Ana Carolina Stocco de Lima

Caracterização biológica e molecular de cepas híbridas *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* /*Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi* isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar oriundos da região amazônica, Santarém, PA-Brasil

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett

Coorientadora: Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes

São Paulo

2016

Ana Carolina Stocco de Lima

Caracterização biológica e molecular de cepas híbridas *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* /*Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi* isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar oriundos da região amazônica, Santarém, PA-Brasil

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett

Coorientadora: Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Ana Carolina Stocco de
Caracterização biológica e molecular de cepas híbridas *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*/*Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi* isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar oriundos da região amazônica, Santarém, PA-Brasil / Ana Carolina Stocco de Lima. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.
Orientador: Carlos Eduardo Pereira Corbett.
Coorientadora: Cláudia Maria de Castro Gomes.

Descritores: 1.Leishmania 2.Leishmaniose cutânea 3.Ecossistema amazônico 4.Proteínas de choque térmico HSP70 5.Híbridos 6.Variação genética

USP/FM/DBD-339/16

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer ao Dr. Fernando Tobias Silveira, quem me cedeu as cepas e acreditou no meu trabalho e por estar sempre pronto a ajudar.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett pela oportunidade e por todo auxílio prestado ao longo desses anos.

À professora Dra. Lucile Maria Floeter-Winter por me conduzir nessa jornada, sempre muito generosa em compartilhar seu valioso conhecimento.

À Dra. Claudia Maria de Castro Gomes por todo suporte dado, tanto profissional, quanto pessoal e por depositar sua confiança em meu trabalho.

À Dra. Marcia Dalastra Laurenti pela receptividade e disposição de ajudar e participar do trabalho com valiosas sugestões.

À Dra. Aurea Favero Ferreira pela estimada ajuda e disposição em compartilhar sua experiência.

Ao Dr. Felipe Passero pela amizade e companheirismo na vida, no trabalho e até dentro d'água.

A todos os amigos e colegas do LIM-50: Edson, Lia, TB, Eduardo, Bruno, Jéssica, Gabi, Carmen, Julia, Gabi Rodrigues, Adriana e Nêgo,

Gostaria de agradecer especialmente a imensurável ajuda da amiga Thaíse Yumie Tomokane, que se empenhou sempre que eu precisei com muita dedicação e com carinho digno de uma irmã. Não tenho palavras para expressar minha gratidão a você "Thaisia". Sua amizade é muito valiosa para mim e o tempo só melhora isso.

Aos colegas do "Bat Lab": Ricardo, Carol, Ju, Sandra, Phanie e Rubia.

À Dra. Maria Carolina Q. E. Sabbaga pela disposição e atenção.

Aos colegas do Instituto Butantã Simone Calderano e Marcelo.

Ao Thiago, secretário do Programa de Patologia, por toda orientação prestada.

Aos amigos Tatiana Venâncio, Eliton Silva, Nina Best, Fernanda Bireta, Simone Elias, Vanusa, Lipe, Sol, Polyana, Bruna, Plinio, Dani Preta, Luciana Mendes, Patrícia Mendes Gabriela Idealli e Talita.

Em especial, gostaria de agradecer a Tereza Ruiz e André Bomfim pela amizade maravilhosa e muito estimada e também por me acolher.

Aos meus pais Méri, e Marcos pelo apoio incondicional. Aos meus irmãos Juliana e Vinícius, pela amizade e pelo aconchego. Aos meus cunhados Tereza e Arto por completarem a família de forma tão prazerosa e as minhas sobrinhas Mariana e Laura que fazem a minha vida mais feliz.

Aos Laboratórios de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-50) e de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Instituto de Biociências pelo suporte dado à execução do trabalho.

Às agências de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP (proc.12/08338-8) pela bolsa cedida e recursos disponibilizados a execução do trabalho.

Que é mesmo a minha neutralidade senão a maneira cômoda, talvez, mas hipócrita, de esconder minha opção ou meu medo de acusar a injustiça? "Lavar as mãos" em face da opressão é reforçar o poder do opressor, é optar por ele."

(Paulo Freire)

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese 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 símbolos
Lista de abreviaturas e siglas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Summary
1. INTRODUÇÃO 2
1.1. Gênero *Leishmania*: Aspectos gerais 4
1.2. Ciclo de vida 6
1.3. Reprodução no gênero *Leishmania* 7
1.4. Geração de diversidade e adaptação no gênero *Leishmania* 9
1.5. Troca genética em *Leishmania* sp.: o modelo de parasexualidade 12
1.6. Caracterização de organismos híbridos 13
1.6.1.Detecção de isolados híbridos envolvidos com casos de LTA na região amazônica do oeste do Pará 16
1.7. Justificativa 17
2. OBJETIVOS 19
2.1. Geral 19
2.2. Específicos 19
3. MATERIAL E MÉTODOS 21
3.1. Parasitas 21
3.2. Camundongos 22
3.3. Clonagem de *Leishmania* 23
3.3.1.Clonagem pelo cultivo em meio sólido 23
3.3.2.Clonagem por diluição seriada 24
3.4. Extração de DNA 24
3.5. Quantificação de ácidos nucleicos 25
3.6. Reação em cadeia da polimerase 25

3.7. Eletroforese em gel de agarose 26

3.8. Purificação de Produtos de PCR 27

3.9. Análise de polimorfismo pela clivagem de produto de *hsp-70c* PCR por enzima de restrição 27

3.9.1.Inferência da ploidia dos híbridos pela análise do polimorfismo de nucleotídeo único pela clivagem de sequências polimórficas amplificadas (SNP-CAPS) 28

*3.10.*Caracterização biológica dos parasitas híbridos *L*. (*Viannia*) spp. e comparação com as cepas parentais *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis* 28

3.10.1.Caracterização *in vitro* 29

3.10.1.1.Análise da curva de crescimento 29

3.10.1.2.Cálculo do tempo de duplicação e da taxa de crescimento celular. 29

3.10.2.Caracterização *in vivo* da infecção dos parasitas híbridos *L*. (*V*.) *shawi*/ *L*. (*V*.) *guyanensis* em camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c. 30

3.10.2.1.Infecção experimental 30

3.10.2.2.Evolução da lesão 31

3.10.2.3.Carga parasitária 31

3.10.3.Análise estatística dos dados 33

4. RESULTADOS 35

4.1. Clonagem de *Leishmania* (*Viannia*) spp. 35

4.2. Caracterização de isolados por PCR-RFLP de sequência da Proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) pelo uso da enzima *Hae*III 35

4.2.1. Caracterização de isolados por PCR-RFLP de sequência da Proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) pelo uso da enzima *Bst*UI 40

4.2.2.Análise de SNP-CAPS 41

4.3. Curva de crescimento 42

4.4. Avaliação da evolução da infecção 48

4.5. Carga parasitária 52

4.5.1.Carga parasitária na pele 52

4.5.2.Carga parasitária no linfonodo 53

4.5.3.Carga parasitária no baço 55

4.6. Análise histopatológica 56

4.6.1.Análise histopatológica na derme de camundongos infectados por *Leishmania* (*Viannia*) spp..... 57

4.6.2. Análise histopatológica no linfonodo de camundongos infectados por *Leishmania* (*Viannia*) spp..... 59

4.6.3. .....Análise histopatológica no baço de camundongos infectados por *Leishmania* (*Viannia*) spp..... 60

5. DISCUSSÃO 63

6. CONCLUSÕES 76

7. ANEXOS..... 79

7.1. Anexo A 79

7.2. Anexo B 80

7.3. Anexo C..... 81

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

Lista de Símbolos

%	por cento
×	vezes
×g	vezes a aceleração da gravidade
µg	microgramas
µg/mL	microgramas por mililitro
µL	microlitros
CO_2	gás carbônico
h	horas
kD	quilodaltons
M	mols por litro
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
ng	nanogramas
nm	nanômetros
ºC	graus Celsius
U	unidades
UI	unidades internacionais
V	volume
volts/cm	volts por centímetro

Lista de Abreviaturas e Siglas

6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase
ASAT	aspartato aminotransferase
CC	Concentração de células
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídio trifosfato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
HE	hematoxilina eosina
hsp70	proteína de choque térmico de 70 quilodaltons
L. (*L*.)	*Leishmania* (*Leishmania*)
L. (*V*.)	*Leishmania* (*Viannia*)
LD	desequilíbrio de ligação
LPG	lipofosfoglicanas
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MBA	Mesorregião do Baixo Amazonas
MPI	Manose fosfato isomerase
PA	Pará
PBS	solução tamponada de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	pós-infecção
PK	proteinase K
PP	padrão de tamanho molecular
RFLP	Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
SDS	dodecilsulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SN	sobrenadante
SNP-CAPS	clivagem de sequências polimórficas amplificadas
sp.	espécie
spp.	espécies
TAE	tampão de Tris-Acetato e EDTA

TAS	sequências associadas aos telômeros
TC	taxa de crescimento
TD	tempo de duplicação
TE	tampão de Tris-HCl e EDTA

Lista de Figuras

Figura 1 - Figuras ilustrativas das formas evolutivas de *Leishmania* sp. e suas organelas. **A:** Forma amastigota. **B:** Forma promastigota..... 5

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR hsp70 digeridos por HaeIII obtidos a partir de DNA dos clones de *Leishmania* (*Viannia*) spp. para a cepa M15987.. 36

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR hsp70 digeridos por HaeIII obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M19672..... 37

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR hsp70 digeridos por HaeIII obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M19676..... 37

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR hsp70 digeridos por HaeIII obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M15983..... 38

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR hsp70 digeridos por HaeIII obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M15984..... 38

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR hsp70 digeridos por HaeIII obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M15988..... 39

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp*70 digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *L.* (*Viannia*) spp. da cepa M19697**.**..... 39

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Bst*UI obtidos a partir de DNA dos isolados de *L*. (*Viannia*) spp. 41

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de SNP-CAPS *hsp70* PCR-RFLP (*Hae*III). Todas as linhas contêm a digestão de 200 ng de produto de PCR purificado. Linhas 1 a 7: *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*/ *L*. (*V*.) *shawi* M15983, M15984, M19887, M15988, M19672 e M19676 e M19697 42

Figura 11 - Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) spp. em meio de cultura Schneider, partindo de 10^4 células/mL, durante a 4ª passagem pós isolamento. 43

Figura 12 - Curva de crescimento de formas promastigotas de Leishmania (Viannia) spp. em meio de cultura Schneider, partindo de 10^4 células/mL, durante a 12ª passagem pós isolamento. 46

Figura 13 - Evolução da lesão em pata de camundongos BALB/c causada por *L.* (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase estacionária no coxim plantar. As medidas foram realizadas semanalmente até 49 dias. 50

Figura 14 - Lesão de camundongos BALB/c aos 21 e 49 dias PI.. 51

Figura 15 - Carga parasitária em pele de camundongos BALB/c causada pela infecção por *L.* (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase estacionária no coxim plantar. A quantificação foi realizada semanalmente até 28 dias PI.. 53

Figura 16 - Carga parasitária em linfonodo de camundongos BALB/c causada pela infecção por *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase

estacionária no coxim plantar. A quantificação foi realizada semanalmente até 28 dias PI. 54

Figura 17 - Carga parasita em baço de camundongos BALB/c causada pela infecção por *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase estacionária no coxim plantar. A quantificação foi realizada semanalmente até 28 dias PI.. 56

Figura 18 - Corte histológico de pele no ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c. (A) Pele de animal controle (B) Derme de animais infectados pela cepa híbrida selvagem M19672. (C) *L*. (*V*.) *shawi*. (M8408). (D). *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147). 59

Figura 19 - Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados com a cepa híbrida selvagem M19672. **(A)** **(B)** com *L*. (*V*.) *shawi*. (M8408). e **(C)** com *L*. (*V*.) *guyanensis*..... 60

Figura 20 - Corte histológico de baço de camundongos BALB/c. (**A)** baço de animal controle **(B)** baço de animais infectados pela cepa híbrida selvagem M19672., **(C)** *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e (**D)** *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147). 61

Lista de tabelas

Tabela 1 - Cepas de *Leishmania* sp. utilizadas no estudo 22

Tabela 2 - Oligonucleotídeos e condições utilizadas nas reações de PCR 26

Tabela 3 - Valores de tempo de duplicação, taxa de crescimento e concentração celular em 4ª e 12ª passagem..... 44

Tabela 4 - Diferença estatística entre cepas híbridas durante a curva de crescimento em 4ª passagem. 46

Tabela 5 - Diferença estatística entre cepas híbridas durante a curva de crescimento em 12ª passagem..... 47

Tabela 6 - Análise semi-quantitativa das alterações histopatológicas do ponto de inoculação de cepas de *Leishmania* sp. na derme do coxim plantar traseiro de camundongos BALB/c. 57

Resumo

O conhecimento a respeito de mecanismos de reprodução e geração de diversidade genética de organismos do gênero *Leishmania* vem sendo alterado com o advento de novas tecnologias. Estudos de laboratório demonstraram ocorrência de reprodução sexuada experimentalmente em organismos do gênero *Leishmania.* Relatos na literatura mostram a ocorrência de híbridos no ambiente natural, associada a casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA). A partir da caracterização fenotípica realizada utilizando anticorpos monoclonais e eletroforese de isoenzimas em linhagens isoladas de pacientes com LTA na região Amazônica do Brasil, sete isolados (M15983, M15984, M15987, M15988, M19672, M19676 e M19697) apresentaram um padrão intermediário entre as espécies *L. (V.) shawi shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis*. O presente estudo visou realizar a confirmação da identidade híbrida desses parasitas através da clonagem dos isolados, seguida da análise do polimorfismo pela clivagem do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR RFLP) tendo como alvo a enzima de choque térmico de 70 quilodaltons (*hsp*70). O *hsp*70 PCR RFLP também foi utilizado para análise comparativa da intensidade dos produtos de digestão, para estimar a ploidia dos híbridos e a proporção da herança dos alelos de *hsp*70. Foi realizada ainda, avaliação do comportamento biológico *in vitro* e experimental *in vivo* desses parasitas. A curva de crescimento foi realizada na 4° e 12° passagem após isolamento do parasita. Infecções experimentais de BALB/c foram realizadas para avaliação da evolução da infecção causada pelo isolado híbrido selvagem M19672 e sua comparação com as cepas parentais *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) *s. shawi*. Foi determinada a carga parasitaria em pele, linfonodo e baço dos animais infectados e análise histopatológica das lesões. Os resultados obtidos a partir da clonagem dos isolados demonstraram que se tratavam de populações homogêneas de parasitas. Três isolados apresentaram padrão heterozigoto de *L. (V.) guyanensis/L. (V.) s. shawi* e quatro isolados apresentaram padrão homozigoto, apresentando somente os alelos de *L*. (*V*.) *s. shawi.* O ensaio de clivagem de sequências polimórficas amplificadas (SNP-CAPS) mostrou que os homozigotos apresentaram o mesmo número de cópias de *hsp*70 de *L*. (*V*.) *s. shawi,* enquanto

que nos heterozigotos os alelos de *L*. (*V*.) *guyanensis* são mais representativos. Os parasitas híbridos apresentaram uma maior plasticidade fenotípica no crescimento *in vitro*. A infeção de BALB/c pelos parasitas híbridos apresentou uma evolução rápida tendo seu maior pico entre 14 e 28 dias pós-infecção, com regressão posterior da lesão. Esse período foi acompanhado da maior carga parasitária na pele e linfonodo. A infecção causada pelas cepas parentais mostrou aumento progressivo da lesão a partir do 21° dia de infecção para *L*. (*V*.) *guyanensis* e 35° dia para *L. (V.) s.shawi*. As alterações histopatológicas da lesão causada pelo híbrido apresentaram um padrão intermediário entre as de *L*. (*V*.) s. *shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis*, guardando, no entanto, mais características desta última. Nossos achados confirmam que as cepas analisadas são híbridas entre *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) s. shawi* da região do Baixo Amazonas, estado do Pará, área com alta ocorrência de casos de LTA na Brasil e grande diversidade de espécies do parasita, vetores e reservatórios.

Descritores: *Leishmania*, Leishmaniose cutânea, Ecossistema Amazônico, Proteínas de choque térmico HSP70, Híbridos, variação genética.

Abstract

Knowledge about the mechanisms of reproduction and generation of genetic diversity of the genus *Leishmania* organisms has been changed with the advent of new technologies for it studies. Laboratory researches have shown the occurrence of experimentally sexual reproduction in the genus *Leishmania*. Reports in the literature shows the occurrence of hybrids in the natural environment, associated with cases of american cutaneous leishmaniasis (ACL). From the phenotypic characterization performed using monoclonal antibodies and isozymes in strains isolated from patients with ACL in the Amazon region of Brazil, seven isolates (M15983, M15984, M15987, M15988, M19672, M19676 and M19697) showed an intermediate pattern between species *L*. (*V*.) *shawi shawi* and *L*. (*V*.) *guyanensis*. This study aimed to perform the confirmation of the hybrid identity of these parasites by performing cloning of the isolated, followed by analysis of polymorphism by cleavage of the polymerase chain reaction product (PCR RFLP) targeting heat shock enzyme 70 kilodaltons (*hsp*70). The *hsp*70 PCR RFLP was also used for comparative analysis of the intensity of the digestion products to estimate the ploidy of the hybrids and the proportion of the inheritance of *hsp*70 alleles. It was also observed in this study the biological *in vitro* behavior of these parasites. The growth curve *in vitro* was held at 4° and 12° passage after the isolation of mammalian host. Experimental infections of BALB /c mice were carried out to evaluate the evolution of the infection caused by the hybrid wild strain M19672 compared to the parental strains *L*. (*V*.) *guyanensis* and *L*. (*V*.) *s. shawi*. The parasitic load was determined on the skin, lymph nodes and spleen of infected animals and histopathology of the lesions. The results from the cloning of the isolates showed that these are homogeneous populations of parasites. Three isolates presented heterozygous *L*.(*V.*) *guyanensis*/ *L*.(*V*.) *s. shawi* pattern and four presented homozygous pattern with only the *L*.(*V*.) *s. shawi* alleles. The cleavage amplified polymorphic sequences assay (SNP-CAPS) showed that the homozygous had the same number of copies of *hsp*70 *L*. (*V*.) *s. shawi*, whereas in the heterozygous alleles *L*. (*V*.) *guyanensis* are more representative. Hybrid parasites demonstrated a higher phenotypic plasticity growth *in vitro*. BALB /c infection by M19762 hybrids showed a rapid evolution with a peak between 14 and 28 days post-infection, with subsequent lesion

regression. The period of greatest development of the lesion was accompanied by higher parasite burden in the skin and lymph nodes. The infection caused by parental strains showed a progressive increase in the lesion from the 21th day of infection for *L. (V.) guyanensis*, and day 35 PI for *L. (V.) s. shawi* The alteration in the histopathological lesions caused by the hybrid strain showed an intermediate pattern between those of *L. (V.) s. shawi* and *L. (V.) guyanensis*, keeping, however, more characteristics of the latter. Our findings confirm that the strains analyzed are true hybrids between *L*. (*V*.) *guyanensis* and *L*. (*V*.) *s*. shawi from Amazon region, Pará state, an area with high occurrence of ACL in Brazil and diversity of parasite species, vectors and reservoirs

Descriptors: *Leishmania,* Cutaneous Leishmaniasis, Amazonian ecosystem, Heat-shock proteins HSP70, Hybrids, genetic variation.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença espectral que acomete pele e mucosas e é causada por parasitas flagelados do gênero *Leishmania*. As formas clínicas presentes no espectro da LTA variam entre lesão única com cura espontânea, passando por lesões múltiplas e de comprometimento mucoso (1).

No Brasil existem sete espécies causadoras de LTA. Seis destas espécies pertencem ao subgênero *Leishmania (Viannia) spp.*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, e *L. (V.) naiffi.* A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* compreende a espécie pertencente ao subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) spp. (2).

A LTA apresenta-se em franca expansão geográfica no território nacional. Na década de 80 foram registrados casos em 19 unidades federadas e em 2003 todos os Estados apresentaram autoctonia. As regiões Norte e Nordeste são responsáveis por cerca de 80% da casuística nacional (Brasil, 2006). Nessas regiões, deve-se ressaltar a importância dos ambientes de bioma Amazônico na epidemiologia das Leishmanioses. A grande diversidade de espécies característica da Floresta Amazônica ocorre também para vetores, reservatórios e espécies de *Leishmania*. O resultado de tamanha diversidade é uma complexa interação entre espécies, resultando em sobreposição de nichos e também dificultando o estudo da ecologia e etiologia da doença (3,4).

Segundo dados do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, de 2009, no período de 2004 a 2008, foram registrados

21.213 casos de LTA no Estado do Pará, o que corresponde a 41% dos casos registrados na Região Norte e 18% no país (5). Esses dados apontam o Pará como o Estado com maior registro de casos. O relatório gerado pelo Ministério aponta ainda que, em 2008 foram confirmados 3.685 casos novos, distribuídos em 86% dos municípios. Vale ressaltar que as 7 espécies dermotrópicas presentes no Brasil ocorrem na região Amazônica, todas com registro no Estado do Pará (6,7).

O município de Santarém é o mais importante do Estado do Pará, depois da capital Belém. Santarém fica em uma região denominada Mesorregião do Baixo Amazonas (MBA). Essa mesorregião é composta por 14 municípios, que apresentam características econômicas, sociais e políticas distintas das outras mesorregiões do Estado (8). A mesorregião do baixo Amazonas inclui em seu território três microrregiões. A microrregião de Santarém alberga oito municípios e representa a segunda microrregião do estado do Pará com o maior número de casos de LTA (9).

Estudo realizado na região de Santarém visando a caracterização das espécies de *Leishmania* isoladas de pacientes com LTA, identificou cinco das sete espécies causadoras da doença no Brasil, além de duas diferentes subpopulações de *L*. *(V.) shawi* classificadas como *L*. (*V*.) *shawi shawi* e *L*. (*V*.) *shawi santarensis*. Foram registradas ainda, sete cepas fenotipicamente identificadas como possíveis híbridas entre *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) *shawi shawi* (10).

1.1. Gênero *Leishmania*: Aspectos gerais

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) pertence à classe *Kinetoplastida,* caracterizada principalmente pela presença de uma mitocôndria única, que apresenta uma região rica em DNA chamada de cinetoplasto (11). O gênero *Leishmania* é composto por três subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*) spp., *Leishmania* (*Viannia*) spp. e *Leishmania* (*Sauroleishmania*), sendo o ultimo associado a infecção de lagartos. Recentemente, um novo subgênero foi descrito dentro do gênero *Leishmania* sp., denominado *Leishmania* (*Mundinia*), que abriga parasitas transmitidos por dípteros da família Ceratopogonidae (12).

Os hospedeiros vertebrados dos subgêneros *L.*(*Leishmania*) spp. e *L.*(*Viannia*) spp. são mamíferos pertencentes a diferentes classes como, por exemplo, edentados, marsupiais, roedores e canídeos (13). O homem entra no ciclo, inicialmente como hospedeiro acidental, porém, atualmente, é presença constante no ciclo dos parasitas, que deixou de ocorrer exclusivamente em regiões silvestres e se estabeleceu em grandes centros urbanos (14,15).

No hospedeiro mamífero, o parasita apresenta-se na forma amastigota (Figura 1A). Essa forma é intracelular obrigatória, arredondada, imóvel, tendo seu flagelo restrito à uma bolsa flagelar (16). A forma amastigota habita principalmente macrófagos, mas pode também infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário e células dendríticas (17,18).

Os hospedeiros invertebrados são fêmeas de insetos flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia,* sendo que, somente o segundo ocorre nas Américas (19). No hospedeiro invertebrado, os parasitas estão presentes na

forma promastigota (Figura 1B), flagelada, de vida livre e que habita o trato digestório do inseto durante as etapas iniciais da infecção. Depois de alguns dias, migra para o aparelho bucal ou probóscide. As regiões do intestino colonizadas pelos organismos do gênero *Leishmania* variam os dois subgêneros. Devido a essa variação no comportamento de colonização do trato digestório do inseto, Lainson e Shaw (1987), realizaram a subdivisão dos subgêneros *L*. *(Leishmania*) spp. e *L.* (*Viannia*) *spp..* As espécies classificadas no subgênero *Viannia* colonizam todo o intestino do flebotomíneo, já as espécies classificadas como pertencentes ao subgênero *Leishmania*, colonizam somente as porções anterior e média do intestino do inseto (20). É válido ressaltar aqui que as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* estão restritas às Américas (21).

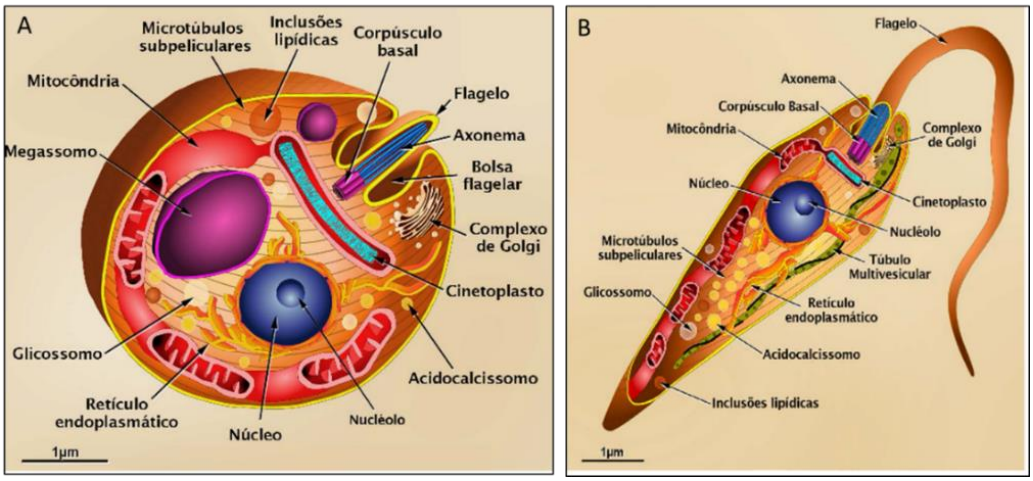

Figura 1 - Figuras ilustrativas das formas evolutivas de *Leishmania* sp. e suas organelas. **A:** Forma amastigota. **B:** Forma promastigota. **Fonte:** Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania* (22).

1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida dos parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* ocorre quando ao realizar o repasto sanguíneo em mamífero infectado, a fêmea do inseto flebotomíneo ingere junto com o sangue, macrófagos contendo formas amastigotas do parasita. No intestino do inseto, as formas amastigotas sofrem diferenciação em formas promastigota. Durante a fase promastigota os parasitas passam por diferentes estágios, que são determinados pelo tamanho e formato da célula, motilidade, região em que são encontradas, capacidade de divisão celular e moléculas da superfície. Os principais estágios são: promastigota procíclica, nectomonas, haptomonas e metacíclicas (23). As formas metacíclicas não sofrem divisão celular e migram para a probóscide do inseto. Lá se acumulam, causando obstrução do aparelho bucal. Ao realizar o novo repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo regurgita os parasitas no local da picada para desobstruir sua probóscide e assim, alimentar-se do sangue do hospedeiro mamífero. Ao adentrar no hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas entram em contato com as proteínas do sistema complemento, que representam a primeira barreira do sistema imunológico. Muitas formas metacíclicas são mortas pelo complemento, porém muitas outras conseguem escapar e permanecem vivas. Essas células vão entrar em contato com a segunda barreira do sistema imune inato que consiste de células que realizam fagocitose, como neutrófilos, macrófagos, dentre outras. Ao serem fagocitadas pelos macrófagos, as formas promastigotas diferenciam–se em formas amastigotas, que são resistentes ao ambiente ácido do fagolisossomo, compartimento formado a partir da fusão do fagossomo com os lisossomos. Dentro do fagolisossomo as formas amastigotas

sofrem consecutivas divisões binárias, que culminam no rompimento do macrófago e na liberação dessas no meio externo. As formas liberadas podem ser mortas pelos mecanismos de defesa do sistema imune ou podem ser fagocitadas por novos macrófagos, expandindo assim a infecção. Depois de estabelecida a infecção, ocorre a disseminação por via linfática e/ ou sanguínea, facilitando assim, a infecção de novos flebótomos durante a hematofagia (24,25).

1.3. Reprodução no gênero *Leishmania*.

O modo de reprodução no gênero *Leishmania* se dá por divisão binária, onde uma célula sofre divisão mitótica e origina duas células filhas idênticas à célula mãe. Estudos de estrutura populacional de *Leishmania* classificam o gênero como estritamente clonal, com base na heterozigosidade fixa, no desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e no forte desequilíbrio de ligação (LD) entre alelos (26,27), parâmetros muito utilizados em estudos populacionais.

No entanto, há tempos existem relatos de organismos híbridos na literatura. Inicialmente, os híbridos foram reportados a partir de características fenotípicas, através da técnica de eletroforese de isoenzimas (28,29). Posteriormente, com o aprimoramento das técnicas moleculares, as pesquisas começaram a utilizar sequências de DNA para demonstrar a hibridização entre organismos do gênero (30,31).

O surgimento de ferramentas mais elaboradas no estudo genético dos organismos, como a produção de transgênicos, técnicas de sequenciamento de DNA mais rápidas e abrangentes e ferramentas de bioinformática, têm permitido um avanço significativo no entendimento dos mecanismos reprodutivos do

gênero *Leishmania* (31–35). Análises genéticas foram recentemente realizadas em linhagens híbridas de *Leishmania* sp. obtidas em laboratório e no ambiente natural (31,36,37). Esses trabalhos demonstraram que os híbridos resultam de um evento inicial de reprodução sexuada seguido de novos eventos de endogamia restritos à prole híbrida (36). A prole inicial recebe no mínimo um lote de cromossomo de cada parental, sendo inicialmente heterozigota (31,36,37). Os sucessivos eventos de endogamia resultam em blocos de regiões recombinantes nos cromossomos que varia entre os indivíduos da prole. Ao final surgem genótipos híbridos diversos, onde os indivíduos apresentam de forma distinta, blocos genômicos herdados de cada um dos parentais e blocos onde ocorreu a recombinação (36). O padrão de herança mitocondrial é sempre uniparental (31,36–38).

O ambiente do intestino do inseto parece ser determinante para que eventos de hibridização ocorram e embora já se tenha proposto tais eventos na forma amastigota, não existe relatos de sucesso em tentativas experimentais (31,33,37). Estudo realizado recentemente, visou avaliar a relação dos diferentes estágios da fase promastigota com o surgimento de híbridos no inseto vetor. Os autores observaram que a fase nectomonas parece estar mais envolvida com o surgimento de híbridos (37). Essa fase está presente na região abdominal e está relacionada com a migração e colonização da cavidade torácica do intestino (37,38).

Estudos têm demonstrado ainda que o gênero *Leishmania* não parece apresentar barreiras para o cruzamento. Existem relatos de cruzamento entre organismos geneticamente idênticos, entre cepas da mesma espécie de

diferentes regiões geográficas e também entre espécies distintas, por vezes filogeneticamente distantes (32,37–40).

1.4. Geração de diversidade e adaptação no gênero *Leishmania*

Durante o ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*, mudanças drásticas de ambiente e morfologia ocorrem no trânsito entre os diferentes hospedeiros. Tais mudanças vêm associadas a mecanismos refinados de adaptação (41,42).

A reprodução representa o processo biológico que mais está associado à estrutura genética de uma população, governando assim as frequências alélicas, produção de genótipos e a interação com o ambiente (43,44). A reprodução sexuada é um eficiente processo na geração de diversidade. A ocorrência de eventos sexuais no gênero *Leishmania* já foi bem demonstrada (31,37), mas sua frequência e contribuição para a estrutura populacional do gênero, ainda é alvo de debate (39,45–47).

Os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* contam com uma gama de mecanismos não ligados ao sexo para a geração de diversidade e adaptação, uma vez que a grande quantidade de variação genética encontrada em estudos populacionais não pode ser explicada somente por mutações pontuais (48).

No genoma de *Leishmania* são comumente encontradas sequências de DNA repetitivas dispostas em série nos cromossomos (49). Tal arranjo ocorre para sequências codificadoras de produtos funcionais essenciais ao funcionamento da célula ou à relação entre parasita-hospedeiro, bem como para sequências não codificantes.

As repetições podem ser originadas através de duplicação gênica, que é apontada como importante fonte de variação em muitos organismos (50). Regiões ricas em repetições podem sofrer rearranjos, recombinações, deleções e interferir na expressão gênica, auxiliando a reestruturação do genoma e manifestações fenotípicas (51–53). Sequências em elevado número de cópias podem apresentar certa flexibilidade para que ocorram mutações com baixo risco, possibilitando assim, o surgimento de diversidade (50).

As regiões sub-teloméricas são apontadas como possível região tampão no acúmulo de mutações. A caracterização das sequências associadas aos telômeros (TAS) fornece indícios de recombinação e estão associadas ao polimorfismo cromossômico, muito comum no gênero *Leishmania* (51,54,55). Podemos encontrar na região sub-telomérica, sequências que codificam enzimas envolvidas na modificação da estrutura dos lipofosfoglicanos (LPG) da membrana de promastigotas, produzindo assim, variação nestas moléculas, que são importantes para a fixação do parasita ao epitélio intestinal do vetor (56). Monte-Neto *et.al.* (2015) detectaram em cepas de *L.* (*V.*) *guyanensis* resistentes ao antimonial pentavalente, a deleção da região sub-telomérica onde localizava-se a sequência codificadora para a proteína aquagliceroporina, envolvida na entrada do fármaco na célula (57). Posteriormente, foi demonstrado que a reposição das sequências deletadas via transfecção, reverteu a resistência (58).

Alguns autores demonstraram que *Leishmania* apresenta uma maquinaria enzimática que possibilita a recombinação entre cromossomos homólogos que podem ocorrer em regiões repetitivas, sendo esta, outra forma de gerar diversidade (48). Ubeda *et.al.* (2008) relataram rearranjos em locais de sequências repetidas de genes envolvidos na resistência a fármacos (59).

Outro mecanismo amplamente descrito no gênero *Leishmania* como fonte de variação é o fenômeno de amplificação gênica. Esse mecanismo está associado ao aumento da expressão gênica. A amplificação gênica pode ser decorrente da duplicação de sequências em regiões cromossômicas, da amplificação de segmentos cromossômicos ("amplicons"), do surgimento de minicromossomos ou ainda da alteração na ploidia (50,58,60). Esse fenômeno confere expressões fenotípicas diversas, são rápidos, estão intimamente relacionados com respostas adaptativas, como por exemplo, na resistência a fármacos (53,61). Um exemplo de adaptação mediada pela amplificação gênica foi a verificação do aumento no número de transcritos da enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) em cepas de *L*. (*L*.) *amazonensis* e *L*. (*L*.) *chagasi* resistentes ao óxido nítrico (62).

Estudos sobre a estrutura genômica do gênero *Leishmania* demonstram elevado grau de sintenia e poucos genes espécie-específicos. A heterogeneidade encontrada nesses parasitas está comumente associada a poucos genes espécie-específicos, ao diferente número de cópias de genes e cromossomos, bem como, a expressão gênica diferencial entre grupos de organismos (52,57,58).

A aneuploidia é um fenômeno frequentemente associado a efeitos deletérios em muitos organismos, porém, tem sido considerada regra para o gênero *Leishmania* (63,64). O cromossomo 31 de *L*. (*L*.) *major*, encontra-se com frequência em seu estado poliploide (31,58,65). O estado tetraploide do cromossomo 30 parece ser importante para a forma amastigota intracelular de *L*. (*L*.) *mexicana* (66) .

A aneuploidia no gênero *Leishmania* foi bem investigada e descrita por Sterkers e colaboradores (63,67). Através da utilização da técnica de hibridização *in situ,* os autores determinaram a ploidia individual de células em uma população de *L*. (*L.*) *major* e relataram que para cada cromossomo analisado, no mínimo, dois estados diferentes de ploidia (monossômico, dissômico ou trissômico) foram observados. Os autores descreveram assim, o fenômeno de aneuploidia em mosaico (63,64). Ao investigar os mecanismos envolvidos na produção de tal característica, os autores associaram a um defeito na regulação da replicação dos cromossomos que leva a uma sub ou super replicação, associada à segregação assimétrica dos cromossomos entre as células filhas.

A aneuploidia em mosaico consiste de um mecanismo que produz diversidade genotípica na população e que, apesar de resultar em perda de heterozigosidade, não afeta heterogeneidade genética da mesma.

1.5. Troca genética em *Leishmania* sp.: o modelo de parasexualidade

A teoria clonal tem como alicerce, critérios comumente utilizados em estudos populacionais, como o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o LD (43,68). Esses critérios são muito úteis na caracterização genética de organismos que apresentam sexualidade envolvendo formação de gametas via meiose e recombinação. As estimativas de ocorrência de meiose no gênero *Leishmania* correspondem a cerca de 1.3×10^{-5} e 2.5×10^{-5} células meióticas por célula mitótica (31,36).

Muitas evidências sustentam a possibilidade dos mecanismos envolvendo troca de material genético no gênero *Leishmania* não seguir o modelo dos eucariontes superiores (46). A aneuploidia em mosaico, amplamente difundida no gênero é incompatível com a formação de gametas (63,69).

O modelo de parasexualidade tem sido apontado como a explicação mais parcimoniosa para troca de material genético no gênero *Leishmania* (33,46,67,70). O modelo proposto por Sterkers *et.al.* (2014) propõe a associação da parasexualidade ao da aneuploidia em mosaico, que resulta no aumento de heterozigose na população (67). A reprodução consiste da fusão de duas células parentais, seguida de cariogamia, da ocorrência de um “embaralhamento” cromossômico e por último de um evento de divisão que resulta na redução da ploidia, classificado como uma mitose reducional. Esse mecanismo associado à aneuploidia em mosaico resulta em células filhas herdando diferente conteúdo genético e genômico, devido à distribuição assimétrica de cromossomos durante a divisão celular.

1.6. Caracterização de organismos híbridos

Relatos de híbridos ocorrendo em ambientes naturais e envolvidos com casos de leishmaniose são recorrentes em todo mundo, em alguns casos associados a formas severas da doença como a forma mucosa no Peru (3,71,72).

A ocorrência desses organismos híbridos tem sido diretamente relacionada a áreas de simpatria de espécies que possibilitam a interação de

diferentes genótipos em vetores co-infectados facilitando a interação entre os mesmos.

A caracterização desses organismos híbridos se faz necessária para o melhor entendimento de aspectos da biologia e evolução desses parasitas, que impactam a vida de milhares de pessoas por todo o mundo, bem como para a compreensão básica da evolução dos eucariontes.

A caracterização de organismos do gênero *Leishmania* deve ser feita com base em aspectos biológicos e genéticos dos mesmos, investigando o comportamento do parasita em seus hospedeiros, tanto vertebrado quanto invertebrado. Isso inclui diversos aspectos como carga parasitária, infectividade, tropismo por determinados órgãos ou tecidos, tempo de crescimento, interação com sistema imune do hospedeiro, dentre outros (73,74).

Os métodos considerados padrão ouro na identificação de organismos do gênero *Leishmania* são eletroforese de isoenzimas e anticorpos monoclonais. A eletroforese de isoenzimas baseia-se na migração diferencial das isoenzimas no gel durante a eletroforese. A variação no padrão de corrida de determinada isoenzima, reflete variação na sua sequência de nucleotídeos, que resulta em diferentes cargas da proteína. Esse método é bastante utilizado em estudos populacionais e identificação no gênero *Leishmania*, *que* conta com um grupo de isoensimas bem padronizadas para tais análises (75). O uso de anticorpos monoclonais consiste de outro método condiderado padrão ouro na identificação de *Leishmania* e a técnica já demonstrou ser segura na tipagem de parasitas (76).

Importante salientar que ambos os métodos padrão ouro, necessitam do isolamento dos parasitas em meio de cultura e baseiam-se em caracteres fenotípicos.

A caracterização molecular de organismos do gênero *Leishmania*, bem como a de outros organismos, é feita pelo uso de sequências de DNA que possibilite detectar diferenças ou semelhanças entre organismos, buscando peculiaridades que pertençam a uma determinada população, a uma determinada espécie ou ao gênero.

As sequências codificadoras da proteína de choque térmico de 70kD (*hsp*70) estão presentes de cinco a seis cópias, dispostas em arranjo “head-to-tail” (77,78). Essas sequencias têm se mostrado um alvo eficiente na diferenciação de muitas espécies de *Leishmania*, dentre elas, das espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*. Sua aplicação como ferramenta diagnóstica e de estudos filogenéticos tem alcançado resultados tão satisfatórios, que alguns autores já sugerem que essa ferramenta seja considerada um padrão ouro para a identificação molecular de espécies do gênero *Leishmania* (77,79–82).

O uso de ferramentas de alta especificidade para a realização de estudos taxonômicos pode auxiliar no esclarecimento da identidade de cepas com perfis indefinidos e causadoras de leishmaniose.

1.6.1. Detecção de isolados híbridos envolvidos com casos de LTA na região amazônica do oeste do Pará.

Estudo realizado visando a identificação de espécies causadoras de LTA na região Oeste do Pará, detectou a presença de cepas possivelmente híbridas entre *L*.(*V.*) *guyanensis* e *L*.(*V*.) *shawi* oriundas da região de Santarém (10). O estudo visava inicialmente identificar a etiologia da LTA nesta região, que está dentre as mais importantes do país com relação ao número de casos e diversidade dos parasitas, e que apesar de sua importância, pouco se conhecia sobre a etiologia da LTA nesta área.

A partir do estudo, sete isolados apresentaram um perfil distinto aos das cepas referência quando submetidos à analises de eletroforese de isoenzimas e anticorpos monoclonais.

Cinco isolados (M19672, M19676, M15987, M19697 e 15983) apresentaram perfil de três bandas para as isoenzimas diméricas 6-fosfogliconato desidrogenase (6PGDH) e Aspartato transaminase (ASAT), cujo perfil era intermediário entre *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) *shawi.* Foram observados os perfis das enzimas glicose-6 fostato desidrogenase (G6PD) e manose-6 fosfato isomerase (MPI) referentes a *L*. (*V*.) *guyanensis* e da enzima fosfoglucomutase (PGM) referente a *L*. (*V*.) *shawi*.

Dois outros isolados (M15984 e M15988) apresentaram os perfis de 6PGDH e ASAT intermediários como as demais e as outras isoenzimas apresentaram o perfil correspondente a *L*. (*V*.) *guyanensis*.

Com relação aos anticorpos monoclonais, os sete isolados apresentaram alto grau de variabilidade de epítopos.

1.7. Justificativa

As cepas caracterizadas no presente estudo foram isoladas de pacientes diagnosticados com LTA. Deste modo, a identificação das mesmas se faz necessária para um melhor entendimento da epidemiologia da LTA na região amazônica, onde existe uma grande diversidade de espécies de *Leishmania*, vetores e reservatórios da doença e ainda, pela complexidade epidemiológica dessa importante endemia brasileira.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar as cepas de *Leishmania* (*Viannia*) *spp.* isoladas de pacientes com LTA na região Amazônica-Pará, com base em características biológicas e moleculares do parasita.

2.2. Específicos

- Verificar por meio de clonagem a homogeneidade dos parasitas isolados de pacientes com LTA
- Confirmar a identidade híbrida dos parasitas pelo uso de ferramentas moleculares tendo como alvo sequências de *hsp*70
- Avaliar aspectos do comportamento *in vitro* e *in vivo* do parasita:
    - ✓ *in vitro*:
        - Comparar a curva de crescimento de formas promastigotas dos parasitas híbridos e suas espécies parentais
    - ✓ *in vivo:*
        - Avaliar a evolução da infecção causada pela cepa híbrida em camundongos BALB/c
        - Determinar a carga parasitária em pele, linfonodo e baço dos animais infectados.
        - Analisar as alterações histopatológicas em lesão de pele, linfonodo e baço

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parasitas

Todas as cepas analisadas foram oriundas do Biobanco de Parasitas do Centro de Referência em Leishmanioses, Instituto Evandro Chagas, Belém– PA.

As cepas referência estão especificadas na Tabela 1: sendo 4 cepas de *L. (V.) shawi*, 4 cepas de *L. (V.) guyanensis*, 1 de *L*. (*V*.) *braziliensis,* 2 cepas de *Leishmania* (*V.*) *lainsoni* e 2 cepas de *L. (V.) naiffi*. As sete cepas fenotipicamente híbridas analisadas neste estudo foram identificadas recebendo as denominações: M15983, M15984, M15987, M15988, M19672, M19676 e M19697.

Tabela 1 - Cepas de *Leishmania* spp. utilizadas no estudo

Espécies de *Leishmania* sp.	**Cepas referência**
Leishmania (*Leishmania*) *amazonensis*	MHOM/BR/1973/M2269
Leishmania (*Viannia*) *braziliensis*	MHOM/BR/1995/M15280
Leishmania (*Viannia*) *guyanensis*	MHOM/BR/1975/M4147
Leishmania (*Viannia*) *guyanensis*	MHOM/BR/1990/M13245
Leishmania (*Viannia*) *guyanensis*	MHOM/BR/1997/M16174
Leishmania (*Viannia*) *guyanensis*	MHOM/BR/2001/M19869
Leishmania (*Viannia*) *lainsoni*	MHOM/BR/1981/M6426
Leishmania (*Viannia*) *lainsoni*	MHOM/BR/1993/M14263
Leishmania (*Viannia*) *naiffi*	MHOM/BR/1979/M5533
Leishmania (*Viannia*) *naiffi*	MHOM/BR/1993/M14229
Leishmania (*Viannia*) *shawi*	MHOM/BR/1984/M8408
Leishmania (*Viannia*) *shawi*	MHOM/BR/1996/M15982
Leishmania (*Viannia*) *shawi*	MHOM/BR/1996/M15985
Leishmania (*Viannia*) *shawi*	MHOM/BR/2001/M19664
***Leishmania* (*Viannia*) spp.**	**Cepas caracterizadas no estudo**
Leishmania (*Viannia*) spp.	MHOM/BR/1996/M15983
Leishmania (*Viannia*) spp.	MHOM/BR/1996/M15984
Leishmania (*Viannia*) spp.	MHOM/BR/1996/M15987
Leishmania (*Viannia*) spp.	MHOM/BR/1996/M15988
Leishmania (*Viannia*) spp.	MHOM/BR/2001/M19672
Leishmania (*Viannia*) spp.	MHOM/BR/2001/M19676
Leishmania (*Viannia*) spp.	MHOM/BR/2001/M19697

3.2. Camundongos

Para infecção experimental, foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em ambiente com ventilação, ração e água à vontade. Os experimentos foram realizados em conformidade com a Lei n°11.794 de 08/03/2008 e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP (Protocolo 048/12 - Anexo A e B).

3.3. Clonagem de *Leishmania*

A obtenção de clones de *Leishmania* deu-se a partir do cultivo das formas promastigotas em placas contendo meio de cultura sólido ou por diluição seriada. Os clones obtidos tiveram sua cultura expandida em meio Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado por aquecimento, 10 microgramas por mililitro (µg/mL) de gentamicina e 1000 unidades internacionais (UI) de ampicilina. Parte das culturas foi estocada por meio de criopreservação e a outra parte submetida à extração de DNA.

3.3.1. Clonagem pelo cultivo em meio sólido

A obtenção dos clones por meio de cultivo em meio sólido foi realizada de acordo com Muniaraj *et al*. (83) com algumas modificações. O meio de cultura utilizado consistiu de 0,5 volume (V) de meio Noble Agar e 0,5 V de meio 2× Schneider suplementado com 10% SFB. Foram distribuídos 20 mL (mililitro) de meio por placa (em Cabine de Segurança Biológica classe 2A) e estas permaneceram por 10 minutos abertas para a geleificação do meio de cultura. Após 24 horas de secagem, foram semeadas 10^3 células de *Leishmania* sp. em fase estacionária de cultivo e as placas mantidas em estufa tipo BOD a 25 graus Celsius (ºC).

As placas foram observadas semanalmente durante aproximadamente 50 dias, para detectar o crescimento de colônias. Quando observadas as colônias no meio sólido, estas foram expandidas em meio líquido Schneider 10% SFB.

3.3.2. Clonagem por diluição seriada

O isolamento de clones a partir de diluição seriada foi realizado de acordo com Evans e Smith (84) com modificações. A partir de cultura em fase estacionária, realizou-se a contagem de parasitas em câmara de Neubauer utilizando solução de formalina 2%. Partiu-se da concentração de 10^6 parasitas/mL. Em seguida realizou-se 2 diluições com fator de diluição de 4 vezes (×) até a concentração de $6{,}2\times10^4$ parasitas/mL. A partir dessa concentração foram feitas 20 diluições seriadas com fator de diluição de 2×, até se atingir 0,03 parasitas/mL. Os parasitas recuperados dos poços foram expandidos em frascos contendo 3 mL de meio Schneider com 10% SFB.

3.4. Extração de DNA

O presente protocolo de extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio foi feito de acordo com Uliana *et al*. (85), com algumas modificações. A cultura de parasitas foi colhida por centrifugação por 10 minutos, 6000×g a 4°C. As células foram lavadas em PBS e ressuspensas em Tris-EDTA (TE - 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Em seguida foi adicionado 1% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 15 unidades (U) de proteinase K para o rompimento das células e digestão proteica. Foi feita uma incubação por 3 horas a 42°C em banho Maria. Após a etapa de lise proteica foi adicionado 1 V de fenol, homogeneizado e a mistura foi centrifugada em 6000×g a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante (SN) foi recuperado e foi adicionado clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a centrifugação repetida. Ao SN contendo o ácido nucleico, foram adicionados

etanol absoluto e 3 mols por litro (M) de acetato de sódio. Foi realizada a homogeneização e incubação a -20°C por uma hora. Em seguida, realizou-se a precipitação dos ácidos nucleicos por centrifugação a 6000×g a 4°C por 30 minutos. O SN foi descartado e o *pellet* lavado com álcool 70% a 6000×g por 5 minutos. Depois de lavado em álcool 70%, os tubos permaneceram abertos para a secagem do *pellet*. Em seguida, realizou-se uma incubação com 100 µg de RNAse e 15 U de PK por 3 horas, seguida de uma nova extração por fenol - clorofórmio. Por último o DNA foi precipitado e ressuspenso em TE.

3.5. Quantificação de ácidos nucleicos

O DNA obtido nos processos de extração de culturas e de plasmídios e os produtos de PCR purificados, foram quantificados por espectrofotometria pela medida de absorbância em 260 nm. Os aparelhos utilizados para a quantificação foram BioSpectrometer (Eppendorf) e Nanodrop ND 1000 (Bioscience). A pureza com relação a proteínas foi determinada pela razão das leituras em 260 nm e 280 nm, cujos valores variaram entre 1,8 e 2,0, valores satisfatórios para avaliar a pureza de DNA.

3.6. Reação em cadeia da polimerase

As reações foram preparadas em um volume final de 50 µL, utilizando o kit Top *Taq* Master Mix (Qiagen) que contém 0,2 milimolar (mM) de cada desoxirribonucleotídio trifosfato (dNTPs), 1,25 mM cloreto de magnésio, tampão de enzima, 1,2 U de *Taq* DNA polimerase. Foram adicionados de 50 a 100

nanogramas (ng) de DNA. Os oligonucleotídeos utilizados nesse estudo, com as concentrações e condições de ciclagem estão listados na Tabela 2. As reações foram realizadas em termociclador Nexus GSX1 Mastercycler (Eppendorf) e os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose como descrito mais à frente.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos e condições utilizadas nas reações de PCR

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento(pb)	Concentração (nM)	T° Associação	Tempo extensão (s)
hsp70C - sense	5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA -3'	240	200	64	30
hsp70C - antisense	5'-CCGCCCATGCTCTGGTACATC-3'	*	*	*	*
F2 - sense	5'-GGAGAACTACGCGTACTCGATGAAG-3'	144	200	60	NC
LVF	5' TTGATCACTGGTACATGCATTAAG-3'	101		68	30
LVR	5'- CTCGTCCAGAATGCAGCAC-3'	101		68	30
T7 - sense	5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3'	**	0.032	55	20
SP6 - antisense	5'-TAAGATATTCACAGTGGATTTA-3'	**	0.032	55	20

* hsp70C antisense – pode ser associado aos primers sense hsp70C ou F2.

** T7 e SP6- oligonucleotídeos utilizados de forma independente em reações de sequenciamento

3.7. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR e da clivagem de DNA por enzimas de restrição, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, cuja concentração variou entre 1 e 3% de acordo com o tamanho do fragmento a ser analisado. O gel foi preparado com tampão TAE 1× (10 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) corado com o corante GelRed Nucleic Acid Stain (Biotinum). As corridas foram feitas a 6,42 volts/cm (Eletrophoresis Power Supply-EPS 600-Pharmacia Biotech) em tampão 1× TAE.

Para visualização, os géis foram observados em um transluminador Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging) e as imagens captadas através da câmera Pro Imaging GL212 acoplada ao sistema. Para estimar o tamanho do fragmento, em cada gel, juntamente com as amostras, foram aplicados os

padrões de tamanho molecular 100 pares de bases (SM0331 Fermentas) e/ou 50 pares de bases (SM0373 Fermentas).

3.8. Purificação de Produtos de PCR

Os produtos de PCR submetidos à análise de RFLP foram purificados previamente utilizando GeneJet PCR purification Kit (ThermoScientific), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9. Análise de polimorfismo pela clivagem de produto de *hsp-70c* PCR por enzima de restrição

Foi realizada clivagem dos produtos de PCR *hsp*70c pelas enzimas de restrição *Hae*III e *Bst*UI para a análise do polimorfismo observado pelo comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). A clivagem do produto de PCR *hsp*70 pela enzima *Hae*III, diferencia entre as principais espécies de *Leishmania* sp. causadoras LTA. As reações foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo tampão da enzima, 10U de enzima e cerca de 5 µg de produto de PCR purificado. As reações foram incubadas a 37°C por 16 horas seguida de inativação da enzima a 80ºC por 20 minutos, para evitar atividade inespecífica da mesma.

3.9.1. Inferência da ploidia dos híbridos pela análise do polimorfismo de nucleotídeo único pela clivagem de sequências polimórficas amplificadas (SNP-CAPS)

Para estimar a proporção da herança dos alelos de *hsp*70 pelos híbridos, nós determinamos o polimorfismo de nucleotídeo único pela clivagem do produto de amplificação da sequência contendo o polimorfismo (31,37). A inferência de uma possível ploidia alterada, bem como da proporção da herança dos alelos de *hsp*70 foi realizada pela intensidade relativa dos produtos de digestão de híbridos e das parentais. As condições da reação de PCR foram as mesmas utilizadas no item 3.5 e 3.7.

Após purificados, 200 ng de produto de PCR foram clivados por 10U de *Hae*III durante 16 horas. Foram utilizados produtos de PCR amplificados a partir das sete cepas híbridas (M15983, M15984, M15987, M15988, M19672, M19676 e M19697) e das duas espécies parentais *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147) e *L*. (*V*.) *shawi* (M8408). Adicionalmente, foram preparadas misturas do produto de PCR purificado de *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) *shawi* nas proporções de 2:1, 1:1 e 1:2, respectivamente. Em seguida realizou-se eletroforese em gel de agarose 3%, de acordo com o item 3.6.

3.10. Caracterização biológica dos parasitas híbridos *L*. (*Viannia*) spp. e comparação com as cepas parentais *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis*

3.10.1. Caracterização *in vitro*

O comportamento *in vitro* dos parasitas híbridos foi observado e comparado com o comportamento das cepas parentais. O comportamento foi avaliado através da realização da curva de crescimento dos parasitas.

3.10.1.1. Análise da curva de crescimento

A análise da curva de crescimento dos parasitas híbridos e das cepas parentais deu-se pelo acompanhamento da cultura por sete dias. As culturas foram feitas em meio Schneider suplementadas com 10% de SFB. Partiu-se de uma concentração de 10^4 células por mL de meio. As garrafas foram mantidas a 25°C em estufa BOD. Para cada cepa, foram acompanhadas três garrafas. Diariamente foi quantificado o número de células pelo uso de câmara de Neubauer. Ao final de sete dias, a curva de crescimento de cada cepa foi traçada. O comportamento dos parasitas foi observado em dois momentos diferentes: 4ª e 12ª passagem após o isolamento.

3.10.1.2. Cálculo do tempo de duplicação e da taxa de crescimento celular.

Os valores de tempo de duplicação (TD) e taxa de crescimento (TC) foram calculados utilizando dados da curva de crescimento. Foram incluídos na análise os valores de concentração celular obtidos na fase logarítmica (log). Os cálculos foram realizados utilizando o Software Doubling Time v1.0.10

(http://www.doubling-time.com). O parâmetro de tempo de duplicação reflete o tempo em horas necessário para a duplicação da população celular. Já o parâmetro de taxa de crescimento reflete o número de divisões por unidade de tempo (horas). Esses dados foram analisados em conjunto com a concentração celular alcançada na fase estacionária.

3.10.2. Caracterização *in vivo* da infecção dos parasitas híbridos *L.* (*V.*) *shawi*/ *L.* (*V.*) *guyanensis* em camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c.

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP, sob o número de protocolo 048/12 (Anexos A e B), atendendo a Lei procedimentos para uso científico de animais n° 11.794 de 08/03/2008.

3.10.2.1. Infecção experimental

Para caracterizar o comportamento biológico *in vivo* dos parasitas, utilizamos o modelo experimental de susceptibilidade, camundongos BALB/c. Foram realizados experimentos de infecção dos camundongos pela cepa híbrida *L*. (*V.*) *guyanensis* / *L*. (*V*.) *shaw shawi* (MHOM/BR/2001/MM19672) e pelas cepas referência *L*. (*V.*) *shawi* (M8408) e *L. (V.) guyanensis* (M4147).

Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram centrifugadas a 1620×g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, os parasitas foram lavados em PBS estéril por três vezes a 1620×g por 10 minutos a 4°C. Foi

preparado o inóculo, ajustando-se a concentração dos parasitas em suspensão para 2×10^7 promastigotas/mL e foi inoculado 50µL desta suspensão por coxim plantar. Todos os ensaios foram realizados com parasitas em passagem recente após isolamento do hospedeiro vertebrado.

Em cada experimento foram montados cinco grupos experimentais, cada um contendo cinco animais BALB/c. Os animais de quatro grupos experimentais foram contidos e então inoculados no coxim plantar das duas patas traseiras com 10^6 parasitas por coxim plantar. O quinto grupo consistiu do grupo controle que foi inoculado com solução de PBS estéril.

3.10.2.2. Evolução da lesão

O acompanhamento da evolução da lesão foi realizado até a 7ª semana pós-infecção (PI) através de medidas semanais do diâmetro das patas utilizando um micrômetro. A estimativa do tamanho da lesão foi realizada pelo diâmetro da pata de camundongos infectados subtraindo a média da medida das patas do grupo controle.

3.10.2.3. Carga parasitária

A carga parasitária dos animais infectados foi analisada através do ensaio de diluição limitante (86). Foram analisados os tempos de 48 horas, 7, 14, 21 e 30 dias PI. Em cada um dos tempos, foi feita a eutanásia em um grupo de cinco animais, por inalação de CO_2. Em seguida, amostras de pele, baço e linfonodo poplíteo de drenagem foram coletados e pesados. Esses fragmentos foram

macerados e diluídos em 1 mL de meio Schneider suplementado com 10% SFB inativado por aquecimento, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI de ampicilina. A partir do macerado dessas biópsias em meio de cultura, 150 µL foram adicionados ao primeiro poço da placa de 96 poços em quadruplicata. Em seguida foram realizadas diluições seriadas na razão de 1:3 por 10 poços consecutivos, sendo o último controle negativo do experimento.

As placas foram então devidamente vedadas e mantidas a 25°C por 10 dias em estufa BOD, para que ocorresse a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas. Cada placa foi observada em microscópio invertido nos tempos de 5 e 10 dias após a diluição para se verificar a titulação máxima em que se encontrou promastigotas viáveis.

Em seguida foi calculada a razão promastigotas/peso de cada fragmento de tecido para assim se estimar a carga parasitária (número de parasitas/ grama de tecido do hospedeiro), através da seguinte equação:

$$\text{carga parasitária} = \frac{\text{recíproco do maior título positivo} \times \text{diluição do material} \times \left(\frac{\text{vol. homogeneizado}}{\text{vol } 1^{0} \text{ poço da diluição}}\right)}{\text{Peso do órgão}}$$

3.10.2.4. Análise histopatológica das lesões

A análise histopatológica foi realizada em pele, linfonodo e baço dos camundongos infectados com 35 dias PI, bem como no grupo controle não infectado. Após a eutanásia dos animais por inalação de CO_2, biópsias de pele, linfonodo e baço foram coletadas, fixadas em formol tamponado 10% e

processadas pelas técnicas usuais de histologia. Cortes histológicos de 6 micrometros (µm) foram corados pela hematoxilina eosina (HE) e observados através de microscopia ótica de luz para a caracterização das alterações teciduais. As fotomicrografias foram capturadas pelo uso do fotomicroscópio Axioskop 2 plus (Zeiss) utilizando o programa Axiovision 4.0.

3.10.3. Análise estatística dos dados

A análise dos dados obtidos foi realizada no software GraphPad Prism 5®. Os dados estão apresentados com a média aritmética ± erro padrão. Para a análise estatística dos experimentos (3) de curva de crescimento e infecção de camundongos BALB/c foi empregado o teste paramétrico ANOVA de dois fatores para análise de variância dos dados, seguido do pós-teste Bonferroni.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem de *Leishmania* (*Viannia*) spp.

Foram isolados um mínimo de cinco e um máximo de dez clones para cada uma das cepas caracterizadas no presente estudo. O protocolo de clonagem em meio sólido Agar-Schneider possibilitou o isolamento de clones para quatro (M19672, M19676, M15984 e M15988) das sete cepas caracterizadas no presente estudo**.**

O protocolo de diluição seriada possibilitou o isolamento de três das sete cepas caracterizadas no presente estudo (M15983, M15987 e M19697). Obtivemos sucesso na obtenção de populações clonais a partir do poço que representava aproximadamente 1 parasita por mL.

Todos os clones obtidos foram expandidos em meio de cultura, e em seguida, submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido e à extração de DNA.

4.2. Caracterização de isolados por PCR-RFLP de sequência da Proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) pelo uso da enzima *Hae*III

A clivagem do produto da reação de PCR tendo como alvo, sequências que codificam para proteína de choque térmico de 70 quilodaltons (*hsp*70) pela enzima *Hae*III, possibilita a distinção das principais espécies do gênero

Leishmania sp. causadoras de LTA, mesmo dentre espécies muito próximas como *L*. (*Viannia*) *guyanensis* e *L*.(*V*.) *shawi*.

Foram analisados por esta ferramenta os clones obtidos a partir de cada um dos sete isolados para se verificar a homogeneidade dos isolados. Observou-se que os sete isolados se dividiram em dois perfis polimórficos de clivagem pela enzima.

O primeiro perfil foi observado para os isolados M15987, M19672 e M19676, Figura 2,Figura ***3*** eFigura ***4***, respectivamente. Este teve como característica um padrão intermediário entre os apresentados pelas espécies *L*. (*V*.) *shawi* e *L.* (*V*.) *guyanensis.*

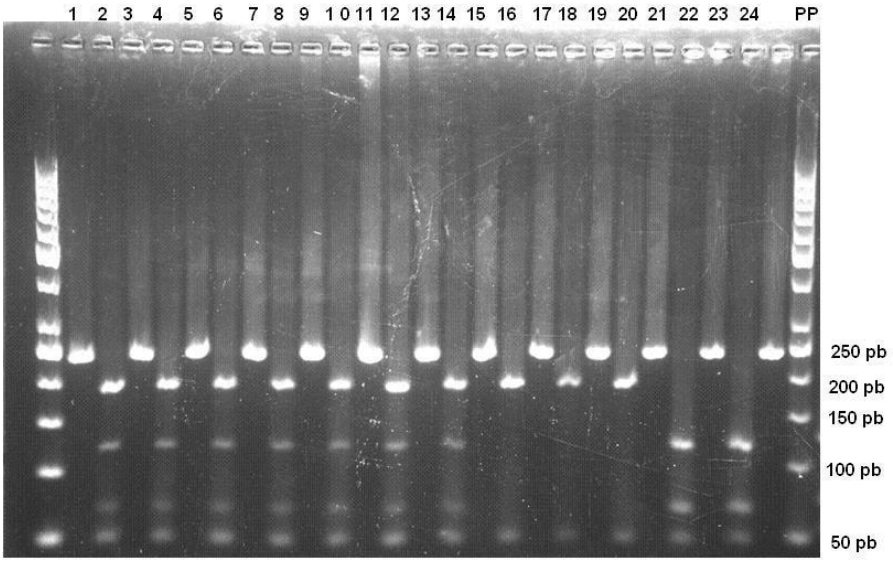

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *Leishmania* (*Viannia*) spp. para a cepa M15987. As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. De 1 a 14: DNA de sete clones; 15 e 16: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/2001/M19869); 17 e 18: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 19 e 20: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174); 21 e 22: *L*. (*V*.) *shawi* (MCEB/BR/1984/M8408); 23 e 24: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/2001/M19664). PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

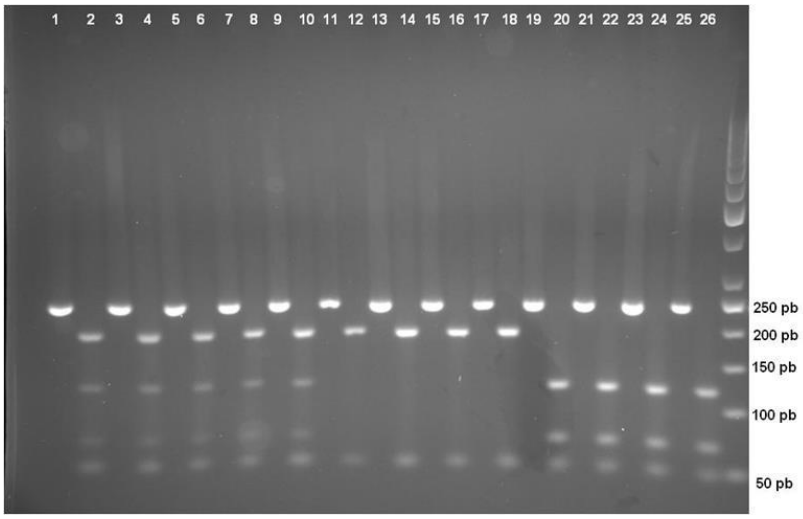

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M19672. As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. Linhas de 1 a 10: DNA de 5 clones; 11 e 12: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 13 e 14: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1990/M13245); 15 e 16: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174); 17 e 18: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/2001/M19869); 19 e 20: *L*. (*V*.) *shawi* (MCEB/BR/1984/M8408); 21 e 22: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/2001/M19664); 23 e 24: *L*. (*V*.) *shawi* 15982; 25 e 26: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/96/M15985; PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

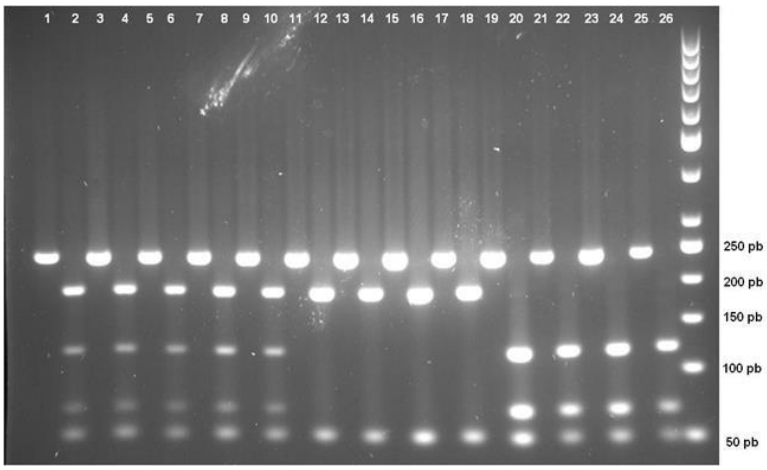

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M19676. As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. Linhas de 1 a 10: DNA de 5 clones; 11 e 12: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1990/M13245); 13 e 14: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 15 e 16: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174); 17 e 18: L. (V.) guyanensis (MHOM/BR/2001/M19869); 19 e 20: *L*. (*V*.) *shawi* (MCEB/BR/1984/M8408); 21 e 22: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/2001/M19664); 23 e 24: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/96/M15982); 25 e 26: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/96/M15985); PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

O segundo perfil foi observado para as cepas M15983, M15984, M15988, M19697, Figura 5,Figura ***6***,Figura ***7*** eFigura **8**, respectivamente. O padrão observado para o perfil dois foi idêntico ao apresentado pela espécie *L*. (*V*.) *shawi*.

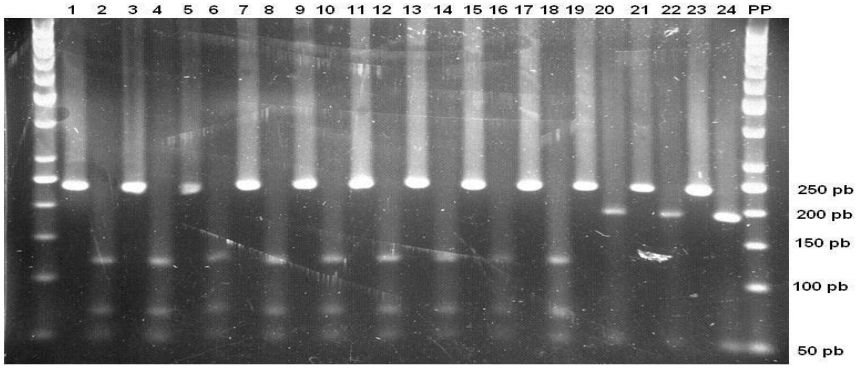

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M15983. As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. Linhas de 1 a 14: DNA de 7 clones; linhas 15 e 16: *L*. (*V*.) *shawi* (MCEB/BR/1984/M8408); linhas 17 e 18: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/2001/M19664), linhas 19 e 20: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), linhas 21 e 22: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174), linhas 23 e 24: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1990/M13245), PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

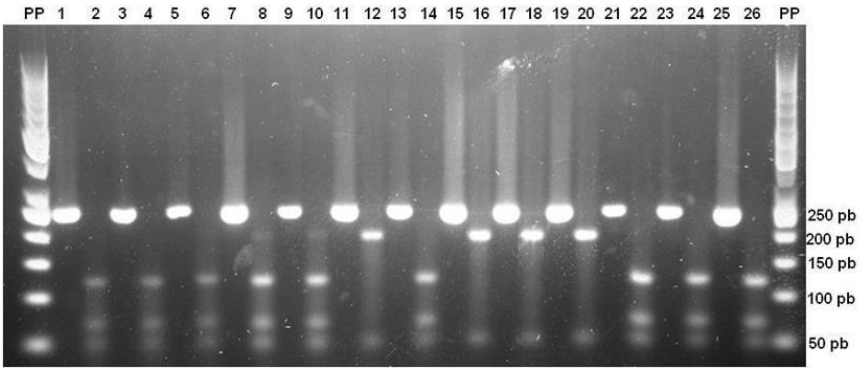

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M15984. As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. Linhas de 1 a 12: DNA de 5 clones; 11 e 12: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1990/M13245); 13 e 14: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/96/M15985); 15 e 16: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 17 e 18: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174); 19 e 20: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/2001/M19869); 21 e 22: *L*. (*V*.) *shawi* (MCEB/BR/1984/M8408*);* 23 e 24: *L*. (*V*.) *shawi* 15982; 25 e 26: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/2001/M19664). PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

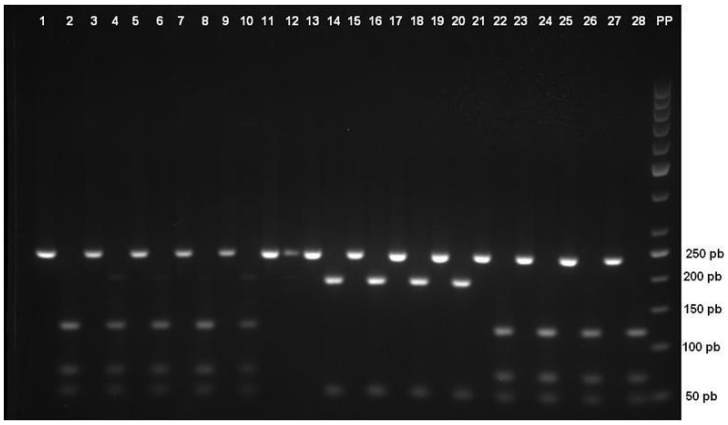

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *L*. (*Viannia*) spp. da cepa M15988. As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. Linhas de 1 a 12: DNA de 6 clones; 13 e 14: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 15 e 16: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1990/M13245); não 17 e 18: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174); 19 e 20: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/2001/M19869); 21 e 22: *L*. (*V*.) *shawi* (MCEB/BR/1984/M8408*);* 23 e 24: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/2001/M19664); 25 e 26: *L*. (*V*.) *shawi* 15982; 27 e 28: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/96/M15985); PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

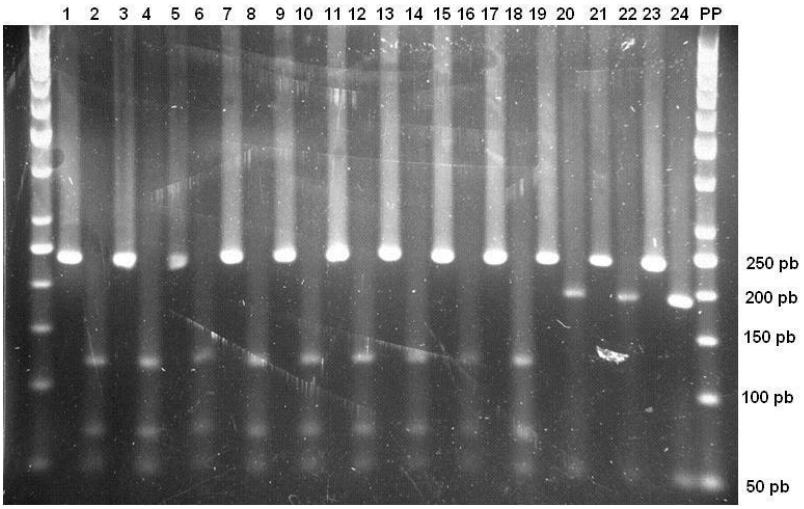

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp*70 digeridos por *Hae*III obtidos a partir de DNA dos clones de *L.* (*Viannia*) spp. da cepa M19697**.** As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. Linhas de 1 a 12: DNA de 6 clones; 13 e 14: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/96/M15982); 15 e 16: *L*. (*V*.) *shawi* (MHOM/BR/2001/M19664); 17 e 18: *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/*M8408);* 19 e 20: *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174); 21 e 22: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); 23 e 24: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MOM/BR/2001/M19869). PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373)

De acordo com a análise de *hsp*70PCR-RFLP, observou-se dois perfis de clivagem deste fragmento da sequência de DNA que codifica para a enzima de choque térmico, sendo que um deles foi claramente híbrido, com perfil heterozigoto e o outro perfil foi homozigoto, correspondente ao da espécie parental, *L*. (*V*.) *s. shawi.*

4.2.1. Caracterização de isolados por PCR-RFLP de sequência da Proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) pelo uso da enzima *Bst*UI

Após a confirmação da homogeneidade dos isolados pela análise dos clones através do ensaio de *hsp*70 PCR-RFLP pelo uso da enzima *Hae*III, o DNA de cada um dos isolados foi submetido a clivagem pela enzima *Bst*UI, uma vez que, essa permite a distinção entre *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) l*ainsoni* e a enzima *Hae*III não permite tal distinção. As condições de PCR, purificação do produto, clivagem e análise por eletroforese foram as mesmas utilizadas para a enzima *Hae*III.

Como se pôde notar pela clivagem utilizando a enzima *Bst*UI, todos os isolados apresentam um perfil de digestão que diverge do apresentado por *L*. (*V*.) *lainsoni* e que claramente assemelhou-se ao perfil apresentado pelas espécies *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) *s. shawi* (Figura 9).

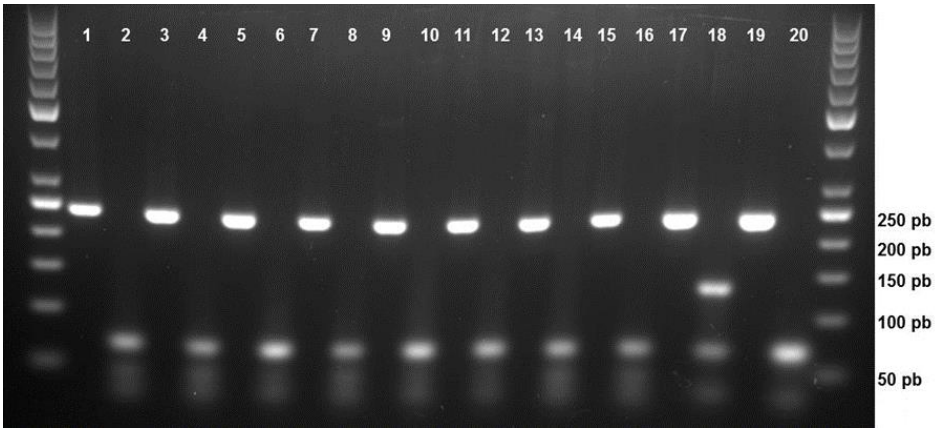

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de PCR *hsp70* digeridos por *Bst*UI obtidos a partir de DNA dos isolados de *L*. (*Viannia*) spp. As linhas ímpares contêm o fragmento não digerido e as linhas pares, o produto da digestão. 1 e 2: produto da cepa M15983; 3 e 4: cepa M15984; 5 e 6: cepa M15987; 7 e 8: cepa M15988; 9 e 10: cepa M19672; 11 e 12: cepa M19676; 13 e 14: cepa M19687; 15 e 16: *L*. (*V*.) *shawi* (MCEB/BR/1984/M8408); 17 e 18: *L*. (*V*.) *lainsoni* (MHOM/BR/1993/M14263); 19 e 20: *L*. (*V*.) *guyanensis* (MHOM/BR/1997/M16174); PP: padrão de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

A partir do perfil de restrição encontrado pela clivagem utilizando a enzima *Bst*UI, pôde-se confirmar que os isolados híbridos descendem de *L*. (*V*.) *shawi*.

4.2.2. Análise de SNP-CAPS

Foi realizado o ensaio de SNP-CAPS para a comparação da intensidade dos fragmentos gerados pela clivagem por *Hae*III, partindo de uma mesma concentração do produto de PCR. A partir dessa análise comparativa, pôde-se inferir a ploidia dos isolados, bem como a participação dos parentais na herança dos alelos de *hsp*70.

Os híbridos homozigotos M15983 (linha 1), M15984 (linha 2), M15988 (linha 4) e M19696 (linha 7) apresentaram intensidade similar a *L*. (*V*.) *shawi* (Figura 10).

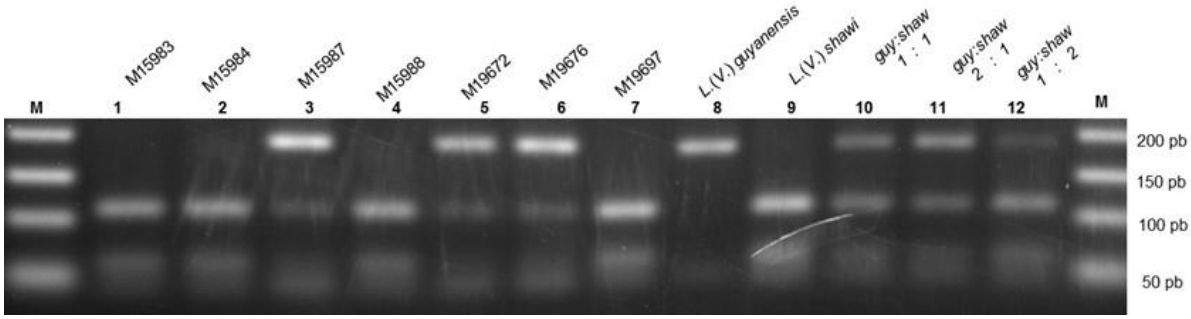

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 3% corado com GelRed® com produtos de SNP-CAPS *hsp70* PCR-RFLP (*Hae*III). Todas as linhas contêm a digestão de 200 ng de produto de PCR purificado. Linhas 1 a 7: *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*/ *L*. (*V*.) *shawi* M15983, M15984, M19887, M15988, M19672 e M19676 e M19697, respectivamente. Linha 8: *L*. (*V*.) *guyanensis*, Linha 9: *L*. (*V*.) *shawi*, Linha 10: *L*. (*V*.) *guyanensis*: *L*. (*V*.) *shawi* (2:1), Linha 11: *L*. (*V*.) *guyanensis*: *L*. (*V*.) *shawi* (1:1), Linha 12: *L*. (*V*.) *guyanensis*: *L*. (*V*.) *shawi* (1:2); M: marcador de tamanho molecular (Fermentas SM 0373).

Entre os híbridos com perfil heterozigoto, a banda referente à *L*. (*V*.) *guyanensis* mostrou uma intensidade elevada comparada as bandas referente à *L*. (*V*.) *shawi*. O isolado M19672 (linha 5) mostrou intensidade proporcional à mistura entre *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L.* (*V.*) *shawi* na proporção de 2:1 (linha 11), entretanto, os isolados M15987 (linha 3) e M19676 (linha 6) mostraram uma intensidade um pouco mais elevada.

4.3. Curva de crescimento

Para a caracterização do comportamento reprodutivo *in vitro* dos parasitas híbridos e sua comparação com o perfil das cepas parentais, foram realizadas curvas de crescimento.

As curvas foram realizadas em dois momentos das culturas, que consistiram do 4° e 12° repique após o isolamento do hospedeiro mamífero.

A análise da curva de crescimento dos parasitas na 4ª passagem mostrou que das 5 cepas híbridas aqui testadas, 4 apresentaram um padrão semelhante

e uma apresentou um padrão bem divergente. O primeiro grupo incluiu as cepas M15984, M15987, M19672 e M19676. Neste grupo, o início da fase log ocorreu no 3° dia de cultura, apresentando um pico no 5° dia, quando entraram na fase estacionária de crescimento, seguido de estabilização. A cepa M15984 iniciou seu crescimento no 2° dia de cultura e isso pode ser reflexo do menor TD apresentado por essa cepa, quando comparada com as outras de mesmo perfil (Figura 11, Tabela 3).

Analisando a Figura 11, as cepas híbridas apresentaram concentrações celulares mais elevadas do que as parentais até o 4° dia, no entanto, somente M19672 mostrou diferença estatística significante em relação a espécie parental *L*. (*V*.) *guyanensis* no 4° dia de cultura ($p < 0,05$).

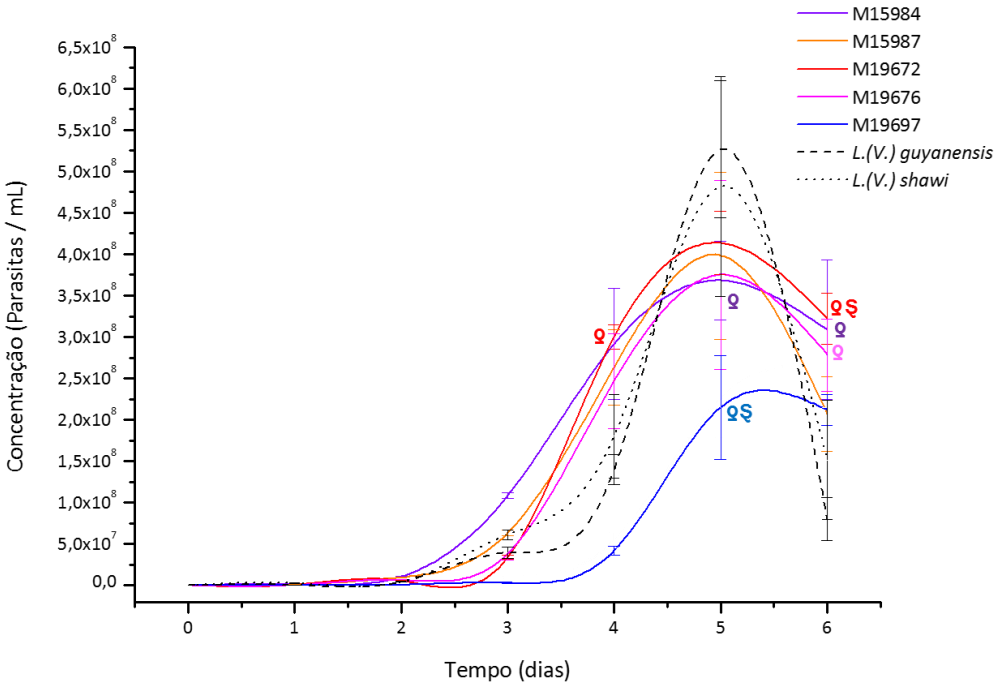

Figura 11 - Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) spp. em meio de cultura Schneider, partindo de 10^4 células/mL, durante a 4ª passagem pós isolamento. As barras indicam o erro padrão. O símbolo ǫ representa diferença estatística significante ($p < 0,05$) entre *L*. (*V*.) *guyanensis* M4147 e as cepas híbridas. O símbolo Ş representa diferença estatística significante ($p < 0,05$) entre *L*. (*V*.) *shawi* M8408 e as cepas híbridas.

A cepa M19697 apresentou um perfil divergente das outras híbridas. Foi observado que a mesma entrou na fase log no 4° dia de cultura e seu crescimento já se estabilizou no 5° dia. Interessante notar que esta cepa foi a que apresentou o menor TD dentre as híbridas (Tabela 3***Tabela 3***) e isso não refletiu na concentração celular alcançada na fase estacionária, que foi a menor concentração comparada as cepas híbridas e às parentais. A diferença observada no 5° e 6° dia entre a cepa M19697 e as demais, mostrou-se estatisticamente significante (Figura 11 e Tabela 4).

Tabela 3 - Valores de tempo de duplicação, taxa de crescimento e concentração celular em 4ª e 12ª passagem

	4° passagem			12° passagem		
	TD	TC	CC	TD	TC	CC
M15983	NR	NR	2,26E+08	11,15	0,06	2,26E+08
M14984	13,83	0,05	3,68E+08	NR	NR	NR
M15987	20,9	0,03	3,98E+08	42	0,01	1,33E+08
M19672	23,96	0,02	4,13E+08	11,01	0,06	1,78E+08
M19676	21,77	0,03	3,75E+08	20,89	0,03	1,24E+08
M19697	9,5	0,07	2,15E+08	23,5	0,02	1,13E+08
L.(V.) guyanensis	12,73	0,05	5,27E+08	15,04	0,04	4,71E+07
L.(V.) shawi	16,41	0,04	4,82E+08	15,85	0,04	8,78E+07

NR- Não realizado; TD – tempo de duplicação; TC – taxa de crescimento; CC – concentração de células no 5° dia de cultura (fase estacionária). TD e TC – calculados utilizando os valores de concentração celular da fase log (72 a 120 h).

As cepas parentais apresentaram comportamento semelhante em todos os tempos da curva. Iniciaram a fase log entre o 3° e o 4° dia, alcançaram as maiores concentrações no 5° dia. Apesar de não termos encontrado diferença

significativa entre a concentração de *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis* no 5° dia, a concentração média de *L*. (*V*.) *guyanensis* foi superior. Essa diferença pode ser corroborada pelos valores de TD e TC apresentados pelas duas cepas (Tabela 3). No 5° dia, a concentração celular das parentais foi maior do que a das cepas híbridas. Foi observada significância estatística entre M19697 e as parentais e entre a cepa M15984 e *L*. (*V*.) *guyanensis* ($p<0,05$).

Comparando a cinética de crescimento entre as cepas híbridas e parentais, nota-se uma tendência ao maior crescimento das cepas incluídas no primeiro grupo em relação às cepas parentais até o 4° dia de cultura (Figura 11). É importante notar que a taxa de crescimento entre elas é semelhante, no entanto, a taxa de duplicação das cepas parentais foi levemente maior do que das híbridas do primeiro grupo, exceto para a cepa M15984 (Tabela 3). Essa observação sugere que a maior concentração das híbridas até o 4° dia pode ser decorrente da sua entrada anterior em fase log. Os menores valores de TD das cepas parentais, resultam em uma taxa de crescimento maior e isso pode explicar o crescimento abrupto observado na curva.

A cepa M19697 apresentou um perfil divergente das outras híbridas. Sua entrada em fase log se deu no 4° dia de cultura e o crescimento já se estabilizou no 5° dia. Interessante notar que esta cepa foi a que apresentou o menor tempo de duplicação dentre as híbridas (Tabela 3***Tabela 3***) e isso não refletiu na concentração celular alcançada na fase estacionária, que foi a menor encontrada. A análise estatística entre as cepas híbridas mostrou diferença significativa da cepa M19697 com as demais no 4° e 5° dia de cultura (Figura 11 e Tabela 4).

Tabela 4 - Diferença estatística entre cepas híbridas durante a curva de crescimento em 4ª passagem.

	M19697
M15984	4 (***)
M15987	4(**) / 5(*)
M19672	4(***)/ 5**
M19676	4 (*)/ 5 (*)

Números – representam tempo em dias. * = P ≤ 0, 05; ** = P≤ 0,01 e ***= P<0,001

Quando se realizou a curva de crescimento dos parasitas no 12° repique após seu isolamento, observou-se uma alteração do padrão de crescimento tanto para o grupo das cepas híbridas, quanto das parentais (Figura 12).

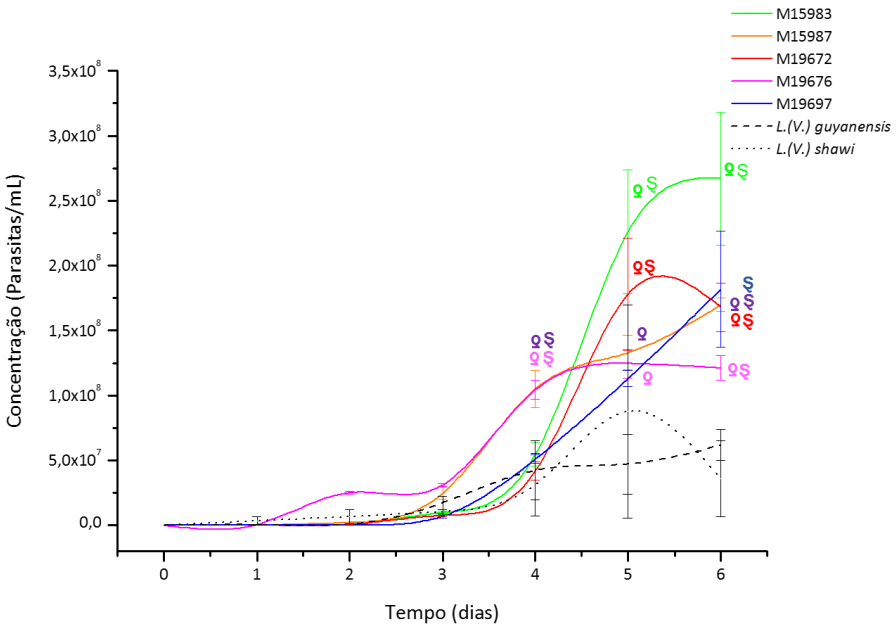

Figura 12 - Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) spp. em meio de cultura Schneider, partindo de 10^4 células/mL, durante a 12ª passagem pós isolamento. As barras indicam o erro padrão. O símbolo **ϱ** representa diferença estatística significante (p < 0,05).

O perfil homogêneo de crescimento compartilhado entre as cepas híbridas não foi observado nesta curva, ao contrário disso, a maior heterogeneidade observada foi refletida em diferença estatística mais significativas entre elas (Tabela 5).

Tabela 5 - Diferença estatística entre cepas híbridas durante a curva de crescimento em 12ª passagem.

	N15987	M19672	M19676	M19697
M15983	4 (*)/5(***)/6(***)	6 (***)	4(**)/5(***)/6(***)	5(***)/6(***)
N15987		4(**)	6(**)	4(*)
M19672			4(***)/5(***)/6(**)	5(**)
M19676				4(***)/6(***)

Números – representam tempo em dias. * = P < 0,05; ** = P < 0,01 e ***= P < 0,001

As cepas híbridas apresentaram um crescimento mais eficiente quando comparadas às cepas parentais, traduzido nos valores de concentração a partir do 4° dia e nos parâmetros de crescimento (Figura 12 e Tabela 3).

As cepas híbridas M15983 e M19672 apresentaram um perfil de crescimento semelhante, embora a primeira tenha alcançado concentração celular mais elevada na fase estacionária. Os maiores valores de concentração apresentados por essas, são corroborados pelos menores valores de TD e maior TC (Tabela 3). Ambas iniciaram sua fase log no 4° dia da curva e a estabilização do crescimento deu-se logo após o 5° dia para a cepa M19672 e um pouco mais adiante para a cepa M15983.

As cepas M15987 e M19676 iniciaram o crescimento no 3° dia. A cepa M19676 estabilizou seu crescimento logo após o 4° dia, enquanto que a cepa M15987 apresentou um discreto crescimento até o 6° dia de experimento.

Interessante notar que essa cepa apresentou 0,01 duplicações por hora, a menor TC e isso pode ter contribuído para a maior duração da fase log. A cepa M19697 apresentou um valor de TC de 0,02 duplicações por hora e de forma semelhante, a fase log para esta cepa durou até o 6° dia (Tabela 3).

As cepas parentais neste experimento, ao contrário do anterior apresentaram as menores concentrações celulares e os parâmetros de crescimento menos satisfatórios. Apesar de não haver estatística significante, parece ter havido uma inversão entre *L*. (*V*.) *s. shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis* com relação ao experimento anterior.

Ao comparar as curvas de crescimento obtidas para 4ª e 12ª passagens, notou-se que todos os parasitas apresentaram redução nas CC, bem como piora nos valores TD e TC, exceto a cepa M19672 que apresentou melhora dos parâmetros, mais ainda assim, uma concentração celular inferior ao primeiro ensaio (Tabela 3).

Se compararmos as cepas M19672, M15987 e M19676, presentes nos dois ensaios, pudemos observar que a diferença de crescimento entre elas foi mantida, sendo que a cepa M19672 apresentou concentração maior, a cepa M15987 intermediária e a cepa M19676 inferior nos dois momentos testados.

4.4. Avaliação da evolução da infecção

A evolução da lesão causada na infecção pelo híbrido selvagem M19672 e pelas espécies parentais *L.* (*V*.) *guyanensis e L*. (*V*.) *shawi* em camundongos BALB/c, foi acompanhada semanalmente até os 49 dias após a infecção. O intuito foi avaliar o comportamento biológico *in vivo* dessa cepa em relação as

espécies parentais. É importante salientar que o isolado M19672 foi escolhido por apresentar o perfil de heterozigoto para as sequencias de *hsp*70 e a utilização de somente um isolado nos procedimentos de infecção experimental deu-se pela necessidade de reprodução dos ensaios utilizando o mesmo parasita e pelos diversos tempos escolhidos para a avaliação da evolução da doença.

A infecção causada pela cepa híbrida M19672 apresentou uma evolução contínua e rápida com um pico discreto entre 14 e 28 dias pós infecção (PI), quando atingiu aumento médio de 0,75 mm (Figura 13). A partir do 28° dia PI, observou-se uma regressão no inchaço da pata causado por essa cepa, que praticamente desapareceu com 49 dias de infecção.

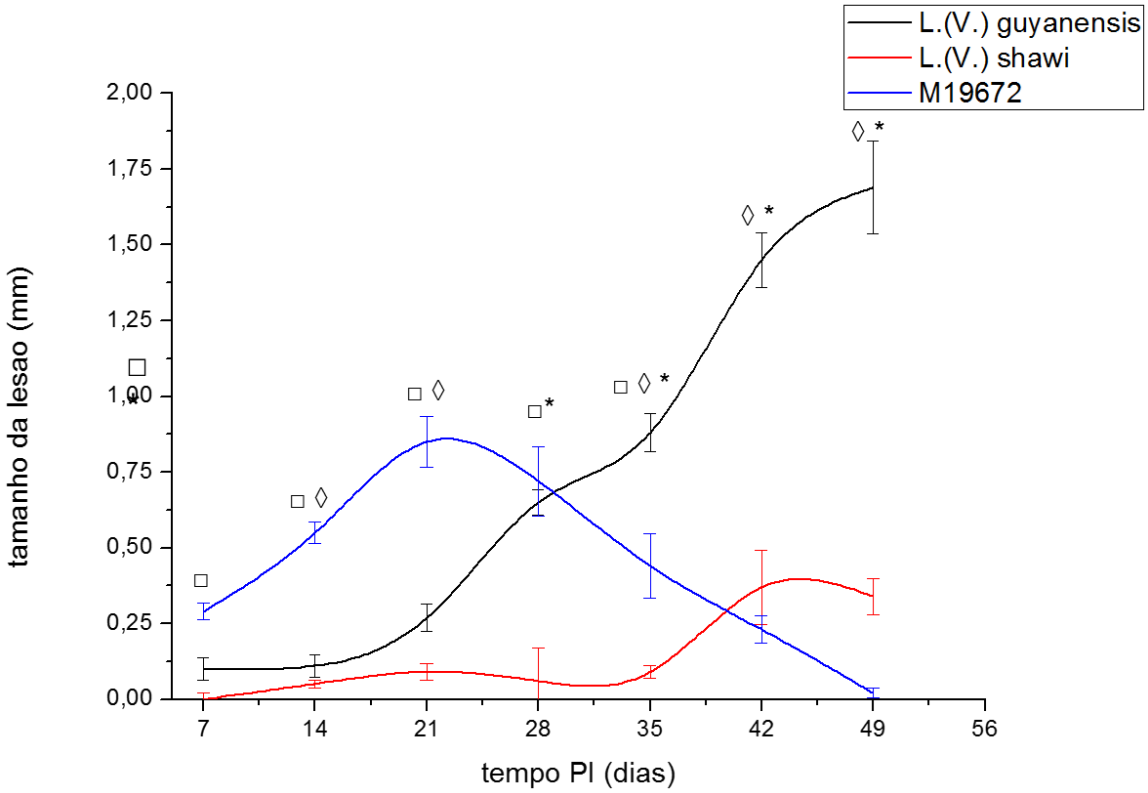

Figura 13 - Evolução da lesão em pata de camundongos BALB/c causada por *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase estacionária no coxim plantar. As medidas foram realizadas semanalmente até 49 dias PI.* = *L*. (*V*.) *guyanensis* × *L*. (*V*.) *shawi*; ◊: *L*. (*V*.) *guyanensis* × híbrido (M19672); □ = *L*. (*V*.) *shawi* × M19672. Símbolos* ◊ □: indicam significância estatística (P < 0,05) entre os diferentes grupos analisados. Dados apresentados consistem da média dos valores ± erro padrão.

A lesão causada por *L*. (*V*.) *guyanensis* iniciou sua progressão logo com 21 dias PI e manteve um aumento crescente até 49° dia, atingindo cerca de 2 mm de diâmetro.

A infecção por *L*. (*V*.) *shawi* não causou lesão aparente até o 28° dia PI. A partir do 35° dia PI, os camundongos infectados por essa cepa apresentaram um discreto aumento no diâmetro da pata até o 42º dia PI, que se manteve semelhante até o ultimo tempo analisado.

A evolução da lesão foi bastante heterogênea quando comparados os três grupos de parasitas. A infecção pelo parasita híbrido pareceu ser mais

precoce e rápida em comparação às cepas parentais, que apresentaram lesões de evolução mais lenta, e atingiram seus picos em períodos mais tardios. (Figura 14).

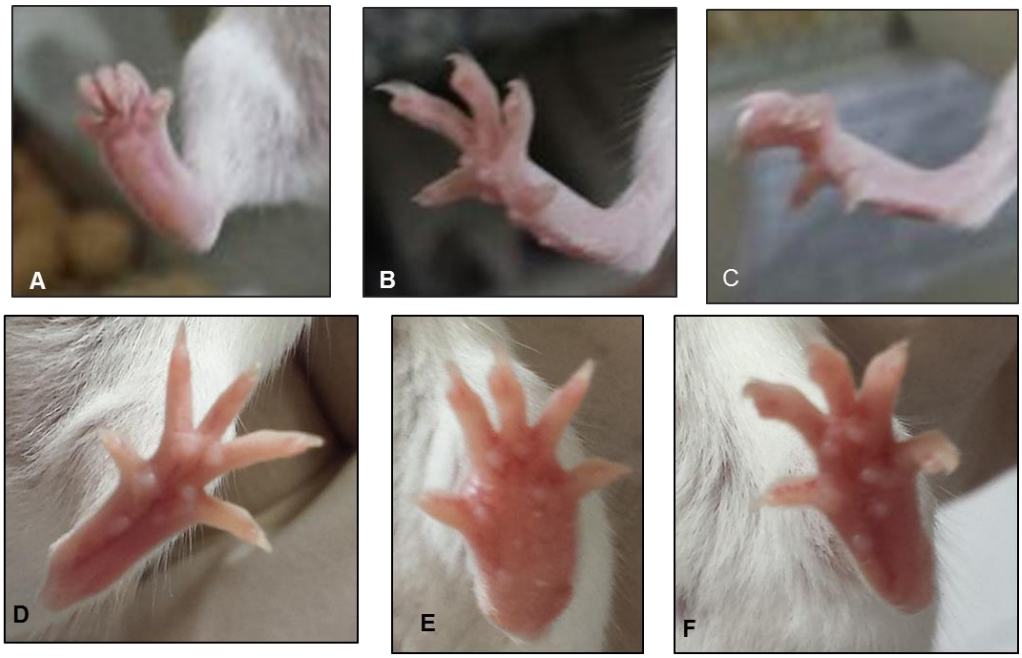

Figura 14 - Lesão de camundongos BALB/c aos 21 e 49 dias PI. Figuras 14 A e D: lesão causada pela cepa híbrida selvagem M19672 em 21 e 49 dias PI, respectivamente. Figuras B e E: lesão causada pela cepa *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147) em 21 e 49 dias PI, respectivamente. Figuras C e F: lesão causada pela cepa *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) em 21 e 49 dias PI, respectivamente.

Vale colocar que a cepa de *L. (V.) guyanensis* atingiu diâmetro que correspondeu a mais que o dobro comparado à cepa híbrida ($p<0,05$). A cepa parental *L* (*V*.) *shawi* causou lesão nitidamente menor que as duas outras cepas ($p<0,05$).

4.5. Carga parasitária

A quantificação da carga parasitária foi determinada pelo ensaio de diluição limitante nos tempos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias na pele, linfonodo e baço dos camundongos.

4.5.1. Carga parasitária na pele

A detecção de parasitas na pele se deu em todos os tempos para todas as cepas analisadas.

Na lesão causada pela cepa híbrida M19672, a carga parasitária mostrou um perfil progressivo semelhante ao das espécies parentais até o 7° dia PI (Figura 15), porém apresentou seu maior pico de parasitemia na pele no 14° dia PI, mostrando significância estatística na concentração de parasitas em relação às cepas parentais ($P < 0,05$). Esse pico na parasitemia correspondeu ao período de maior inchaço da pata (14-28 dias) na infecção em BALB/c por esse híbrido (Figura 13).

O parasitismo observado na infecção causada por *L*. (*V*.) *guyanensis* na pele apresentou um crescimento contínuo até o 21° dia PI e se manteve estável até o 28° dia PI (Figura 15).

O parasitismo na pele de camundongos infectados por *L*. (*V*.) *shawi* se manteve constante até o 14° dia PI. A partir desse período foi observado um aumento da carga parasitária na pele que se manteve até o 28° dia PI, porém sempre inferior à cepa hibrida e a *L*. (*V*.) *guyanensis*.

Houve diferença estatística significante entre a carga parasitaria na pele do hibrido e *L. (V.) guyanensis* com 14 dias PI (p<0,05) e semelhante nos tempos de 2, 7, 21 e 28 dias PI. *L*. (*V*.) *guyanensis* foi superior a *L*. (*V*.) *shawi*, em todos os tempos analisados, (Figura 15).

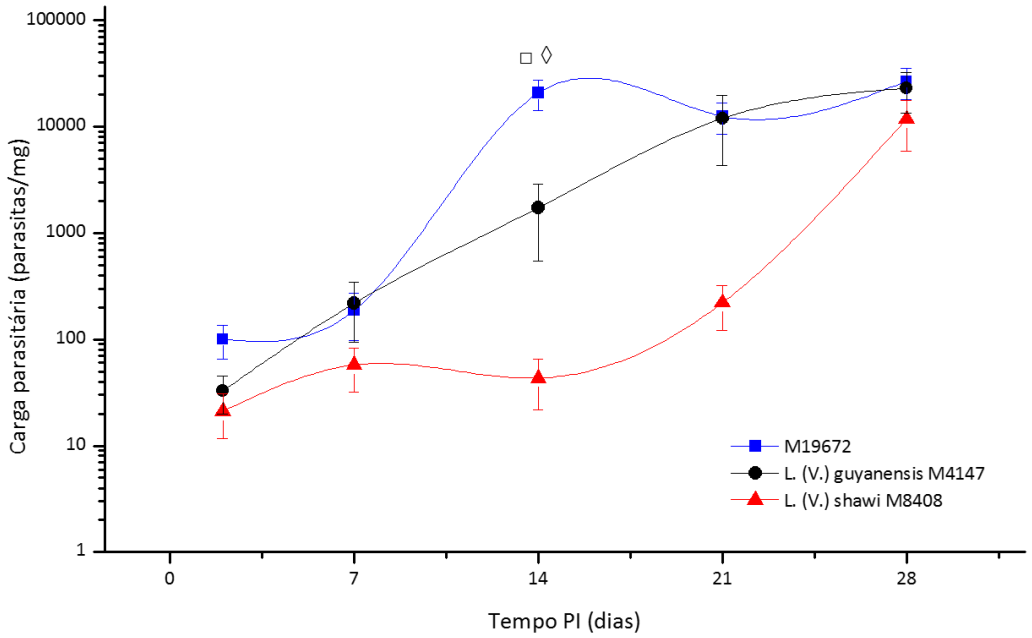

Figura 15 - Carga parasitária em pele de camundongos BALB/c causada pela infecção por *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase estacionária no coxim plantar. A quantificação foi realizada semanalmente até 28 dias PI. ◊: *L*. (*V*.) *guyanensis* × híbrido (M19672); □ = *L*. (*V*.) *shawi* × M19672. Símbolos ◊ □: indicam significância estatística (P < 0,05) entre os diferentes grupos analisados. Dados apresentados consistem da média dos valores ± erro padrão.

4.5.2. Carga parasitária no linfonodo

O parasitismo no linfonodo poplíteo de drenagem dos camundongos infectados pela cepa híbrida M19672 apresentou sua maior concentração de parasitas entre o 14° e 28° dia de infecção (Figura 16). Quando comparada com

a carga parasitária da infecção causada pelas cepas parentais, a infecção da cepa híbrida mostrou uma tendência a ser superior nos dias 7 e 14 PI (P > 0,05).

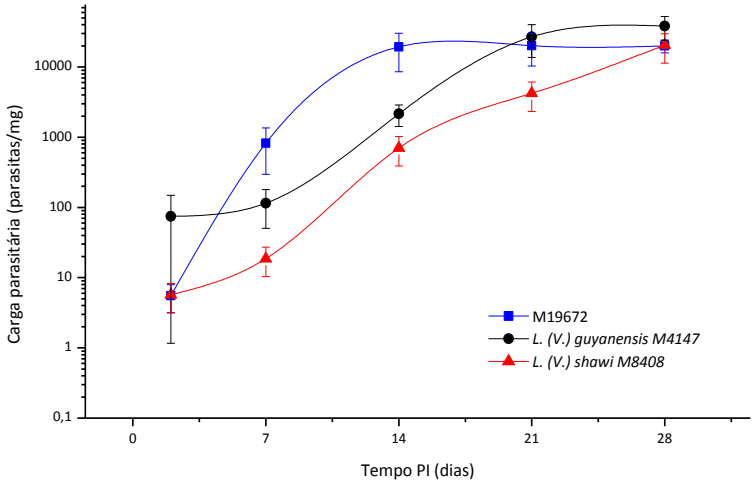

Figura 16 - Carga parasitária em linfonodo de camundongos BALB/c causada pela infecção por *L.* (*V.*) *guyanensis* (M4147), *L.* (*V.*) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase estacionária no coxim plantar. A quantificação foi realizada semanalmente até 28 dias PI. Dados apresentados consistem da média dos valores ± erro padrão.

A evolução do parasitismo de linfonodo na infecção pelas cepas parentais *L.* (*V.*) *guyanensis* e *L.* (*V.*) *shawi* apresentou um perfil semelhante entre si. O aumento da concentração de parasitas se deu a partir do 7° dia PI e seguiu constante até o 21° dia, quando apresentou aparente estabilização. Apesar de não ser encontrada diferença estatística significativa, *L.* (*V.*) *guyanensis* aparentou uma tendência a um parasitismo mais elevado comparado à *L.* (*V.*) *shawi* (Figura 16).

4.5.3. Carga parasitária no baço

A carga parasitária no baço foi avaliada a fim de se verificar se os parasitas aqui caracterizados tinham algum tropismo por esse órgão.

A cepa híbrida foi detectada no baço dos camundongos a partir do 21° dia PI, porém, em baixas concentrações (1 parasita/mg de tecido). No dia 28 PI, a carga parasitária desses híbridos nesse órgão aumentou cerca de 4×, atingindo o valor de aproximadamente 4 parasitas/mg de tecido (Figura 17).

Na infecção por *L*. (*V*.) *guyanensis* foi possível detectar parasitas no baço a partir do 21° dia, onde a concentração dos mesmos foi superior à apresentada pela cepa híbrida. No 28° dia ainda detectamos *L*. (*V*.) *guyanensis* no baço dos camundongos, no entanto, em uma concentração menor e semelhante a cepa híbrida (Figura 17). Durante a infecção por *L*. (*V*.) *shawi* não foram detectados parasitas no baço até o 28° dia PI.

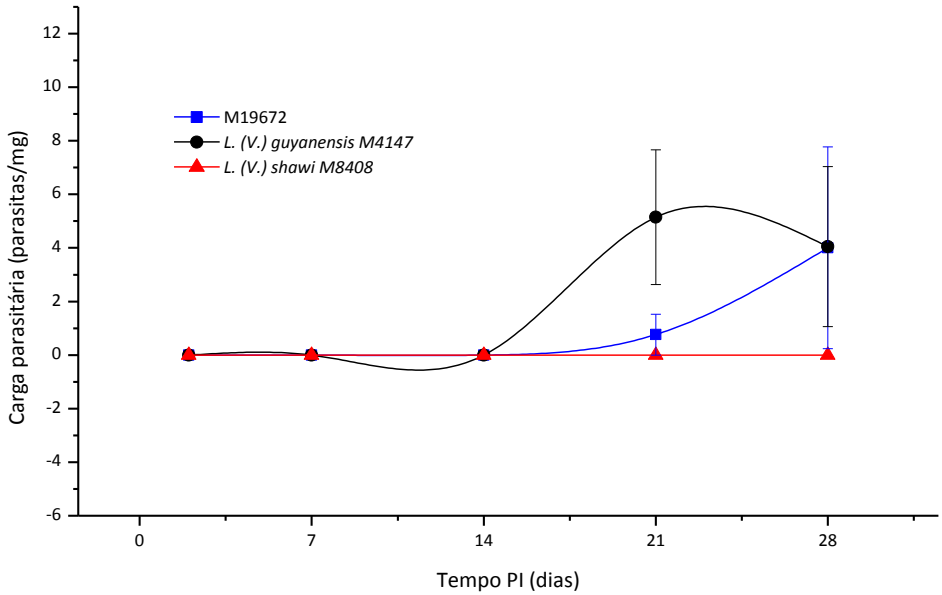

Figura 17 - Carga parasita em baço de camundongos BALB/c causada pela infecção por *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e pelo parasita híbrido selvagem (M19672). Os camundongos foram inoculados com 10^6 parasitas em fase estacionária no coxim plantar. A quantificação foi realizada semanalmente até 28 dias PI. Dados apresentados consistem da média dos valores ± erro padrão.

4.6. Análise histopatológica

Foi realizada uma análise histopatológica semi-quantitativa da lesão em pele, linfonodo e baço de camundongos BALB/c infectados pelas cepas híbridas M19672, *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147), *L*. (*V*) *shawi* (M8408), bem como dos grupos não infectados. O aspecto histológico dos tecidos dos animais controle, não infectados por *Leishmania*, mostrou-se preservado, sem nenhum tipo de lesão histopatológica.

4.6.1. Análise histopatológica na derme de camundongos infectados por *Leishmania* (*Viannia*) spp.

As alterações histopatológicas de pele dos camundongos BALB/c infectados com a cepa híbrida M19672, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) shawi* estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise semi-quantitativa das alterações histopatológicas do ponto de inoculação de cepas de *Leishmania* sp. na derme do coxim plantar traseiro de camundongos BALB/c.

	Infiltrado derme	macrófago	linfócitos	neutrófilo	eosinófilo	plasmócito	parasita	necrose
M19672	Intenso/difuso	++++	+++	+	½+	½+	++	-
	Intenso/difuso	++++	++	++	½+	-	+++	-
	Moderado/difuso	+++	++	+	½+	-	++	-
	Intenso/difuso	++++	+	++	½+	-	+++	-
	Discreto/focal	+	+	-	-	-	-	-
L. (V.) guyanensis	Intenso/difuso	++++	+	+	½+	-	++++	-
	Intenso/difuso	++++	++	+	½+	-	++++	-
	Intenso/difuso	++++	++	-	½+	-	++++	-
	Intenso/difuso	++++	++	+	½+	-	++++	-
	Intenso/difuso	++++	++	+	½+	+	+++	-
L. (V.) shawi	Discreto/focal	+	++	+	½+	+	+	-
	Discreto/focal	++	+++	+	½+	+	+	-
	Discreto/focal	-	+	-	-	-	-	+
	Discreto/focal	+	++	+	-	-	½+	+
	Discreto/focal	++	++	+	-	-	½+	+

Aos trinta e cinco dias de infecção, os animais infectados com a cepa híbrida M19672 apresentaram infiltrado inflamatório intenso e difuso na derme constituído predominantemente por células mononucleares, particularmente macrófagos e linfócitos, com raros plasmócitos de permeio (Figura 18B). A presença de leucócitos polimorfonucleares foi discreta. O parasitismo de macrófagos mostrou-se de moderado a intenso (Figura 18B).

A infeção por *L. (V.) shawi* em camundongos BALB/c se caracterizou por um infiltrado inflamatório discreto e focal na derme formado principalmente por células mononucleares, com evidência de linfócitos e raros plasmócitos e polimorfonucleares. O parasitismo da lesão foi discreto e não foram observadas áreas focais de necrose (Figura 18C).

Os animais infectados com a cepa parental *L (V.) guyanensis* mostraram aspectos histopatológicos de lesão de pele semelhantes aos da cepa híbrida com a presença de um infiltrado inflamatório intenso e difuso formado por células mononucleares, contendo maior quantidade de macrófagos, além de linfócitos e raros plasmócitos. Observam-se escassos leucócitos polimorfonucleares de permeio. O parasitismo de macrófagos foi intenso em todos os animais (Figura 18D). Presença de áreas focais de necrose na derme foram observadas na lesão cutânea dos animais infectados por *L. (V.) guyanensis* (Figura 18D).

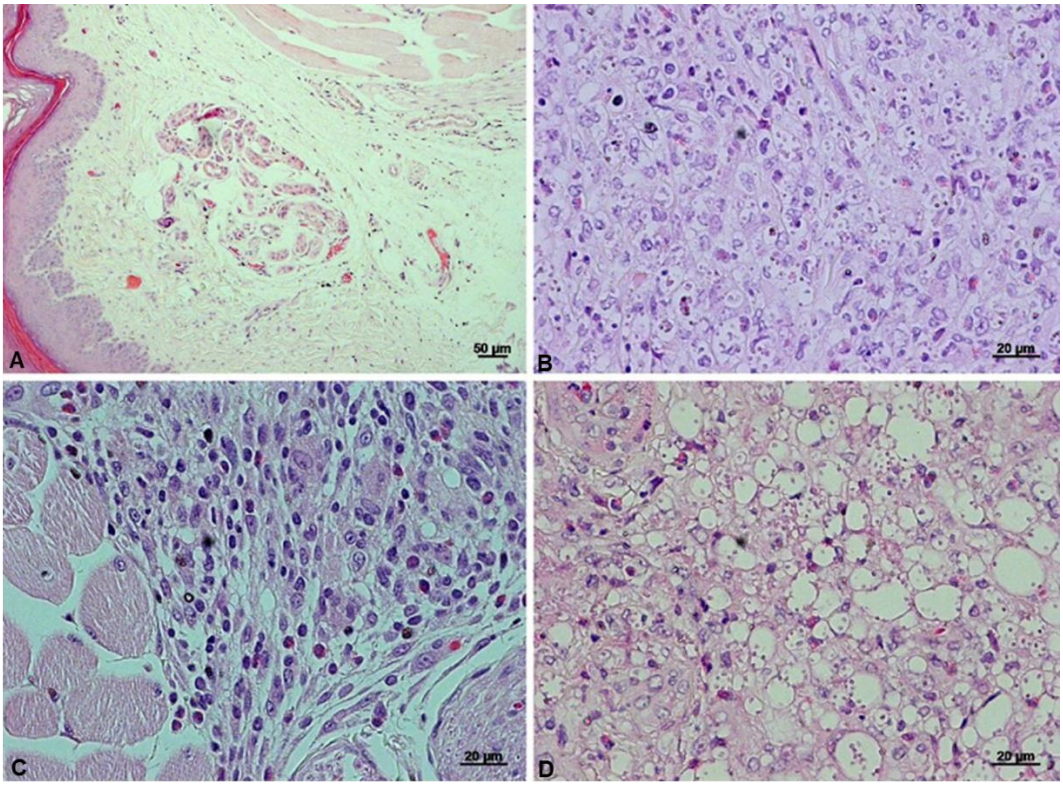

Figura 18 - Corte histológico de pele no ponto de inoculação no coxim plantar de camundongos BALB/c. (A) Pele de animal controle (B) Derme de animais infectados pela cepa híbrida selvagem M19672. Infiltrado inflamatório difuso com predomínio de macrófagos e moderado parasitismo. (C) *L*. (*V*.) *shawi.* (M8408). Infiltrado inflamatório moderado e focal, contendo numeroso linfócitos e baixo parasitismo. (D). *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147). Infiltrado inflamatório difuso; predomínio de macrófagos intensamente parasitados.

4.6.2. Análise histopatológica no linfonodo de camundongos infectados por *Leishmania* (*Viannia*) spp.

De um modo geral, alguns os animais infectados com o parasita híbrido M19672 (3 de 5), *L.* (*V.*) *guyanensis* (3 de 5) e *L.* (*V.*) *shawi* (1 de 5) apresentaram uma leve reação dos centros germinativos, acompanhada de uma discreta expansão da reação cortical e medular por macrófagos e raros plasmócitos, na quinta semana pós infecção (Figura 19 A, B e C). Formas sugestivas de amastigotas de *Leishmania* puderam ser observadas de forma discreta em

alguns linfonodos. Não houve diferença evidente entre os diferentes grupos experimentais.

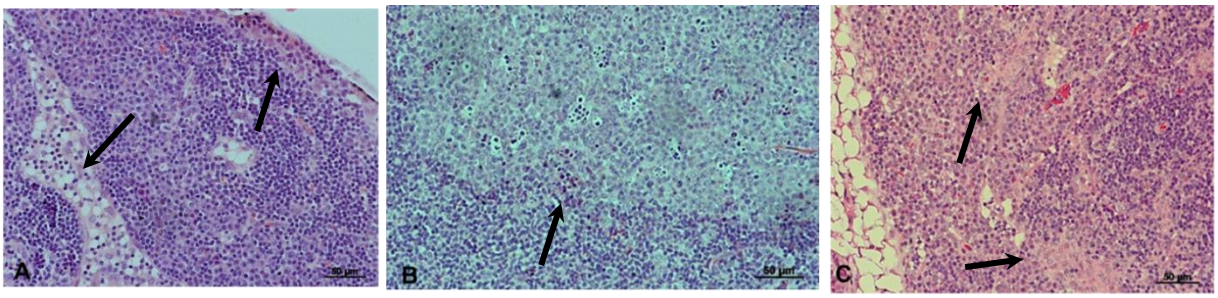

Figura 19 - Corte histológico de linfonodo poplíteo de camundongos BALB/c infectados com a cepa híbrida selvagem M19672. **(A)** Leve expansão de seios cortical e medular (setas), **(B)** com *L*. (*V*.) *shawi*. (M8408). Folículo linfoide reacional contendo centro germinativo evidente (seta) e **(C)** com *L*. (*V*.) *guyanensis*. Presença de macrófagos em seio medular (setas)

4.6.3. Análise histopatológica no baço de camundongos infectados por *Leishmania* (*Viannia*) spp.

Na quinta semana pós infecção, os animais infectados com o parasito híbrido apresentaram leve expansão da polpa vermelha (2/5) e preservação da polpa branca. Já os animais infectados por *L. (V.) guyanensis* apresentaram raros centros germinativos reacionais (2/5) com preservação da polpa vermelha. Os animais infectados com *L. (V.) shawi* mostraram preservação da polpa branca e vermelha no baço (Figura 20 A, B, C e D).

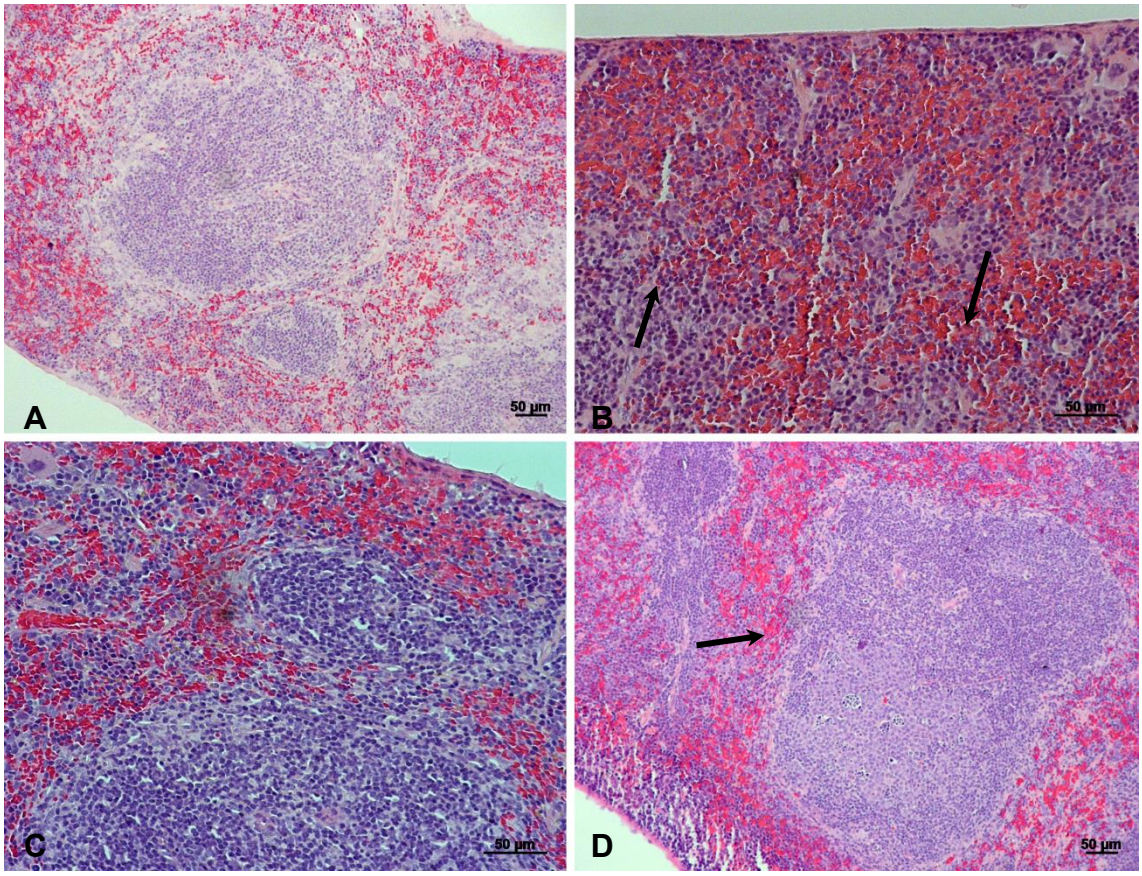

Figura 20 - Corte histológico de baço de camundongos BALB/c. (**A)** baço de animal controle (objetiva 10×) **(B)** baço de animais infectados pela cepa híbrida selvagem M19672. Leve expansão de polpa vermelha por células mononucleadas, principalmente macrófagos (setas) (objetiva 20×), **(C)** *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) mostrando a preservação da arquitetura do órgão. (objetiva 20×) e (**D)** *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147). Leve padrão reacional dos folículos linfoides.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo a comprovação genotípica da origem híbrida dos parasitas isolados na região amazônica de Santarém- PA, seguida da caracterização biológica *in vitro* e experimental *in vivo* dos mesmos, para uma melhor compreensão de como um evento de reprodução sexuada pode afetar tanto o comportamento quanto a doença associada a tais parasitas híbridos.

Na primeira etapa do presente estudo foi realizada a clonagem dos parasitas, uma vez que estes foram isolados em uma região onde circulam cinco das sete principais espécies de *Leishmania* sp. envolvidas com a LTA no Brasil (10,87). Por isso, era de extrema importância a confirmação da homogeneidade dos isolados, descartando assim, a possibilidade de infecção mista dos pacientes dos quais as cepas foram isoladas. Foram utilizados dois diferentes protocolos para a clonagem dos parasitas. O primeiro protocolo foi o de cultivo de formas promastigotas em meio de cultura sólido e permitiu o isolamento de clones para 4 das 7 cepas testadas, mostrando uma eficiência de 57%, que se mostrou similar a encontrada por Pacheco *et.al. (*1990) (88). Apesar de bastante seguro, este método levou cerca de 50 dias para a detecção de parasitas nas placas, não foi simples de ser reproduzido e não funcionou para alguns isolados, mesmo após algumas tentativas. Devido à demora e a dificuldade de se obter os clones para algumas cepas, lançou-se mão do protocolo baseado no método de diluição limitante. Esse método permitiu o isolamento de clones dos três isolados restantes em aproximadamente 20 dias. Cabe ressaltar aqui que os resultados

foram satisfatórios já na primeira com rendimento do número de clones superior ao método de cultivo em meio sólido.

Uma vez isolados os clones, foi realizado a extração de DNA e se iniciou a caracterização pelo método *hsp*70 PCR-RFLP, utilizando as enzimas de restrição *Hae*III e *BstUI*. Ensaios tendo como alvo, as sequências que codificam para a proteína de choque térmico de 70 kD (*hsp*70) vem sendo amplamente utilizados para a identificação de *Leishmania* sp. Tais sequências foram apontadas como possível padrão-ouro na identificação específica de *Leishmania* (89–91). Esse alvo tem apresentado resultados satisfatórios na distinção entre as diferentes espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, permitindo inclusive, a distinção entre espécies muito próximas, como *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) s. *shawi* (81,89).

A clivagem do fragmento de *hsp*70 publicado por Graça *et al*. (2012) e utilizada neste estudo, permite a distinção entre as principais espécies causadoras de LTA no Brasil com o uso da enzima de restrição *Hae*III, porém, não possibilita a distinção entre *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) *lainsoni,* espécies presentes na região de Santarém (10,77). Para se certificar a descendência a partir de *L*. (*V*.) *shawi*, os isolados foram submetidos a clivagem do mesmo fragmento pela enzima *Bst*UI, que permite a distinção entre *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) *lainsoni.* Desta forma, se confirmou que os híbridos aqui caracterizados descendem de *L. (V.) shawi.*

A importância de se fazer a distinção entre espécies é crucial, sobretudo em áreas com coexistência de diversas espécies do parasita e a associação de *hsp70* PCR com as enzimas de restrição tem possibilitado a obtenção de

resultados bastante satisfatórios na distinção das espécies presentas na região amazônica do Pará (92).

Através da caracterização dos clones pelo método *hsp*70 PCR RFLP foi possível confirmar a homogeneidade dos isolados, sendo que os clones de cada isolado apresentaram o mesmo perfil de clivagem. No entanto, quando comparado o perfil de RFLP entre os diferentes isolados, pudemos observar dois padrões distintos de clivagem. Um deles correspondeu a um perfil heterozigoto e o outro a um perfil homozigoto.

O padrão heterozigoto apresentou-se intermediário entre as espécies *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis*. Este padrão confirmou a natureza híbrida dos isolados M15987, M19672 e M19676. Padrões heterozigotos são comumente utilizados para confirmar a identidade híbrida de parasitas do gênero *Leishmania* (37,70,93). De acordo com estudos que descreveram eventos de reprodução sexuada no gênero *Leishmania*, os parasitas herdam no mínimo um lote de cromossomo de cada parental, sendo inicialmente heterozigotos (31,36,38).

As cepas M15983, M15984, M15988 e M19697 apresentaram o perfil de clivagem homozigoto, compatível com a espécie parental, *L*. (*V*.) *shawi*. O modelo proposto por Rogers *et.al.* (2014) propôs que eventos de reprodução sexuada são seguidos de eventos de endogamia, que ocorre exclusivamente entre a prole híbrida (36,94). O perfil homozigoto encontrado, portanto, pode ter sido resultado de eventos de endogamia entre os híbridos, uma vez que tais eventos estão associados à perda da heterozigosidade de alelos (36,37,94). Para a confirmação dos perfis encontrados na clivagem dos produtos de *hsp*70PCR, foi realizada a clonagem e o sequenciamento de produtos de PCR para os isolados homozigotos e heterozigotos (dados não mostrados). A

sequencias obtidas para cada clone dos produtos de PCR, confirmaram a presença única dos alelos característicos de *L*. (*V*.) *shawi* nos isolados homozigotos e a presença dos alelos de *L*. (*V*.) *shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis* nos heterozigotos (Anexo C).

É válido ressaltar ainda, que as cepas com perfil homozigoto foram fenotipicamente caracterizados por Jennings *et al.* (2014) e apresentaram o perfil isoenzimático para as enzimas Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e Manose fosfato isomerase (MPI), compatíveis com o perfil de *L*. (*V*.) *guyanensis* (10). Os autores demonstraram ainda que o perfil das isoenzimas 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) e aspartato aminotransferase (ASAT), bem como da ligação aos anticorpos monoclonais, foi intermediário entre *L*. (*V*.) *s. shawi* e *L*. (*V*.) *guyanensis*. Desta forma, a análise conjunta de caracteres fenotípicos e genotípicos confirmaram a identidade híbrida dos parasitas e que o perfil correspondente à *L*. (*V*.) *s. shawi* consiste de uma manifestação de homozigose apresentada para estes alelos. O perfil homozigoto nos alerta para a identificação de parasitas em regiões com ocorrência de múltiplas espécies por um único alvo.

A análise utilizando o ensaio de SNP-CAPS mostrou uma intensidade semelhante entre os híbridos com perfil homozigoto dos alelos de *hsp*70 e *L*. (*V*.) s. *shawi*, sugerindo que esses parasitas apresentam o mesmo número de cópias destes alelos. Já os híbridos de perfil heterozigoto apresentaram uma intensidade mais elevada e isso sugere alteração na ploidia dos mesmos, com maior participação de *L*. (*V.) guyanensis* na herança desses alelos. Os isolados heterozigotos M19672 e M19676 apresentaram o perfil de *L*. (*V*.) *guyanensis* para duas das três isoenzimas analisadas por Jennings *et.al.* (2012). Já o isolado

M15897 apresentou o perfil de isoenzimas semelhante a *L*. (*V*.) *guyanensis* para todas as enzimas analisadas. Conjuntamente à análise de tais achados podem indicar uma maior participação de *L*. (*V*.) *guyanensis* na expressão fenotípica dos híbridos, que pode ser reflexo da maior contribuição desta espécie no genótipo desses. A partir do ensaio de SNP-CAPS, sugere-se uma possível variação da ploidia nos heterozigotos. A aneuploidia tem sido apontada como característica amplamente difundida no gênero *Leishmania*, em especial, dentre organismos do subgênero *Viannia*. Estudos voltados para uma melhor compreensão dessa característica, apontaram a sua origem no próprio processo de divisão mitótica (63,95). A aplicação da ferramenta SNP-CAPS tem sido utilizada para a inferência da ploidia, inclusive entre linhagens híbridas (30,36). Estudos produzindo híbridos experimentalmente obtiveram altas taxas de poliploides e a maior proporção de determinado parental interferiu claramente na expressão fenotípica dos híbridos (38).

A partir da confirmação genotípica da identidade híbrida dos isolados, iniciamos a caracterização do comportamento biológico *in vitro* e experimental *in vivo* dos mesmos.

O comportamento *in vitro* foi feito pela análise da curva de crescimento dos isolados híbridos em meio de cultura e sua comparação com as espécies parentais. Foram realizadas curvas de crescimento em cultura axênica em dois momentos diferentes, no 4° e 12° repique após o isolamento do hospedeiro vertebrado. A comparação da curva de crescimento dos híbridos com as espécies parentais visou identificar possíveis padrões de comportamento para melhor compreensão da biologia destes organismos.

A associação de informações a respeito de propriedades fenotípicas de híbridos pode ser útil no entendimento do controle genético sob traços ligados à patogenia, virulência e tropismo de parasitas (96). Akopyants *et.al.* (2009) demonstraram experimentalmente a herança dominante do comportamento de "clumping" em meio de cultura em híbridos de *L*. (*L*.) *major*, demonstrando a influência de fatores hereditários na determinação do comportamento dos parasitas.

A curva de crescimento em culturas axênicas é uma forma bastante utilizada na descrição do comportamento *in vitro* de *Leishmania* sp. e algumas descrições do padrão de crescimento para híbridos já foram relatadas na literatura (32,96,97).

Nossos achados demonstraram que os sete híbridos entre *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) s. *shawi* apresentaram um padrão variável de comportamento reprodutivo entre os diferentes isolados logo após o isolamento do hospedeiro mamífero. A taxa de crescimento apresentada pelos híbridos foi inferior às das espécies parentais, *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) s. *shawi* e isso pareceu contribuir com a viabilidade da cultura ao longo do tempo.

Importante observar que as cepas parentais apresentaram comportamento muito parecido entre si em meio de cultura. A homogeneidade entre as parentais, não limitou a plasticidade fenotípica expressa pelos diferentes isolados em seus padrões de comportamento. Estudos realizados com híbrido entre *L*. (*V*.) *braziliensis* e *L*. (*V*.) *peruviana*, observaram resultados diferentes do presente estudo, onde o comportamento dos híbridos reproduziu o padrão apresentado pelas cepas parentais, sem variação adicional observada (96,97). Os autores relataram ainda, que o crescimento diante de sucessivas passagens

pelo meio de cultura, melhoraram o desempenho da parental, porém, o padrão de comportamento dos híbridos não foi alterado (96). Os híbridos aqui caracterizados, no entanto, apresentaram um comportamento *in vitro* diversificado com relação ao comportamento das parentais, que na curva de crescimento referente à 4ª passagem, pareceu conferir vantagem, alcançando uma concentração maior de parasitas mais cedo e sua manutenção por mais tempo em cultura.

A influência da manutenção *in vitro* sobre o crescimento de *Leishmania* é apontada como um fator de estresse que pode resultar em perda de vigor dos parasitas, influenciando negativamente na perda de infectividade, virulência, bem como na taxa de crescimento (98,99). Aqui observou-se que ao se realizar curva de crescimento em 12ª passagem do parasita após isolamento, houve um reflexo no início da fase log, na taxa de crescimento e uma redução da densidade celular de todos os parasitas. No entanto, o efeito sobre cepas parentais pareceu ser mais significativo do que sobre as híbridas, que apresentaram novamente uma diversidade de manifestações fenotípicas, o que sugere uma vantagem sobre as cepas parentais frente a adversidade. Relatos na literatura mostram que híbridos de *L*. (*L*.) *infantum* tiveram seu desempenho reduzido frente a presença de antibióticos no crescimento de cultura, mesmo sendo duplo-resistentes (32). Dentro desse contexto, é importante salientar que híbridos produzidos experimentalmente estão menos expostos a situações adversas, quando comparados a híbridos que surgiram e se estabeleceram no ambiente natural.

É importante salientar que apesar da importância das espécies *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L*. (*V*.) *shawi na* patogenia da LTA no Brasil, poucos são os

trabalhos da literatura que visam conhecer aspectos biológicos destas espécies. Com relação à cepa M8408 de *L*. (*V*.) *shawi*, Passero *et.al.* (2011) ao realizarem a curva de crescimento, observaram o início da fase log no 3° dia de cultivo em meio RPMI, que corresponde ao aqui encontrado durante a 4° passagem após o isolamento (100). Dois outros trabalhos existentes com *L*. (*V*.) *shawi* utilizaram outras cepas que não a referência M8408 e não avaliaram o crescimento *in vitro* dos parasitas (73,74). Com relação a cepa M4147 de *L*. (*V*.) *guyanensis* foi realizado estudo prévio, no entanto, não foram relacionados aspectos do crescimento *in vitro* (101).

O comportamento *in vivo* dos parasitas híbridos, foi analisado através do desenvolvimento da lesão no sítio de inoculação, da quantificação da carga parasitária em pele (sítio de inoculação), linfonodo e baço durante o curso da infecção, bem como bem como foi feita analise histopatológica da lesão de pele, linfonodo e baço. Cabe aqui salientar que, a cepa híbrida M19672 foi escolhida por apresentar o perfil heterozigoto nos ensaios de *hsp*70PCR-RFLP e pela maior taxa de crescimento dentre as cepas caracterizadas *in vitro*. Foram realizados ainda, grupos experimentais infectados com as espécies parentais *L*. (*V*.) *shawi* (M8408) e *L*. (*V*.) *guyanensis* (M4147) para a comparação do perfil da infecção causada pelo parasita híbrido e suas espécies parentais. No presente estudo, foi realizada uma descrição mais detalhada do curso da infecção, descrição da carga parasitária e análise histopatológica dos espécimes pele, linfonodo e baço nos grupos experimentais de BALB/c infectados com as espécies parentais, uma vez existem muito poucos trabalhos na literatura analisando a infecção *in vivo* dessas espécies (10,100).

A evolução da lesão em coxim plantar dos camundongos infectados pelo parasita híbrido foi caracterizada pelo seu desenvolvimento abrupto nos tempos iniciais de infecção. No 21° dia PI foi observado o maior inchaço da pata e esse acompanhado de alta carga parasitária em pele e linfonodo que se iniciou a partir do 14° dia PI. Nesse período houve uma aparente estabilização da carga parasitária nos dois órgãos, no entanto, houve uma redução progressiva do inchaço da pata dos camundongos. A evolução da lesão causada pelos híbridos M19672 apresentou um perfil mais precoce do que a doença provocada por seus parentais. O crescimento da pata ocorreu de forma progressiva a partir de 14 dias PI, atingindo seu maior pico entre 21 e 28 dias de infecção, com regressão posterior.

A lesão causada por *L.* (*V.*) *guyanensis* apresentou um crescimento contínuo tornando-se expressivo a partir do 21° dia, quando simultaneamente foram observadas as maiores cargas parasitárias em pele e linfonodo. Nossos resultados foram discordantes dos encontrados por Sousa-Franco *et.al* (2005), que descreveram um perfil de resistência de camundongos BALB/c à cepa M4147 de *L*. (*V*.) *guyanensis* (101). Os achados de Pires *et al.* (2015) demonstraram o surgimento de uma lesão progressiva em camundongos BALB/c pela cepa PLR6 de *L*. (*V*.) *guyanensis,* cuja evolução da lesão se deu de forma um pouco distinta, mas ainda assim, representou um perfil de susceptibilidade, mais condizente com nossos achados.

L. (*V*.) *shawi* apresentou uma lesão muito discreta com leve inchaço, porém progressivo a partir do 35° dia, mostrando uma evolução mais tardia dentre os grupos analisados. A carga parasitária na pele de camundongos infectados por *L*. (*V*.) *shawi* começou a crescer de forma mais progressiva a partir

do 14° dia e isso pode estar relacionado à manifestação mais tardia da lesão. No linfonodo, a carga parasitária de *L*. (*V*.) *shawi* foi inferior, porém com perfil crescente semelhante ao de *L*. (*V*.) *guyanensis*. Para as cepas parentais, foi observado que a elevação da parasitemia em pele e linfonodo, mostraram associação com o aumento da lesão.

O tropismo de cepas tegumentares para órgãos viscerais é sabidamente negativo, embora *L* (*V*.) *shawi* tenha sido isolada de víscera de edentados (102). A detecção de *L*. (*V*.) *guyanensis* e dos parasitas híbridos no baço foi positiva a partir do 21° dia PI. Porém, experimentos de diluição limitante de 60 dias PI possibilitaram a detecção dessa cepa neste órgão (dados não mostrados). Análises histopatológicas de cortes corados por hematoxilina-eosina (HE) demonstraram a histologia preservada, ausência de infiltrado inflamatório e de macrófagos parasitados. O aumento do órgão também não foi observado (dados não mostrados). Portanto, a detecção de *L*. (*V*.) *guyanensis* e dos híbridos no baço se deu provavelmente em decorrência da circulação sistêmica associada às altas cargas parasitárias dos mesmos. A demora do aparecimento de *L*. (*V*.) *shawi* no baço, pode ser reflexo do aumento tardio da parasitemia observada na nesta espécie.

Quando comparada a evolução da lesão da cepa híbrida com as parentais, os parasitas híbridos apresentam um perfil mais agudo de infecção. A aparente regressão da lesão e a estabilização do parasitismo em 28 dias, pode sugerir um controle da doença pelo sistema imune do hospedeiro. A progressiva diminuição da lesão nas patas, pode ser indício de uma queda na carga parasitária. Um estudo piloto realizado até os 60 dias (dados não mostrados), detectou a permanência dos parasitas híbridos mesmo diante da redução no

inchaço da pata. Para o melhor esclarecimento da manutenção do parasitismo no hospedeiro em tempos tardios da infecção, experimentos de diluição limitante estão em curso. A expressão de fenótipos de baixa virulência em parasitas e sua manutenção em baixas cargas parasitárias no hospedeiro é considerada uma estratégia vantajosa, pois permite a transmissão de hospedeiros críticos para vetores, mantendo assim um ciclo de vida estável (32).

No que tange aos aspectos histológicos das lesões de pele, animais inoculados com a cepa hibrida M19672 apresentaram infiltrado inflamatório intenso e difuso, formado principalmente por macrófagos (3 a 4+) e linfócitos e com moderado parasitismo. Esse padrão histopatológico se assemelhou ao demonstrado em lesão animais infectados por *L*. (*V*.) *guyanensis* com infiltrado também difuso, porém com mais alta densidade de macrófagos e intenso parasitismo. Por outro lado, a infecção por *L. (V.) shawi* mostrou alterações mais discretas com infiltrado mononuclear discreto e parasitismo mais discreto.

Apesar da evolução da infecção pelo hibrido M19672 apresentar perfil distinto ao das cepas parentais, a dinâmica do parasitismo e alterações histopatológicas da lesão guardam mais semelhança com a cepa parental *L*. (*V*.) *guyanensis*.

O padrão histológico no baço dos animais infectados com a cepa M19672 e das suas cepas parentais se mostrou preservado e muito próximo ao de um animal controle sem infecção. O aumento desse órgão também não foi observado (dados não mostrados). Portanto, a detecção de *L*. (*V*.) *guyanensis* e da cepa híbrida no baço, pela diluição limitante, se deu, provavelmente, em decorrência da circulação sistêmica associada a altas cargas parasitárias

apresentada pelos mesmos. A demora do aparecimento de *L*. (*V*.) *shawi* no baço, pode ser reflexo do aumento tardio da parasitemia observada na nesta espécie.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1- A clonagem dos isolados oriundos de Santarém-PA juntamente com ensaios de *hsp*70 PCR RFLP confirmou a homogeneidade dos isolados.

2- A ferramenta *hsp*70 PCR RFLP confirmou a identidade híbrida dos parasitas, bem como detectou a expressão de perfis homozigotos e heterozigotos dos alelos referentes a proteína de choque térmico.

3- O comportamento *in vitro* do parasita híbrido M19672 demonstrou maior plasticidade fenotípica em meio de cultura em relação às espécies parentais.

4- O comportamento experimental *in vivo* do parasita híbrido M19672 mostrou uma evolução da lesão na pele e regressão mais precoces do que as cepas parentais *L*. (*V*.) *guyanensis* e *L. (V.) shawi*. O período de maior desenvolvimento da lesão foi acompanhado da maior carga parasitária na pele e linfonodo na cepa híbrida.

5- Os parasitas híbridos e a cepa parental *L*. (*V*.) *guyanensis* foram observados no baço durante momentos mais tardios da infecção, porém não causaram lesão no órgão.

6- A alteração histopatológica da lesão causada por esta cepa se mostrou intermediária entre *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*, guardando, no entanto, mais características desta última.

7- A regressão precoce da lesão causada pelos parasitas híbridos associada à manutenção da parasitemia pode refletir um aspecto vantajoso para a manutenção no ciclo de transmissão.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. Anexo A

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/03/2012, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **048/12** intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE CEPAS DE LEISHMANIA SP. ISOLADAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ORIUNDOS DA REGIÃO AMAZÔNICA, SANTARÉM-PA, BRASIL."** que utilizará **189** animais da espécie **Camundongos (Mus musculus) isogênicos da linhagem Balb/C.**, apresentado pelo **Departamento de Patologia.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Márcia Dalastra Laurenti
Pesquisador (a) Executante: Ana Carolina Stocco de Lima

CEP-FMUSP, 08 de Março de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

7.2. Anexo B

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **11.04.12, APROVOU A MUDANÇA DE PESQUISADOR RESPONSÁVEL** referente ao Protocolo de Pesquisa nº **048/12** intitulado: **"Caracterização Biológica e Molecular de cepas de Leishmania sp. isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana oriundos da região amazônica, Santarém-PA, Brasil."** de: **Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti** para "**Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett**", apresentado pelo **Departamento de Patologia,** tendo como pesquisador executante **Ana Carolina Stocco de Lima.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa.

CEP-FMUSP, 11 de abril de 2012.

Prof. Dr.Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo , 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

7.3. Anexo C

```
                                  10         20         30         40         50         60         70         80         90        100
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
M19697 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGATGC GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GAGAGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19697 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAAAGA-GA GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- GAGAGGAGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19697 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAAGAA-GC GGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- CGAGGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15984 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA--GACA GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GGG-GGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15984 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAAAGAAGC GGGG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GAGCGGAGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15984 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA--GACA GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GGG-GGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15984 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAAAGAAGC GGGG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GAGCGGAGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA--GACA GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GGGGG-AGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         --ACGAGATC GAGCGCATGG TGAATGAAGC GGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGG GGGGGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG -GAA--TAAG GGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGG AGGGG-AGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA--GAGC GGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGG AGAGG-AGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAATGAAGC GGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGG GGGGGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA--GACA GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GGG-GGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG -GAA--TAAG GGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGG AGGGG-AGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M15988 homozigoto         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA--GAGC GGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGG AGAGG-AGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19676 heterozigoto alelo 1 -GACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGATGC GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- GAAAGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19676 heterozigoto alelo 1 -GACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGATGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GAGAGGAGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19672 heterozigoto alelo 1 ----GAGATC GAGCGCATGG TGAA-GAAGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GGA-GGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19987 heterozigoto alelo 1 GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA-GAAGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGG GAAAA-AGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19987 heterozigoto alelo 1 GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA-GATGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC G-GAGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19672 heterozigoto alelo 1 GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA-GAAGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GGA-GGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19676 heterozigoto alelo 1 -GACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGATGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GAGAGGAGGG GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19676 heterozigoto alelo 1 GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGATGC GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- GAAAGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19672 heterozigoto alelo 2 ----GAGATC GAGCGCATGG TGAA-GAAGC AGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- --GGGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19672 heterozigoto alelo 2 GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAA-GAAGC AGCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- --GGGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19672 heterozigoto alelo 2 ----GAGATC GAGCGCATGG TGAACGAAGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- GGGAGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19672 heterozigoto alelo 2 GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGAAGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAG- GGGAGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19676 heterozigoto alelo 2 GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGAAGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GAGAGGAGGA GAAGAACGGT CTGGAGAACT
M19676 heterozigoto alelo 2 -GACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGAAGC GACG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GAGAGGAGGA GAAGAACGGT CTGGAGAACT
L.(V.) shawi              GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGATGC GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GCGTGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT
L.(V.) guyanensis         GGACGAGATC GAGCGCATGG TGAACGATGC GTCG--AAGT ACGAGCAGGC CGACAAGATG CAGCGCGAGC GCGTGGAGGC GAAGAACGGT CTGGAGAACT

                                 110        120        130        140        150        160        170        180        190        200
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
M19697 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GAT--GGA-G GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19697 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GAA--GGA-G GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19697 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GCA--GGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15984 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15984 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTCTCAA GTC--AGAAG AAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGC
M15984 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15984 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTCTCAA GTC--AGAAG AAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGC
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTT--TA GCAATGAAGG AAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTT-CAA GC--TGAGAG GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTTTCAA ACA-TTAAAA AAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTT--TA GCAATGAAGG AAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTT-CAA GC--TGAGAG GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15988 homozigoto         ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCTTTCAA ACA-TTAAAA AAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19676 heterozigoto alelo 1 ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CTA GAA--GGA-G GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19676 heterozigoto alelo 1 ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GA---GGA-G GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19672 heterozigoto alelo 1 ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
```

Continua

```
                                        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
M15987 heterozigoto alelo 1     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-TTA GAA--AATCG AGAAACGACA GGGCCGCTCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M15987 heterozigoto alelo 1     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GA---GGA-G GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19672 heterozigoto alelo 1     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19676 heterozigoto alelo 1     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GA---GGA-G GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19676 heterozigoto alelo 1     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CTA GAA--GGA-G GAGAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
M19672 heterozigoto alelo 2     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GA---AGGAG GAGAGCGACA GGACCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACACGG
M19672 heterozigoto alelo 2     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GA---AGGAG GAGAGCGACA GGACCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACACGG
M19672 heterozigoto alelo 2     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GA---GGGAG GAGAGCGACA GGACCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACACGG
M19672 heterozigoto alelo 2     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GA---GGGAG GAGAGCGACA GGACCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACACGG
M19676 heterozigoto alelo 2     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-TAC GAA--ACATG AAGAGCGACA GGACCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACACGG
M19676 heterozigoto alelo 2     ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-TAC GAA--ACATG AAGAGCGACA GGACCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACACGG
L.(V.) shawi                    ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGGCCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACGCGG
L.(V.) guyanensis               ACGCGTACTC GATGAAGAAC ACGATCGCCG ACACGAACGT GTCCGG-CAA GC--TGGAGG A-GAGCGACA GGACCGCGCT GAACTCGGCG ATCGACACGG

                                        210       220       230       240
                                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| .
M19697 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19697 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19697 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15984 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15984 homozigoto               CGCTGTAGTG GCTGAACAGC C-CCAGGCGG C-CCGAAGGA A
M15984 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15984 homozigoto               CGCTGTAGTG GCTGAACAGC C-CCAGGCGG C-CCGAAGGA A
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGA---- -
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAA--- -
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15988 homozigoto               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19676 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19676 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19672 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15987 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M15987 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19672 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19676 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19676 heterozigoto alelo 1     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19672 heterozigoto alelo 2     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19672 heterozigoto alelo 2     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19672 heterozigoto alelo 2     CGCTGGAGTA GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19672 heterozigoto alelo 2     CGCTGGAGTA GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
M19676 heterozigoto alelo 2     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCCAAGGA -
M19676 heterozigoto alelo 2     CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCCAAGGA -
L.(V.) shawi                    CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
L.(V.) guyanensis               CGCTGGAGTG GCTGAACAGC AACCAGGAGG CGTCGAAGGA -
```

Legenda: Alinhamento das sequências dos produtos de PCR (234 pares de bases) obtidos a partir de *L.* (*V.*) *shawi* M8408, *L.* (*V.*) *guyanensis* M4147 e isolados híbridos. Alelo homozigoto representa alelo herdado de *L.* (*V.*) *shawi,* alelo heterozigoto 1: representa alelo herdado de *L.* (*V.*) *guyanensis e alelo* heterozigoto representa alelo herdado de *L.*(*V.*) *shawi.* Setas indicam sítios de restrição de *Hae III* (GGCC).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Memórias do Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2004 May;99(3):239–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273794
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2nd ed. Brasília; 2013. 180 p.
3. Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2007 Mar;76(3):573–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360886
4. Rougeron V, Waleckx E, Hide M, DE Meeûs T, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, et al. PERMANENT GENETIC RESOURCES: A set of 12 microsatellite loci for genetic studies of *Leishmania braziliensis*. Mol Ecol Resour [Internet]. 2008 Mar 28;8(2):351–3. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-8286.2007.01953.x
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Pará/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 5th ed. Brasilia; 2011. 37 p.
6. Lainson R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. Rev Para Med. 1997;11:29–40.

7. Silveira F, Lainson R, De Brito A, Oliveira M, Paes M, De Souza A, et al. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CEJUP, editor. Doenças Infecciosas e parasitárias: Enfoque Amazônico. Belém: Leão, R. N. Q.; 1997. p. 619–630.

8. Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Santarém. Informações Municipais de Santarém SEMMA_CIAM 2013 [Internet]. 2013. Available from: http://www.santarem.pa.gov.br/arquivosdb/basico1/0.668764001357580532__informacoes_2.pdf

9. Santos TV. CASUÍSTICA DAS LEISHMANIOSES NO ESTADO DO PARÁ COM ÊNFASE À MICRORREGIÃO DE CASTANHAL: Um levantamento das notificações no período de 2007 a 2011. Amaz em Foco. 2013;2(2):157–67.

10. Jennings YL, de Souza AAA, Ishikawa EA, Shaw J, Lainson R, Silveira F. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous Leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* × *Leishmania* (*Viannia*) *shawi shawi*. Parasite [Internet]. 2014 Aug 4;21:39. Available from: http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2014039

11. Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annu Rev Microbiol [Internet]. 1987;41:363–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2825587

12. ESPINOSA OA, SERRANO MG, CAMARGO EP, TEIXEIRA MMG, SHAW JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids

presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology [Internet]. 2016;1–13. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182016002092

13. Shaw JJ, Lainson R. Ecology and epidemiology: New world. In: Peters W and Killick-Kendrick R, editor. The Leishmaniases in biology and medicine Volume I Biology and epidemiology. London: Academic Press; 1987. p. 291–363.

14. Miranda TM De, Malaquias LCC, Escalda PMF, Ramalho KC, Coura-Vital W, Silva AR Da, et al. Descriptive study of American tegumentary Leishmaniasis in the urban area of the Municipality of Governador Valadares, Minas Gerais State, Brazil. Rev Pan-Amazônica Saúde [Internet]. 2011 Mar;2(1):27–35. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232011000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=en

15. Silva LMR da, Cunha PR. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas - São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. An Bras Dermatol [Internet]. 2007 Dec;82(6):515–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962007000600003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

16. Alexander J. Unusual axonemal doublet arrangements in the flagellum of *Leishmania* amastigotes. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1978 Jan;72(4):345–7. Available from: http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/0035-9203(78)90124-4

17. Blank C, Bogdan C, Bauer C, Erb K, Moll H. Murine epidermal Langerhans

cells do not express inducible nitric oxide synthase. Eur J Immunol [Internet]. 1996 Apr;26(4):792–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8625969

18. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. J Cell Sci [Internet]. 1999 Sep;112 Pt 18:2993–3002. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462516
19. Gontijo B, de Carvalho M de LR. [American cutaneous Leishmaniasis]. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2003;36(1):71–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12715066
20. Lainson, R.; Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.;Killick-Kendrick R, editor. The Leishmaniases in biology and medicine. 1987. p. 1–120.
21. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. Rev Pan-Amazônica Saúde [Internet]. 2010 Jun;1(2):13–32. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
22. Teixeira DE. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. 1st ed. Riio de Janeiro; 2013. 64 p.
23. Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr Mol Med [Internet]. 2004 Sep 1;4(6):601–9. Available from: http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5240&volume=4&issue=6&spage=601
24. Michalick M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves D, editor.

Parasitologia Humana. Editora Atheneu; 2002. p. 33–53.

25. da Silveira FT. Patogenia da leishmaniose tegumentar americana: caracterização clínica, histopatológica e imunopatológica da leishmaniose cutânea disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Universidade de São Paulo; 2001.

26. Tibayrenc M, Ayala FJ. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. Parasitol Today [Internet]. 1991 Sep;7(9):228–32. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016947589190234F

27. Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Brenière SF, Dardé ML, et al. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1991 Jun 15;88(12):5129–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675793

28. Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, et al. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. Acta Trop [Internet]. 1995 Aug;59(4):293–307. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533665

29. Evans DA, Kennedy WP, Elbihari S, Chapman CJ, Smith V, Peters W. Hybrid formation within the genus *Leishmania*? Parassitologia [Internet]. 1987;29(2–3):165–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3508260

30. Odiwuor S, De Doncker S, Maes I, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Natural *Leishmania donovani*/*Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia. Infect Genet Evol [Internet]. 2011 Dec;11(8):2113–8. Available from:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134811001328

31. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. Science [Internet]. 2009 Apr 10;324(5924):265–8. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1169464

32. Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Jiménez M, Molina R, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R, et al. First evidence of intraclonal genetic exchange in trypanosomatids using two *Leishmania infantum* fluorescent transgenic clones. Bates PA, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014 Sep 4;8(9):e3075. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003075

33. Kreutzer RD, Yemma JJ, Grogl M, Tesh RB, Martin TI. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1994 Sep;51(3):301–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943548

34. Russell R, Iribar MP, Lambson B, Brewster S, Blackwell JM, Dye C, et al. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 1999 Sep 20;103(1):71–7. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685199001176

35. Russell R, Pilar Iribar M, Lambson B, Brewster S, Blackwell JM, Dye C, et al. Corrigendum to “Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*”[Mol. Biochem. Parasitol. 103 (1999) 71–77]. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 2000 Apr 15;107(2):331–331.

Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016668510000222X

36. Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, et al. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. Didelot X, editor. PLoS Genet [Internet]. 2014 Jan 16;10(1):e1004092. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004092

37. Inbar E, Akopyants NS, Charmoy M, Romano A, Lawyer P, Elnaiem D-EA, et al. The mating competence of geographically diverse *Leishmania* major strains in their natural and unnatural sand fly vectors. Heitman J, editor. PLoS Genet [Internet]. 2013 Jul 25;9(7):e1003672. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003672

38. Romano A, Inbar E, Debrabant A, Charmoy M, Lawyer P, Ribeiro-Gomes F, et al. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2014 Nov 25;111(47):16808–13. Available from: http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1415109111

39. Rougeron V, De Meeûs T, Hide M, Waleckx E, Bermudez H, Arevalo J, et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2009 Jun 23;106(25):10224–9. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904420106

40. Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. Increased transmission potential of *Leishmania major*/*Leishmania infantum* hybrids. Int J Parasitol [Internet]. 2007 May;37(6):589–93. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751907000458

41. Dujardin J-C, De Doncker S, Jacquet D, Bañuls A-L, Balavoine M, Van Bockstaele D, et al. Clonal propagation and the fast generation of karyotype diversity: An in vitro *Leishmania* model. Parasitology [Internet]. 2007 Jan 18;134(Pt 1):33–9. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182006001156

42. Rougeron V, De Meeûs T, Bañuls A-L. A primer for *Leishmania* population genetic studies. Trends Parasitol [Internet]. 2015 Feb;31(2):52–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492214002049

43. Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv Parasitol [Internet]. 1995;36:47–115. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7484468

44. Ayala FJ. Is sex better? Parasites say “no”. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1998 Mar 31;95(7):3346–8. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.7.3346

45. Tibayrenc M, Ayala FJ. How clonal are Trypanosoma and *Leishmania*? Trends Parasitol [Internet]. 2013 Jun;29(6):264–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492213000500

46. Bastien P, Blaineau C, Pages M. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. Parasitol Today [Internet]. 1992 May;8(5):174–7. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016947589290016U

47. Tomasini N, Lauthier JJ, Ayala FJ, Tibayrenc M, Diosque P. How often do they have sex? A comparative analysis of the population structure of seven eukaryotic microbial pathogens. Mokrousov I, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Jul 23;9(7):e103131. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103131

48. Tobin JF, Laban A, Wirth DF. Homologous recombination in *Leishmania enriettii*. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1991 Feb 1;88(3):864–8. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.88.3.864

49. Soto M, Requena JM, Garcia M, Gómez LC, Navarrete I, Alonso C. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. J Biol Chem [Internet]. 1993 Oct 15;268(29):21835–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408038

50. Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. In 2007. p. 1–458. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X06640013

51. Floeter-Winter LM, Cruz AK. Biologia Molecular da *Leishmania*: Genoma da *Leishmania*. In: Aldina Barral; Jackson Costa, editor. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. Salvador-BA: Grafica Contexto; 2011. p. 24–38.

52. Myler PJ, Audleman L, DeVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, et al. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1999 Mar 16;96(6):2902–6. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.96.6.2902

53. Victoir K, Dujardin J-C. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. Trends Parasitol [Internet]. 2002 Feb;18(2):81–5. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492201021997

54. 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 [Internet]. 1996 May 1;24(9):1688–94. Available from: http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/24.9.1688

55. Iovannisci DM, Beverley SM. Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania* major as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 1989 May 1;34(2):177–88. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166685189900091

56. Dobson DE, Scholtes LD, Myler PJ, Turco SJ, Beverley SM. Genomic organization and expression of the expanded SCG/L/R gene family of *Leishmania major*: internal clusters and telomeric localization of SCGs mediating species-specific LPG modifications. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 2006 Apr;146(2):231–41. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685105003695

57. Monte-Neto R, Laffitte M-CN, Leprohon P, Reis P, Frézard F, Ouellette M. Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. Kita K, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015 Feb 13;9(2):e0003476. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003476

58. Mukherjee A, Boisvert S, Monte-Neto RL do, Coelho AC, Raymond F, Mukhopadhyay R, et al. Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. Mol Microbiol [Internet]. 2013 Apr;88(1):189–202. Available from:

http://doi.wiley.com/10.1111/mmi.12178

59. Ubeda J-M, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, et al. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. Genome Biol [Internet]. 2008;9(7):R115. Available from: http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-7-r115

60. Leprohon P, Légaré D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, et al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. Nucleic Acids Res [Internet]. 2009 Apr 9;37(5):1387–99. Available from: http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkn1069

61. Federspiels NA, Beverley SM, Schillinglt JW, Schimke T. Novel DNA Rearrangements Are Associated with Dihydrofolate Reductase Gene Amplification*. J Biol Chem. 1984;259(14):9127–40.

62. Rios MC, Silva WRT, Azevedo AF, Santos PL, Teixeira SA, Muscará MN, et al. Expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is enhanced in *Leishmania* spp naturally resistant to nitric oxide. Genet Mol Res [Internet]. 2015;14(2):7113–21. Available from: http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2015/vol14-2/pdf/gmr4991.pdf

63. Sterkers Y, Lachaud L, Bourgeois N, Crobu L, Bastien P, Pagès M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. Mol Microbiol [Internet]. 2012 Oct;86(1):15–23. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2012.08185.x

64. Sterkers Y, Lachaud L, Crobu L, Bastien P, Pagès M. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. Cell Microbiol [Internet]. 2011 Feb;13(2):274–83. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2010.01534.x

65. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates P a, Depledge DP, et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. Genome Res [Internet]. 2011 Dec 1;21(12):2129–42. Available from: http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.122945.111

66. Fiebig M, Kelly S, Gluenz E. Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. Myler PJ, editor. PLoS Pathog [Internet]. 2015 Oct 9;11(10):e1005186. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005186

67. Lachaud L, Bourgeois N, Kuk N, Morelle C, Crobu L, Merlin G, et al. Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. Microbes Infect [Internet]. 2014 Jan;16(1):61–6. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457913001913

68. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium, Trichomonas,* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1990 Apr 1;87(7):2414–8. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.87.7.2414

69. Mannaert A, Downing T, Imamura H, Dujardin J-C. Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. Trends Parasitol [Internet]. 2012 Sep;28(9):370–6. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492212001031

70. Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature [Internet]. 2003 Feb 27;421(6926):936–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606999

71. Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJ, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 1991 Jun;46(2):253–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656255

72. Delgado O, Cupolillo E, Bonfante-Garrido R, Silva S, Belfort E, Grimaldi Júnior G, et al. Cutaneous Leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. Memórias do Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 1997 Sep;92(5):581–2. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761997000500002&lng=en&nrm=iso&tlng=en

73. Ramos PKS, Diniz JAP, Silva EO, Quaresma JAS, Saraiva EM, Seabra SH, et al. Characterization in vivo and in vitro of a strain of *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* from the Amazon Region. Parasitol Int [Internet]. 2009 Jun;58(2):154–60. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576909000063

74. Passero LFD, Sacomori J V, Tomokane TY, Corbett CEP, da Silveira FT,

Laurenti MD. Ex vivo and in vivo biological behavior of *Leishmania* (*Viannia*) *shawi*. Parasitol Res [Internet]. 2009 Nov;105(6):1741–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19756748

75. Miles MA, Póvoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1980;74(2):243–52.

76. Shaw JJ, Lainson R, Ryan L, Braga RR, McMahon-Pratt D, David JR. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification of *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81(1):69–72.

77. Graça GC da, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira Neto MP de, 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. Memórias do Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2012 Aug;107(5):664–74. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000500014&lng=en&nrm=iso&tlng=en

78. Requena JM, Chicharro C, García L, Parrado R, Puerta Bula CJ, Cañavate C. Sequence analysis of the 3'-untranslated region of HSP70 (type I) genes in the genus *Leishmania*: its usefulness as a molecular marker for species identification. Parasites & Vectors [Internet]. 2012;5(1):87. Available from: ???5/1756-3305-5-87

79. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70

gene. Infect Genet Evol [Internet]. 2010 Mar;10(2):238–45. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134809002573

80. Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin J-C, 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 [Internet]. 2012 Jul 15;31(7):1453–61. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10096-011-1463-z

81. Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Stocco de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. Debrabant A, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2016 Feb 29;10(2):e0004485. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004485

82. 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 [Internet]. 2004 May 1;42(5):2294–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131217

83. Muniaraj M, Sinha PK, Das P. AntiLeishmanial activity of drug infused mini-agar plates on *Leishmania donovani* promastigotes. Trop Biomed [Internet]. 2010 Dec;27(3):657–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21399608

84. Evans DA, Smith V. A simple method for cloning Leishmanial promastigotes. Zeitschrift für Parasitenkd Parasitol Res [Internet]. 1986;72(5):573–6. Available from:

http://link.springer.com/10.1007/BF00925476

85. 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 [Internet]. 1991 Feb;72(2):157–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2009920

86. Lima HC, Bleyenberg J a., Titus RG. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. Parasitol Today [Internet]. 1997 Feb;13(2):80–2. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169475896400102

87. de Souza AAA, dos Santos TV, Jennings YLL, Ishikawa EAY, Barata I da R, Silva M das GS, et al. Natural *Leishmania* (*Viannia*) spp. infections in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon region reveal new putative transmission cycles of American cutaneous Leishmaniasis. Parasite [Internet]. 2016 May 27;23(22):22. Available from: http://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2016022

88. Pacheco RS, Grimaldi G, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. Parasitology [Internet]. 1990 Jun;100 Pt 3(3):393–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2163502

89. da Silva LA, de Sousa CDS, da Graça 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 [Internet]. 2010 Jan;10(1):77–83. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134809002287

90. 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 [Internet]. 2010 Jul 5;137(8):1159–68. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182010000089

91. Srinivasan R, Kumar NP, Jambulingam P. Detection of natural infection of *Leishmania donovani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) from a forest ecosystem in the Western Ghats, India, endemic for cutaneous Leishmaniasis. Acta Trop [Internet]. 2016 Apr;156:95–9. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X16300109

92. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitology [Internet]. 2011 Apr 16;138(4):405–25. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182010001538

93. Kato H, Cáceres AG, Hashiguchi Y. First Evidence of a Hybrid of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*/*L. (V.) peruviana* DNA Detected from the Phlebotomine Sand Fly *Lutzomyia tejadai* in Peru. Pimenta PF, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2016 Jan 6;10(1):e0004336. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004336

94. Gelanew T, Hailu A, Schőnian G, Lewis MD, Miles MA, Yeo M. Multilocus sequence and microsatellite identification of intra-specific hybrids and ancestor-like donors among natural Ethiopian isolates of *Leishmania donovani*. Int J Parasitol [Internet]. 2014 Sep;44(10):751–7. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751914001428

95. Giannini SH, Schittini M, Keithly JS, Warburton PW, Cantor CR, Van der Ploeg LH. Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. Science [Internet]. 1986 May 9;232(4751):762–5. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.3961502

96. Torrico MC, De Doncker S, Arevalo J, Le Ray D, Dujardin JC. In vitro promastigote fitness of putative *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*/*Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* hybrids. Acta Trop [Internet]. 1999 Jan 15;72(1):99–110. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924965

97. CORTES S, ESTEVES C, MAURÍCIO I, MAIA C, CRISTOVÃO JM, MILES M, et al. In vitro and in vivo behaviour of sympatric *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L. (V.) peruviana* and their hybrids. Parasitology [Internet]. 2012 Feb 7;139(2):191–9. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182011001909

98. Lenski RE. Sex and Death in Protozoa. The History of an Obsession. Science (80-) [Internet]. 1990;248(4957):901–901. Available from: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.248.4957.901

99. Nolan TJ, Herman R. Effects of long-term in vitro cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. J Protozool [Internet]. 1985 Feb;32(1):70–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3989752

100. Passero LFD. Avaliação da resposta imune celular desencadeada por antígenos protéicos isolados de *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* [Internet]. Universidade de São Paulo; 2011. Available from: http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-24082011-

164748/publico/LuizFelipeDominguesPassero.pdf

101. Sousa-Franco J, Araújo-Mendes E, Silva-Jardim I, L-Santos J, Faria DR, Dutra WO, et al. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous Leishmaniasis. Microbes Infect [Internet]. 2006 Feb;8(2):390–400. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S128645790500273X

102. Lainson R, Braga RR, De Souza a a, Pôvoa MM, Ishikawa E a, Silveira FT. *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. Ann Parasitol Hum Comp [Internet]. 1989;64(3):200–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2504099