de informação impossibilita uma discussão e avaliação mais profunda de nossos achados com os outros estudos, mas também demonstra o diferencial de nosso estudo perante a literatura, diante disso, sugerimos que essa análise seja realizada em estudos futuros que tenham o propósito de identificação de *Leishmania* em amostras de espécimes clínicas humanas.

A técnica de PCR Multiplex, que consiste na utilização simultânea de iniciadores complementares direcionados a diferentes locais do gene alvo, possibilitou a diferenciação dos gêneros de *Leishmania* em apenas uma etapa do ensaio, tanto nas amostras de cepas referência como nas amostras de espécimes clínicas, fazendo desse ensaio mais rápido que os ensaios PCR-RFLP empregados atualmente. Quando utilizamos os iniciadores FW1, RW2 e RW3, observamos que para o subgênero *Leishmania* houve a amplificação de dois fragmentos distintos (316 e 392pb), enquanto que para o subgênero

Viannia houve amplificação somente do fragmento de 392 pb. Esses fragmentos foram sequenciados e apresentaram 98% de homologia com o gene *hsp70 Leishmania*. Com relação a especificidade do PCR multiplex observamos que o patógeno *C. fasciculata* e novamente o patógeno *L. seymouri* apresentaram amplificação de fragmento da PCR de 392 pb. Esses resultados de reação cruzada com esses patógenos não são considerados de importância clínica, pois esses patógenos, informalmente conhecidos como “tripanosomatídeos inferiores”, são gêneros de tripanosomatídeos que infectam insetos e planta e classicamente não patogênicos ao homem, compartilham moléculas homólogas a fatores de virulência encontrados em tripanosomatídeos classicamente patogênicos (Santos et al. , 2006) e apresentam reatividade cruzada com *Leishmania* (Ferreira et al., 2014). O fragmento de 316 pb não foi evidenciado em nenhuma amostra dos outros patógenos analisados e nem com o subgênero *Viannia*, demonstrando a especificidade deste iniciador para a subgênero *Leishmania*, quando da análise da espécie *L. amazonensis*.

De todas as amostras provenientes de espécimes clínicas, somente a amostra ER196 apresentou perfil sugestivo para a espécie *L. amazonensis* no PCR multiplex. Analisando o prontuário desse paciente, verificamos que a amostra foi extraída de uma lesão cutânea e que os métodos laboratoriais de imunodiagnóstico (IFI e ELISA) haviam sido negativos para *Leishmania*. Acreditamos que esse resultado é possivelmente devido a dois fatores: houve proliferação do parasito em meio de cultura, o que aumenta a sensibilidade de detecção, como também as vantagens de sensibilidade e especificidade promovida pela PCR (Brandao-Filho e Shaw, 2006). Quando essa mesma amostra foi analisada por HRM, o padrão de T_m foi semelhante ao subgênero *Viannia*. Esse resultado discordante da mesma amostra em ensaios diferentes, ou seja, padrão idêntico a amostra controle de subgênero *Viannia* no ensaio HRM e padrão idêntico a amostra controle de subgênero *Leishmania* no ensaio PCR multiplex, pode sugerir uma possível co-infecção, possibilidade essa, já relatada por (Monroy-Ostria et al. , 2014), em que ao identificar a espécie de *Leishmania* em 163 amostras de espécimes clínicas, ao menos 5 amostras resultaram em sugestivas para co-infecção de *L. (L.) mexicana* e *L. braziliensis* ou *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*.

A sensibilidade da detecção de DNA de *Leishmania* em promastigotas diluídas em tampão TE foi de 20 pg/μL, quando detectados os dois fragmentos de DNA de *L. amazonensis* e de 2 pg/μL quando detectado um único fragmento de DNA de *L. naiffi*, essa maior sensibilidade obtida com a amostra de *L. naiffi* pode ser decorrente da quantidade de fragmentos produzidos no ensaio, pois supomos que a amplificação é mais eficiente quando há somente um fragmento de PCR, devido há maior disponibilidade da enzima *Taq DNA Polymerase*. Nosso resultado demonstrou maior sensibilidade do que o ensaio PCR multiplex direcionado ao alvo *Splice Leader RNA* descrito por (Harris et al. , 1998) quando avaliado a máxima detecção de DNA de *Leishmania* para o complexo *L. amazonensis* foi de 10 pg/μL, porém menor sensibilidade quando avaliado o complexo *L. braziliensis* que foi de 1 fg/μL. Ressaltamos que o *Splice Leader RNA* avaliado no estudo de (Harris et al., 1998) possui aproximadamente 200 cópias por genoma haplóide (Hassan, 1992), já o gene *hsp70* esta arranjado em um simples genômico cluster que contém cinco ou seis cópias do HSP70-I seguido por uma cópia do HSP70-II (Ramirez et al. , 2011), devido a menor quantidade de cópias do nosso gene alvo e o nível de detecção obtido por nosso ensaio, consideramos que o nosso método é tão ou mais sensível que o método apresentado por (Harris et al., 1998) para a detecção de *L. braziliensis*.

Na avaliação da detecção do DNA do parasito em relação ao DNA do hospedeiro, apesar de apresentarem sensibilidade de detecção de 2 pg/μL em ambos os subgêneros, a amostra de *L. amazonensis* apresentou detecção visivelmente menor do que a amostra de *L. naiffi*, sugerindo novamente que a quantidade de fragmentos de PCR produzidos no ensaio aparenta influenciar na sensibilidade da detecção do DNA do parasito. Os estudos descritos na literatura de PCR multiplex com o intuito de detecção de *Leishmania* em amostras humanas não apresentam resultados desse tipo de ensaio, (Belli et al., 1998; Harris et al., 1998; Rodriguez-Gonzalez et al. , 2007; Goncalves-de-Albuquerque et al. , 2014), novamente essa ausência de informação impossibilita uma discussão e avaliação mais profundada de nossos achados com os outros estudos, como também mantém o diferencial da ampla análise do nosso estudo perante a literatura.

As amostras provenientes de cultura de promastigotas de cepas referência apresentaram total concordância nos três ensaios padronizados. Já as amostras provenientes de cultura de promastigotas de espécimes clínicas apresentaram 95% de concordância de resultados, sendo possível detectar e identificar o subgênero *Leishmania* dessas amostras utilizando dois dos três ensaios padronizados, separadamente ou em paralelo. Diante dos nossos resultados, sugerimos a utilização dos nossos ensaios em paralelo com os exames de diagnóstico utilizados atualmente ou como uma segunda confirmação da presença de DNA de *Leishmania* em amostra promastigota. Além disso, também sugerimos a continuidade dessa linha de pesquisa na validação desses ensaios em amostras de lesão tegumentar do paciente.

7. CONCLUSÃO

- A construção de novos iniciadores direcionados ao gene alvo *hsp70*, possibilitou o desenvolvimento de ensaios específicos para a detecção do DNA de *Leishmania* em promastigotas.
- A padronização do ensaio qPCR possibilitou a detecção de DNA do parasito em promastigotas de cepas referência e de espécimes clínicas, porém impossibilitou a diferenciação dos subgêneros de *Leishmania*.
- A padronização do ensaio HRM possibilitou a detecção de DNA do parasito em promastigotas de cepas referência e de espécimes clínicas, possibilitando a diferenciação dos subgêneros de *Leishmania*.
- A padronização do ensaio PCR multiplex possibilitou a detecção de DNA do parasito em amostras de promastigotas de cultura e espécimes clínicas, possibilitando a diferenciação dos subgêneros de *Leishmania*, com alta sensibilidade e especificidade.

ANEXO A

AMOSTRA	MÉDIA Ct	HRM	cPCR Multiplex	SUBGÊNERO
ER10	19,3	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER23	17,93	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER44	21,62	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER98	22,76	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER108	24,43	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER114	22,85	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER117	21,37	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER118	18,78	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER125	20,71	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER135	19,83	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER176	20,1	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER186	19,61	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER192	24,78	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER196	17,65	<80,5 e 80,3>	316pb/392pb	<i>L. Leishmania</i>
ER198	21,37	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER200	20,49	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER214	17,48	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER215	18,99	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER226	19,49	<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
ER267		<80,5 e 80,3>	392pb	<i>L. Viannia</i>
<i>L. Leishmania</i>	17,55	79,80 +/- 0,01	316pb / 392pb	<i>L. Leishmania</i>
<i>L. Viannia</i>	17,38	80,31 +/- 0,03	392pb	<i>L. Viannia</i>
<i>Crithidia fasciculata</i>	35,09	80,63 +/- 0,06	392pb	
<i>Trypanosoma cruzi</i>		79,95 +/- 0,18		
<i>Leptomonas seymouri</i>	25,01	80,01 +/- 0,04	392pb	
<i>Plasmodium falciparum</i>		79,65 +/- 0,26		
<i>Toxoplasma gondii</i>		80,25 +/- 0,05		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>				
<i>Histoplasma capsulatum</i>				
<i>Fonsecae pedrosoi</i>				
Negativo				

Discordância de resultados de identificação de espécie entre os métodos analisados

 Discordância de resultado de positividade entre os métodos analisados

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77 (2): 266-74.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000; 30 (12-13): 1269-81.
- Basano SAC, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. *Rev. Bras. Epidemiologia.* 2004; 7: 328-37.
- Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58 (1): 102-9.
- Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis.* 1997; 24 (4): 684-703.
- Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Matsumoto J, Uezato H, Hashiguchi Y, et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (L.) major infection in Sindh province, Pakistan. *Acta Trop.* 2009; 111 (3): 295-8.
- Brandao-Filho SP, Shaw JJ. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. *Trends Parasitol.* 2006; 22 (11): 500-1; author reply 1-2.
- Brandao Filho SP, Dantas-Torres F, Tolezano JE, Shaw JJ. Hospedeiros Reservatórios de *Leishmania* spp. Associados à Leishmaniose Tegumentar Americana, com especial ênfase no Brasil. In: Costa ABJ. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas.* Salvador. 2011. 1: 65-74.
- Brasil MdSd (2007). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Saúde SdVe. Brasília, Editora do Ministério da Saúde.
- Carvalho L, de Andrade AS, Fontes CJ, Hueb M, de Oliveira Silva S, Melo MN. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. *Acta Trop.* 2006; 98 (3): 277-85.
- Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (2): 540-6.
- Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One.* 2014; 9 (2): e88845.
- Chance ML. New developments in the chemotherapy of leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995; 89 Suppl 1: 37-43.
- Chance ML, Peters W, Shchory L. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol.* 1974; 68 (3): 307-16.
- Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, et al. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84 (2): 255-60.
- Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2013; 134 (3): 281-9.
- Cruz LMF-WAK. Biologia Molecular da *Leishmania*: Genoma da *Leishmania*. In: Costa ABJ. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas.* Salvador. 2011. 1: 24-38.
- da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graca GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010; 10 (1): 77-83.
- de Lima AC, Zampieri RA, Tomokane TY, Laurenti MD, Silveira FT, Corbett CE, et al. *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in

paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. *Parasitol Res.* 2011; 108 (6): 1525-31.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol.* 1996; 14 (5): 417-23.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27 (5): 305-18.

Dias JCMES. Vetores das Leishmanioses nas Américas. In: Costa ABJ. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas.* Salvador, 1. 2011. 55-64.

Edrissian GH, Mohammadi M, Kanani A, Afshar A, Hafezi R, Ghorbani M, et al. Bacterial infections in suspected cutaneous leishmaniasis lesions. *Bull World Health Organ.* 1990; 68 (4): 473-7.

Ferreira LR, Kesper N, Teixeira MM, Laurenti MD, Barbieri CL, Lindoso JA, et al. New insights about cross-reactive epitopes of six trypanosomatid genera revealed that *Crithidia* and *Leptomonas* have antigenic similarity to *L. (L.) chagasi*. *Acta Trop.* 2014; 131: 41-6.

Floeter-Winter LM (2010) "Descrição e utilização de alvos moleculares para identificação de *Leishmania* por PCR." *Boletim Epidemiológico Paulista* 7, 73.

Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31 (4): 359-77.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010; 10 (2): 238-45.

Furtado T. Leishmaniose. In: Machado Pinto JCA. *Doenças Infecciosas com manifestações dermatológicas.* Rio de Janeiro, Medsi. 1994. 319-28.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (5): 2294-7.

Gomes AH, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chiocola VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2008; 119 (3): 319-24.

Goncalves-de-Albuquerque SC, Pessoa ESR, de Moraes RC, Trajano-Silva LA, Regis-da-Silva CG, Brandao-Filho SP, et al. Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014; 20: 16.

Gontijo B, de Carvalho L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36 (1): 71-80.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8 (4): 419-33.

Graca GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107 (5): 664-74.

Grimaldi G, Jr., Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41 (6): 687-725.

Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6 (3): 230-50.

Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, et al. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (3): e980.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (7): 1989-95.

Hernandez C, Alvarez C, Gonzalez C, Ayala M, Leon C, Ramirez J. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors.* 2014; 7 (1): 501.

Jara M, Adaui V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (6): 1826-33.

Karagiannis-Voules DA, Scholte RG, Guimaraes LH, Utzinger J, Vounatsou P. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7 (5): e2213.

Lainson R, Shaw JJ. The leishmaniasis in biology and epidemiology. In: Evolution, classification and geographical distribution. London, Academic Press. 1987. 1: 1-120.

Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009; 51 (5): 247-53.

Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, et al. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 49 (3): 348-56.

Machado PR, Carvalho AM, Machado GU, Dantas ML, Arruda S. Development of cutaneous leishmaniasis after *leishmania* skin test. *Case Rep Med.* 2011; 2011: 631079.

Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician.* 2004; 69 (6): 1455-60.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (11): 5249-55.

McGhee RB, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev.* 1980; 44 (1): 140-73.

McMahon-Pratt D, Bennett E, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. *J Immunol.* 1982; 129 (3): 926-7.

Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzman-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2014; 2014: 607287.

Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31 (7): 1453-61.

Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology.* 2010; 137 (8): 1159-68.

Odiwuor S, Veland N, Maes I, Arevalo J, Dujardin JC, Van der Auwera G. Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms, and clinical implications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12 (8): 1994-2002.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, et al. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. *Parasit Vectors.* 2012; 5: 15.

Ramirez CA, Requena JM, Puerta CJ. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasit Vectors.* 2011; 4: 166.

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (1): 21-5.

Rey L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro (2002).

Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell Biochem.* 2014; 74: 1-42.

Rodriguez-Gonzalez I, Marin C, Longoni SS, Mateo H, Alunda JM, Minaya G, et al. Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 267 (1): 9-16.

Romero GA, Vinitius De Farias Guerra M, Gomes Paes M, de Oliveira Macedo V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis*. 2001; 32 (9): 1304-12.

Santos AL, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras Cienc*. 2006; 78 (4): 687-714.

Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013; 55 (6): 393-9.

Schonian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*. 2011; 138 (4): 405-25.

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003; 47 (1): 349-58.

Silva JG, Silva TM, Peloso Ede F, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Ariosa MC, et al. Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012; 45 (2): 257-9.

Silva LdAC, Alda Maria Leishmanioses. In: Ferreira AWM, Sandra do Lago. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes: Correlações Clínicas e Laboratoriais*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2013. 277-82.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem, Para State, Brazil, caused by *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002; 9 (1): 43-50.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006; 123 (3): 311-30.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2004; 38 (9): 1266-72.

Soto JM, Toledo JT, Gutierrez P, Arboleda M, Nicholls RS, Padilla JR, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 66 (2): 147-51.

Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schonian G, Toz SO, Jaffe CL, et al. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4 (1): e581.

Tsukayama P, Lucas C, Bacon DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2009; 39 (3): 355-62.

Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol*. 1991; 72 (2): 157-63.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol*. 1994; 41 (4): 324-30.

Uttinger J, Becker SL, Knopp S, Blum J, Neumayr AL, Keiser J, et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly*. 2012; 142: w13727.

Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill*. 2013; 18 (30): 20543.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania)* *amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 2004; 90 (1): 31-7.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia). *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (2): 601-6.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24 (9): 1688-94.

World Healthy Organization OOMdS. (2014). "Leishmaniasis." Retrieved 25/11/2014 2014.

Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, et al. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73 (2): 272-5.

Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5 (10): 781-91.

Zampieri RA 2013. Análise Comparativa de métodos moleculares de detecção e identificação de *Leishmania* spp. e desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico de leishmanioses. Mestrado, Universidade de São Paulo.