UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

RENATA ELEN COSTA DA SILVA

“Avaliação do perfil genotípico de *Leishmania (L.) infantum* em pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral e sua possível correlação com origem geográfica e coinfeção com HIV.”

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof^o Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

SÃO PAULO

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Silva, Renata Elen Costa da

Avaliação do perfil genotípico de *Leishmania (L.) infantum* em pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral e sua possível correlação com origem geográfica e coinfeção com HIV / Renata Elen Costa da Silva. – São Paulo, 2018.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL. 2. PROTOZOOLOGIA. 3. HIV. 4. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO. 5. LEISHMANIA INFANTUM. 6. BIOLOGIA MOLECULAR.

USP/IMTSP/BIB-20/2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Rute Lopes da Costa, e irmã Vitória Fernanda Costa Nunes da Silva, que junto a mim abdicaram de tantas coisas que eu seria incapaz de descrever para que eu concluísse cada etapa da minha formação.

À cada aluno de escola pública que não sabe como mas deseja, assim como desejei estar aqui onde estou hoje. Não é fácil, mas é possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr José Angelo Lauletta Lindoso, que durante a jornada da construção deste trabalho, foi além de um orientador acadêmico, um grande amigo que sempre manteve a crença na minha capacidade.

À Prof^a Dr^a Hiro Goto e Prof^a Dr^a Thelma Okay pela disponibilização do laboratório e pela acolhida no grupo de pesquisa.

À Dr^a Lúcia Maria Almeida Braz pela ajuda acadêmica, pela disponibilidade constante, pelo comprometimento com todo trabalho que realiza e principalmente pelo senso de humanidade. O mundo precisa de mais pessoas assim.

Ao laboratório de Endocrinologia Molecular e Translacional, especialmente ao Prof^o Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel e Prof^o Dr. Magnus Regios Dias da Silva pela concessão de equipamentos e espaço para que eu pudesse concluir este trabalho sem abrir mão do meu emprego.

Ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo pelo espaço concedido para a execução deste trabalho.

Ao Dr Igor Thiago Borges de Queiroz e Silva e Telma freire pela separação e concessão das amostras do Rio Grande do Norte.

Ao Dr Silvio Fernando Guimarães de Carvalho pela separação e concessão das amostras de Minas Gerais.

Ao Dr Roberto Hiramoto pela separação e concessão das amostras de São Paulo.

À Prof^a Dra^a Ester Sabino pela concessão de reagentes para sequenciamento.

Aos funcionários e alunos do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia.

À Daiane Barros Dias, pela parceria durante grande parte da realização deste trabalho, pela troca de experiências acadêmicas, mas acima de tudo por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos da vida. Nós sobrevivemos.

Ao Luiz Henrique Moraes Caetano Camargo, pela ajuda na reta final dos experimentos, no transporte de reagentes e por dividir comigo tantos risos, lágrimas e almoços.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem meu convite e contribuírem para a conclusão deste trabalho.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado (2015-2017).

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Só se nos detivermos a pensar nas pequenas coisas chegaremos a compreender as
grandes.

José Saramago

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO GERAL	05
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	05
METODOLOGIA	06
1. COMITÊ DE ÉTICA	06
2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	06
3. EXTRAÇÃO DE DNA	06
3.1 In house – Fenol - clorofórmio com tratamento prévio	06
3.2 In house - Fenol-clorofórmio	07
3.3 Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Suíça) modificado	08
4. REACAO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR	09
4.1PCR LINR4/LIN19 - AMPLIFICAÇÃO DA TOTALIDADE DO MINICÍRCULO DO kDNA	09
4.2PCR MC1/MC2 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO HIPERVARIÁVEL DO MINICÍRCULO DO kDNA.....	09
5. PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE DIGESTÃO - RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM): LINR4/LIN19 E MC1/MC2.....	10
5.1 ANÁLISE PCR-RFLP: MC1/MC2.....	10
5.2 ANÁLISE PCR-RFLP : LINR4/LIN19	11
6. SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	11
7. CONSTRUÇÃO DOS DENDROGRAMAS	14
RESULTADOS.....	15

1.	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE DNA	15
1.1	In house – Fenol - clorofórmio com tratamento prévio	15
1.2	In house - Fenol-clorofórmio	15
1.3	Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Suíça) modificado	15
2.	PCR LINR4/LIN19 E PCR MC1/MC2.....	16
2.1	PCR LINR4/LIN19 - AMPLIFICAÇÃO DA TOTALIDADE DO MINICÍRCULO	16
2.2	PCR MC1/MC2 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO HIPERVARIÁVEL DO MINICÍRCULO DO kDNA.....	17
3.	PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE DIGESTÃO LINR4/LIN19 – ANÁLISE EM ELETROFORESE CAPILAR	17
4.	ANÁLISE DE RFLP POR AGRUPAMENTO EM DENDROGRAMA – LINR4/LIN19.....	18
4.1	ANÁLISE DENDROGRAMA – LINR4/LIN19 COM RsaI.....	19
4.2	ANÁLISE DENDROGRAMA – LINR4/LIN19 COM HpaII.....	20
5.	RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM (RFLP) – MC1/MC2	20
5.1	ANÁLISE DENDROGRAMA – MC1/MC2 COM RsaI	20
5.2	ANÁLISE DENDROGRAMA – MC1/MC2 COM HpaII	22
6.	SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	24
6.1	SEQUENCIAMENTO DE SANGER – AMOSTRAS DE MINAS GERAIS	25
6.2	SEQUENCIAMENTO DE SANGER – AMOSTRAS DE SÃO PAULO.....	25
6.3	SEQUENCIAMENTO DE SANGER – AMOSTRAS DO RIO GRANDE DO NORTE...27	
	DISCUSSÃO	29
	CONCLUSÃO	36
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
	ANEXO I - TABELA DE ALTERAÇÕES GÊNICAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,8% para avaliação da PCR LINR4/LIN19 (720pb).

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1,8% para avaliação da PCR MC1-MC2 (447pb) em amostras provenientes do Rio Grande do Norte.

Figura 3. Eletroferograma do controle positivo de *L.infantum* amplificado com LINR4/LIN19 e digerido com RsaI por 45 minutos

Figura 4. Figura 4. Eletroferograma do controle positivo de *L.infantum* amplificado com LINR4/LIN19 e digerido com HpaII por 45 minutos

Figura 5. Figura 5. Eletroferograma do controle positivo de *L.infantum* amplificado com LINR4/LIN19 e digerido com RsaI por 3 horas.

Figura 6. Eletroferograma do controle positivo de *L.infantum* amplificado com LINR4/LIN19 e digerido com HpaII por 3 horas.

Figura 7. Dendrograma construído no software Bionumerics 7.6, utilizando os dados obtidos a partir do RFLP (RsaI) do amplificado de *L. (L.) infantum*, com LINR4/LIN19-PCR.

Figura 8. Dendrograma construído no software Bionumerics 7.6 para fins de comparação, utilizando os dados obtidos a partir da digestão enzimática com RsaI de amplificado de *L. (L.) infantum* com MC1/ MC2

Figura 9. Dendrograma construído no software Bionumerics 7.6 para fins de comparação, utilizando os dados obtidos a partir da digestão enzimática com HpaII de amplificado de *L. (L.) infantum* com MC1/ MC2

Figura 10. Demonstrativo da mutação presente na posição 189, onde ocorreu a troca de uma Guanina por uma Adenina, acarretando a troca de uma Treonina (Thr) por uma Alanina (Ala).

Figura 11. Demonstrativo da mutação presente na posição 336 e 337, onde ocorreu a troca de uma Adenina por uma Guanina e a inserção de uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu).

Figura 12. Demonstrativo da mutação presente na posição 241, onde ocorreu a troca de uma Adenina por uma Guanina, acarretando na troca de uma Cisteína (Cys) por uma Tirosina (Tyr).

Figura 13. Demonstrativo da mutação presente na posição 337, 338 e 339, onde ocorreu deleção de duas Adeninas e uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu) e uma Glicina (Gly).

Figura 14. Demonstrativo da mutação presente na posição 336 e 337, onde ocorreu troca de uma Adenina por uma Guanina e a inserção de uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu).

Figura 15. Demonstrativo da mutação presente na posição 334 e 3367, onde ocorreu a inserção de uma Guanina e a troca de uma Adenina por uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV – Leishmaniose visceral

HIV – Human Immunodeficiency Virus

PCR – Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

MG – Minas Gerais

RN – Rio Grande do Norte

SP – São Paulo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

kDNA – DNA do cinetoplasto

Thr – Treonina

Ala – Alanina

Glu – Glutamato

Cys – Cisteína

Tyr – Tirosina

Gly - Glicina

UNIDADES DE MEDIDA

μL – Microlitro

mL – Mililitro

μg - Microgramas

ng – Nanogramas

mM – Milimolar

M - Molar

g – Força g

RESUMO

SILVA, REC. Avaliação do perfil genotípico de *Leishmania* (L.) *infantum* em pacientes com diagnóstico de leishmaniose visceral e sua possível correlação com origem geográfica e coinfecção com HIV (dissertação). São Paulo. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018. No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *L. (L.) infantum* e tem-se observado nas últimas décadas, uma mudança no seu perfil epidemiológico, deixando de ser uma doença de ocorrência exclusivamente rural e avançando para áreas urbanas. Com a modificação das áreas afetadas pela LV, observou-se também um aumento na prevalência da coinfecção LV/HIV, decorrente principalmente da interposição de áreas de transmissão de ambas as doenças. Além desse fator, um outro ponto relevante que se tem observado, é o aumento da letalidade por LV, associada ou não à coinfecção com HIV. Dados da literatura disponíveis sobre pacientes LV/HIV, da região Mediterrânea da Europa, em que alguns autores demonstram genótipos de *L. infantum* ocorrendo em regiões geográficas isoladas, porém, sem correlação direta entre o genótipo encontrado e a forma clínica ou coinfecção com HIV. Diversas lacunas no conhecimento do perfil genotípico do parasito, em relação à coinfecção com HIV e área geográfica, podem ser observadas principalmente no Brasil, onde a epidemiologia molecular da leishmaniose visceral ainda não está bem estabelecida. Não se conhece a ocorrência de diferentes genótipos de *L. infantum* em pacientes com LV ativa, sua relação com a distribuição geográfica e seu comportamento frente às comorbidades como o HIV. No presente trabalho, foi analisado se há ocorrência de diferentes genótipos de *L. infantum* em pacientes com LV e com LV/HIV provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil, sendo duas regiões de introdução antiga (Montes Claros-MG e Natal-RN) e uma região de introdução mais recente (São Paulo).

Utilizando os dados obtidos na PCR – RFLP foram construídos dendrogramas que demonstraram a ocorrência de diferentes genótipos circulando no país, também foi possível observar correlação entre a região de procedência e o genótipo identificado. Nas análises do sequenciamento, foram encontradas mutações características de cada região, sobrepondo somente uma delas presente em 62% das amostras de MG e em 27% das amostras de SP. A presença da coinfecção não interferiu na distribuição das variações genotípicas assim como na ocorrência das mutações.

Descritores: Parasitologia. Protozoologia. Genótipos. Leishmaniose Visceral. Biologia Molecular. Coinfecção.

ABSTRACT

SILVA, REC. Evaluation of genotypic profile of *Leishmania* (L.) *infantum* in patients diagnosed with visceral leishmaniasis and the possible correlation with geographic origin and HIV coinfection (dissertation). São Paulo. Instituto de Medicina Tropical of São Paulo of Universidade de São Paulo; 2018. In Brazil, visceral leishmaniasis (VL) is caused by *L. (L.) infantum* and has been observed in the last decades, a change in its epidemiological profile, from being an exclusively rural disease and advancing to urban areas. With the modification of the areas affected by VL, there was also an increase in the prevalence of VL / HIV coinfection, mainly due to the overlap of transmission areas of both diseases. In addition to this factor, another relevant point that has been observed is the increase in VL lethality, associated or not with HIV coinfection. Available literature data in VL / HIV coinfecting patients, are from the Mediterranean region of Europe, where some authors demonstrate *L. infantum* genotypes occurring in isolated geographical regions, but without direct correlation between the genotype found and the clinical form or coinfection with HIV.

Several gaps in the knowledge of the genotypic profile of the parasite in relation to HIV coinfection and geographical area can be observed mainly in Brazil, where the molecular epidemiology of VL is still not well established. The occurrence of different genotypes of *L. infantum* in patients with active VL is not known, its relation with the geographical distribution and its behavior towards the comorbidities like HIV. In the present work, we analyzed the occurrence of different *L. infantum* genotypes in VL/HIV patients from different geographic areas of Brazil, two older introduction regions (Montes Claros-MG and Natal-RN) and one more recent introduction region (São Paulo).

Using the data obtained in RFLP - PCR, dendrograms were constructed which demonstrated the occurrence of different genotypes circulating in the country. It was also possible to observe a correlation between the region of origin and the identified genotype. In the sequencing analyzes, characteristic mutations of each region were found, overlapping only one of them, present in 62% of the MG samples and 27% of the SP samples. The presence of coinfection did not interfere in the distribution of genotypic variations as well as in the occurrence of mutations.

Descriptors: Parasitology. Protozoology. Genotypes. Visceral leishmaniasis. Molecular biology. Coinfection.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) está presente em 61 países, com cerca de 200 milhões de pessoas sob risco de infecção. Estima-se que ocorram aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV por ano (1). Nas Américas, a LV está amplamente distribuída em 12 países, os quais em geral possuem situação sócio econômica emergente, problemas de saneamento básico e saúde pública. No período de 10 anos (de 2001 a 2011) foram registrados 38.808 casos, sendo que 96% ocorreram no Brasil (2,3). Nas últimas décadas tem-se observado uma mudança no seu perfil epidemiológico da LV, deixando de ser uma doença de ocorrência exclusivamente rural e avançando para áreas urbanas. Junto com a observação da modificação das áreas afetadas pela LV, observou-se também um aumento na prevalência da coinfecção LV com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Tal comportamento se deve principalmente à interposição de áreas de transmissão de ambas as doenças. Fatores sociais e do hospedeiro são os mais relacionados com o aumento da letalidade, expansão e urbanização da LV. Além desse fator, tem-se observado o aumento da letalidade por LV, associada ou não à coinfecção com HIV.

A LV é uma doença parasitária causada por protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* (4) e a espécie causadora da doença no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*) (5). Seu ciclo biológico é heteroxênico, ou seja, para completa-lo a parasita precisa de um hospedeiro vertebrado e de um invertebrado para atingir todos os estágios de desenvolvimento, no caso um mamífero e um flebotomíneo, respectivamente. Flebotomíneos do gênero *Lutzomia*, além de serem hospedeiros desse protozoário, também são os vetores. Ao picar um indivíduo infectado, a fêmea desse inseto ingere formas amastigotas, no seu tubo digestório se diferenciarão em promastigotas que serão inoculadas em um outro hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (6).

A LV afeta principalmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como fígado, baço e linfonodos (7). O mecanismo pelo qual ocorre a definição da forma clínica depende de fatores presentes no hospedeiro e no parasito. Desde 1994 já se sugeria que a ocorrência de genótipos variantes presentes no parasita poderia interferir diretamente no prognóstico e evolução clínica do indivíduo (8).

Em relação à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), estima-se que em 2013 havia de 1,4 a 2,1 milhões de pessoas vivendo com essa doença na América Latina, sendo 47% desses casos no Brasil (9). A coinfecção LV/HIV gera sérios agravos devido ao comprometimento do sistema imunológico causado por ambas as patologias. Especula-se que fatores relacionados ao hospedeiro, tal como a baixa contagem de linfócitos T CD4+ possa ser um fator preditor de recidiva ou letalidade de LV/HIV. Um estudo de revisão sistemática avaliando os fatores preditores de falha terapêutica da LV em pacientes coinfectados LV/HIV evidenciou que o uso de profilaxia secundária para leishmaniose é um fator protetor de recidiva e a contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 100 células/mm³ é um fator preditor de falha terapêutica. (10). Porém fatores relacionados ao parasito podem contribuir para este fim, tais como cepa de *Leishmania* causadora da infecção e variações genotípicas de uma mesma cepa do parasito, entretanto pouco se sabe sobre a participação de diferentes cepas de *L. infantum* na coinfecção com HIV.

A existência da heterogeneidade genética nas populações de diversas espécies de *Leishmania* sp. é um fato confirmado (11). Kinetoplastidas flagelados em geral tem a característica peculiar de possuir junto ao seu DNA mitocondrial o DNA do cinetoplasto, denominado kDNA, o qual é composto de minicírculos e maxicírculos (12), ambas estruturas estão presentes em abundância no genoma tendo aproximadamente 10-20 cópias maxicírculos com 20.000 – 40.000pb,

A variabilidade genética dessa região é considerada alta por possuir 600 - 800pb no total, dentre os quais somente a região composta de 120pb é conservada, enquanto o restante é hipervariável (13). Essa característica de variabilidade é uma ferramenta a ser explorada para realizar a análise de diferentes cepas dentro de uma mesma espécie, através por exemplo de PCR – RFLP (14 Angelicci 1989).

Ainda existem diversas questões a serem respondidas quando se trata de fatores do parasito que possam influenciar na patogenicidade e na epidemiologia da doença. A expansão clonal é o principal conceito utilizado para reprodução de protozoários em geral (15), entretanto ainda muito discutido, pois organismos diploides devem realizar reprodução sexuada ou hibridização em algum momento para que não ocorra acúmulo de mutações (16), além disso, a discussão da ocorrência da reprodução sexuada alternada com a expansão clonal ganhou força após a observação da presença de homozigose entre os parasitos gerados, o que não ocorreria caso a reprodução fosse exclusivamente via expansão clonal por tantas gerações (~ 500 gerações) (17), o mesmo pôde ser observado com *Trypanosoma cruzi*, o qual na maioria das vezes se reproduz por expansão clonal porém há a ocorrência de eventos de reprodução sexuada (18, 19). Visto isso, passou-se a discutir a existência de subpopulações dentro de um mesmo zimodema, quando foram encontradas cepas híbridas entre diferentes espécies de *Leishmania* (20, 21). Essa adaptação pode ser causada por diversos fatores ainda não completamente compreendidos, como: condições de estresse, adaptação à novos hospedeiros e vetores, subdividindo assim sua reprodução entre expansão clonal e sexual quando necessário (22), porém, tais teorias sofrem questionamentos devido a dificuldade de comprovação da sua ocorrência, deixando em aberto as possíveis causas de fatores de predisposição para comportamentos não convencionais do parasito no que se refere à patogenicia.

Para o desenvolvimento do presente trabalho, inicialmente foram escolhidos os

oligonucleotídeos LINR4 (5' GGGGTTGGTGTAAAATAGGG 3') e LIN19 (5' CAGAACGCCCCTACCCG 3') para realizar a amplificação de 720pb do minicírculo do kDNA, para fazer a triagem inicial de todas as amostras e analisar a presença ou ausência de polimorfismos através da realização da PCR-RFLP, tais oligos foram escolhidos pois amplificam a totalidade da região do kDNA, com o objetivo de obter maiores informações analisando o minicírculo do kDNA como um todo, incluindo regiões conservadas e variáveis. Tais análises foram baseadas em estudos anteriores que avaliaram a variabilidade genética em hospedeiros vertebrados e invertebrados (23), poderia trazer informações mais variadas dos possíveis genótipos de *Leishmania (L.) infantum* (23, 24).

Na busca de resultados mais robustos, também foram escolhidos os oligoiniciadores MC1 (5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3') e MC2 (5' CACCCATTTTCCGATTTTG 3'), os quais também amplificam parte da região hipervariável do minicírculo do kDNA com 447pb. Tal alvo foi escolhido devido sua alta capacidade discriminatória no sentido de regionalização geográfica de genótipos variantes já descrita previamente na literatura para análise de amostras provenientes de outros países do mediterrâneo como Portugal, Espanha e Marrocos (25, 26 e 27).

OBJETIVO GERAL

Detectar genótipos variantes de *Leishmania (L.) infantum* em pacientes com leishmaniose visceral e pacientes coinfectados com HIV-1 e correlacioná-los com a região geográfica de procedência.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a existência de diferentes genótipos de *L. (L.) infantum* no Brasil em amostras de pacientes com LV utilizando PCR-RFLP e sequenciamento de Sanger;
- Correlacionar os diferentes genótipos de acordo com a área geográfica de procedência dos casos;
- Verificar se há diferença entre o genótipo de *L. (L.) infantum* presente em pacientes portadores da coinfeção LV-HIV e pacientes somente com LV da mesma área geográfica.

METODOLOGIA

1. **COMITÊ DE ÉTICA:** O presente trabalho foi submetido ao comitê de éticadas instituições participantes através da Plataforma Brasil e aprovado sob o CAAE número 45561115.0.0000.0065.
2. **OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS:** Foram analisadas 164 amostras de medula óssea fixadas e coradas em lâminas, coletadas para fins de diagnóstico de leishmaniose visceral, tendo leitura microscópica positiva para *Leishmania* spp. e tratados após diagnóstico. Tais amostras foram coletadas de janeiro de 2007 a junho de 2016, provenientes de três estados brasileiros, sendo eles: Natal – RN (responsável pelo envio de 29 amostras advindas do Hospital Giselda Trigueiro), Montes Claros – MG (responsável pelo envio de 69 amostras advindas da Universidade Estadual de Montes Claros) e São Paulo – SP (responsável pelo envio de 66 amostras advindas do Instituto Adolfo Lutz), permitindo que pudéssemos avaliar a distribuição geográfica de possíveis genótipos variantes.
3. **EXTRAÇÃO DE DNA:** Foram realizadas três técnicas para a extração de DNA para obter melhor rendimento.

3.1 In house – Fenol - clorofórmio com tratamento prévio: Utilizando o protocolo descrito por Schonian et al, 2003 (24), as lâminas foram embebidas em xilol por até sete dias para remoção da lamínula e hidratação do esfregaço. Posteriormente foram lavadas com etanol absoluto e o material foi removido por raspagem com auxílio de uma lâmina limpa e transferido para um microtubo de 1,5mL. Para lise celular foram utilizados 250 µL de tampão de lise (NaCl 50mM, Tris 50mM, EDTA 10mM, 100 µg/mL de proteinase K, Triton x – 100 1%, pH 7,4), incubando a 56°C por 3 horas ou *overnight*, o lisado foi submetido à extração com fenol clorofórmio.

3.2 In house - Fenol-clorofórmio: Utilizando o método de extração com fenol-clorofórmio, o material foi retirado da lâmina após umedecido com 180µL de PBS 1x e centrifugado por 10 minutos a 1300g, o sobrenadante foi ressuspenso em 150 µL de TELT (Tris-Hcl 50mM pH 7,4; EDTA 62,5mM pH 9,0; LiCl 2,5M; Triton X-100 4% V/V) e homogeneizado manualmente. Após a lise, o material foi incubado por 5 minutos e foram adicionados 500µL de fenol-clorofórmio (1:1), homogeneizado por 5 minutos e centrifugado a 13000 g durante 5 minutos. A fase superior foi transferida para um novo tubo contendo 300 µL de etanol absoluto, incubada por 5 minutos a – 20°C e centrifugada a 13000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado com 10µL de etanol absoluto centrifugado a 13000g por 10 minutos. Após a lavagem o etanol foi descartado e o pellet deixado em temperatura ambiente por 12 horas para secar. O DNA foi eluído em 50 µL de água livre de DNase/RNase e armazenado a -20°C.

3.3 Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Suíça) modificado: Para obtenção de maior quantidade de material íntegro, foi realizado um tratamento prévio buscando hidratar os esfregaços. As lâminas foram submetidas à imersão durante 5 minutos em concentrações decrescentes de álcoois (100%, 90%, 80% e 70%) e, por último, em água destilada. Esse procedimento permitiu que a hidratação ocorresse e que fossem eliminados os corantes presentes na amostra que possivelmente poderiam interferir na reação de PCR. O material fixado na lâmina foi raspado com uma lâmina limpa e foram adicionados 180 µL de PBS 1x. Para realizar a lise celular foram adicionados à amostra 20 µL de proteinase K, 20 µL de tampão AL, homogeneizada em vórtex e incubada a 56°C por 10 minutos. Após a lise, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto à mistura, a qual foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos, depois aplicada na coluna de centrifugação fornecida no kit e centrifugada a 8000g por 1 minuto. Após centrifugação, o tubo coletor fornecido pelo kit foi trocado e foram adicionados 500µL de tampão AW1 na coluna que foi centrifugada a 8000g por 1 minuto. A coluna foi novamente transferida para um tubo coletor limpo, adicionados 500µL de tampão AW2 e realizada nova centrifugação a 14000rpm por 3 minutos. A coluna foi então transferida para um novo tubo coletor e centrifugada novamente, para remover resquícios de tampão AW2. Após a remoção dos vestígios de tampão, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5mL e foram pipetados 100µL de tampão AE ou água destilada, incubado com a amostra em temperatura ambiente durante 1 minuto, e centrifugada a 8000g por 1 minuto. O armazenamento foi feito a -20°C.

4. REACAO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

4.1 PCR LINR4/LIN19 - AMPLIFICAÇÃO DA TOTALIDADE DO MINICÍRCULO DO kDNA

A reação foi realizada com volume final de 40µL, dos quais 20µL correspondem à GoTaq Master Mix Colorless (Promega, Brasil), 1,6µL de cada oligo (LINR4 e LIN19) a 10pmol/µL, 11,8µL de água livre de DNase e RNase e 5µL de DNA (20ng/µL). A amplificação foi feita com a desnaturação inicial ocorrendo com 01 ciclo a 95°C, por 2 minutos, 33 ciclos para desnaturação, anelamento e extensão de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto respectivamente e 01 ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos. Como controle positivo foi utilizado DNA de promastigota de *Leishmania (L.) infantum* de cepa referência (MHOM/BR/1972/LD46).

As amostras que não amplificaram foram submetidas a uma nova PCR utilizando como DNA molde o produto da reação anterior, aumentando a quantidade de material disponível para as análises posteriores. Os produtos amplificados geraram a banda de 720 pares de base, após corrida eletroforética em gel de agarose 1,8%, corado com GelRed, durante 30 minutos a 100Volts. Após a corrida, a visualização das bandas foi feita em GelDoc Ez (Bio-Rad, EUA).

4.2 PCR MC1/MC2 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO HIPERVARIÁVEL DO MINICÍRCULO DO kDNA.

A reação foi realizada com volume final de 40 µL, dos quais 20µL correspondiam à GoTaq Master Mix Colorless (Promega, Brasil), 1,6µL de cada oligo (MC1 e MC2) a 10pmol/µL, 11,8µL de água livre de DNase e RNase e 5µL de DNA a 20ng/µL. A amplificação foi realizada no Termociclador Veriti 96-Well (Thermo Fisher, EUA), com a desnaturação inicial ocorrendo com 01 ciclo a 95°C por 2 minutos, 33 ciclos para

desnaturação, anelamento e extensão de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, respectivamente, e 01 ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos. Como controle positivo foi utilizado DNA de promastigota de *Leishmania (L.) infantum* de cepa referência (MHOM/BR/1972/LD46). Os produtos amplificados com os oligoiniciadores MC1 e MC2 geraram a banda de 447 pares de base que foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,8%, corado com 1,0µL de GelRed, durante 30 minutos a 100Volts. A visualização das bandas foi feita em GelDoc Ez (Bio-Rad, EUA).

5. PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE DIGESTÃO - RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM): LINR4/LIN19 E MC1/MC2

Para realizar a digestão enzimática foram utilizadas duas enzimas de restrição previamente descritas em trabalhos anteriores: RsaI e HpaII, entretanto, o tempo de digestão descrito variava entre 40 minutos e 12 horas. Para definir o tempo ideal para a digestão de amostras de pacientes foram realizadas digestões de 45 minutos, 2 horas, 3 horas e 12 horas de incubação, utilizando 5U/µL, 3,0µl de tampão 10x respectivo a cada enzima, 0,3ul de BSA acetilada (10µg/µL) e 10µL do produto amplificado a ser digerido. As digestões foram realizadas com cada enzima separadamente.

5.1 ANÁLISE PCR-RFLP: MC1/MC2

A análise dos fragmentos digeridos a partir da amplificação com MC1/MC2 foram analisados em gel de agarose de alta resolução Nusieve® (Lonza, USA) a 3%,,, polimerizado durante 1 hora após a fusão e corado com 1,0µL de GelRed, a corrida foi feita a 100V por 30 minutos. Após a corrida, foi feita a documentação no fotodocumentador GelDoc Ez (Bio-Rad, EUA).

5.2 ANÁLISE PCR-RFLP : LINR4/LIN19

Os fragmentos obtidos a partir da digestão do amplificado com LINR4/LIN19 foram submetidos à eletroforese capilar de alta resolução. Para esta finalidade foram testadas duas voltagens diferentes (6KV e 8KV) para definir o melhor parâmetro para obter bandas com maior intensidade de fluorescência, além disso foram testados dois tempos de injeção de amostras diferentes (300 segundos e 400 segundos) e protocolos para amostras com concentrações normais ou com baixa concentração. Os resultados foram otimizados ao utilizarmos a eletroforese com os seguintes parâmetros: 8KV, 300 segundos de injeção e protocolo para amostras com baixa concentração.

6. SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Os produtos amplificados com MC1/MC2 foram submetidos ao sequenciamento de Sanger para verificação da existência de mutações. Os produtos foram primeiramente purificados com o kit de purificação QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Suíça).

Para a purificação primeiramente se fez a ligação do produto amplificado na coluna, utilizando 05 volumes de tampão PB para cada volume de amostra a ser purificada e centrifugando-se a 13000rpm por 1 minuto, sendo o centrifugado descartado em seguida. Após essa ligação, foi aplicada na coluna 750µL de tampão PE e novamente centrifugado a 13000rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado e foi feita uma nova centrifugação nos mesmos parâmetros para que fosse certificado de que não haveria resíduos do tampão. Para a eluição, foi pipetado 30 µL do tampão EB diretamente na coluna, incubado por 1 minuto e centrifugado a 13000rpm por 1 minuto.

Os produtos foram quantificados para que fossem aplicados na reação de sequenciamento quantidades compatíveis com a eficiência dos reagentes. Para isso os amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com 0,5µL

de GelRed, utilizando como padrão de comparação, foi utilizado o *Low Mass Ladder* (Invitrogen, EUA), o qual possui uma escala de intensidade onde é possível definir a concentração do produto amplificado.

Para a realização da reação de sequenciamento, foi utilizado o protocolo fornecido pelo kit com modificações, no qual foram utilizados 2 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, EUA), 1 µL de tampão de sequenciamento, 1 µL de primer (MC1 ou MC2) a 5 pmol/µL, 3 µL de água livre de DNase/RNase e 3 µL de produto de PCR purificado. No presente trabalho, foi realizado o sequenciamento de *Forward* e *Reverse*, buscando resultados mais homogêneos e confiáveis, considerando-se que um poderia confirmar a presença de mutação encontrada no outro e cobrir possíveis *gaps*. A reação foi realizada com 1 ciclo de 96°C 1 minuto, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, 1 ciclo de 4°C, até o momento da retirada da amostra do termociclador. Após a retirada do termociclador, a reação foi transferida para uma placa de 96 poços para realização da precipitação. Foram utilizados 26 µL por poço, de uma solução composta de 25 µL de etanol 100% e 1 µL de acetato de sódio 3,0M pH 4,6. Tal solução deve ser preparada no momento de uso e incubada 15 minutos antes de iniciar a precipitação. Após a adição da solução de precipitação, a placa foi selada com adesivo óptico para placas, as amostras foram homogeneizadas em vórtex, incubadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos e centrifugadas a 2000g por 45 minutos a 20°C. Após a centrifugação, foi retirado o selante da placa, a qual foi invertida na pia e centrifugada novamente invertida em papel absorvente a 150g por 1 minuto a 20°C para que a solução utilizada fosse completamente removida dos poços. Foram adicionados 150 µL de etanol 70% em cada poço, a placa foi selada novamente e centrifugada a 2000g por 15 minutos a 20°C. Novamente foi realizada a remoção do selante e a inversão da placa na pia e sua centrifugação invertida em papel absorvente a

150g por 1 minuto. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos ao abrigo da luz para que os poços pudessem secar e posteriormente foram adicionados 10 μ L de Formamida Hi-Di, sendo a placa selada novamente. Antes da leitura do sequenciamento é necessário que se faça o processo de desnaturação, para que as fitas duplas restantes se separem e possibilite a leitura pelo sequenciador. Para que isso ocorresse, a placa foi colocada em termociclador em um ciclo de 5 minutos a 95°C. Imediatamente após esse tempo, a placa foi imersa em gelo, onde permaneceu por 2 minutos.

A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA), no qual a placa foi encaixada no suporte correspondente, teve seu selante substituído pela borracha selante do equipamento e colocada para leitura.

Após o término da leitura as amostras foram avaliadas no software do equipamento, para análise posterior no CLC Genomics Workbench (Applied Biosystems, EUA), no qual todas as sequencias foram comparadas com os genótipos anteriormente depositados no GenBank descritos por Cortes et al, 2006. Para padrão de comparação, foi utilizado o genótipo B, descrito como brasileiro nos trabalhos anteriores. Para realizar o alinhamento, as amostras foram importadas do CD (Import > CD > Amostra > selecionando a pasta para arquivar), selecionadas e comparadas como genótipo B uma a uma, para pontuar as mutações (Toolbox > Sequencing Data analysis > Assemble sequences to reference > selecionando a amostra a ser comparada > next > selecionando o genótipo B como referencia > Next > open > next > Finish). Os gráficos foram exportados em PDF e cada amostra foi exportada de forma independente em formato FASTA. Para a construção da árvore filogenética, primeiramente as amostras foram alinhadas no Sequencher 5.4.6 (Gene Codes, EUA), as falhas presentes nas pontas do sequenciamento foram analisadas, substituindo o traço por ponto de interrogação, dessa forma é possível sinalizar que não se tratava de deleções, mas

sim de dados não obtidos, chamados pelo software de *Missing Data*. Para impedir a falsa identificação de mutações, avaliamos cada alinhamento, individualmente, eliminando a possibilidade de geração de mutações causadas pelo arraste de uma base nitrogenada, erro passível de ocorrer no momento do sequenciamento.

7. CONSTRUÇÃO DOS DENDROGRAMAS

Os padrões de bandas encontrados na PCR – RFLP de ambos alvos foram analisados por meio da construção de dendrogramas, feitos a partir da utilização da similaridade e discrepância entre os padrões das amostras, para gerar flancos organizados, de modo que as amostras mais próximas sejam as mais semelhantes e as mais distantes sejam distintas. Sendo assim, foi possível analisar a procedência das derivações das amostras com padrões não esperados e sua frequência. Para realizar a construção foi utilizado o Software Bionumerics 7.6 (Biomérieux, França), utilizando a ferramenta de análise de *FingerPrints*.

RESULTADOS

1. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE DNA

Avaliando-se tais parâmetros foi possível observar que

1.1 *In house* – Fenol - clorofórmio com tratamento prévio: As amostras extraídas com o método *In house* com o protocolo de Schonian et al, 2003 apresentavam concentração média de 9,0 ng/μL e qualidade em média de 1,5 (260/280).

1.2 *In house* - Fenol-clorofórmio: As amostras extraídas com o protocolo *In house* Fenol-clorofórmio apresentaram rendimento com concentração média de 6,0 ng/μL e qualidade em média de 1,7 (relação 260/280).

1.3 Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Suíça) modificado: utilizando o kit de extração de DNA QIAamp da Qiagen com modificações no protocolo, hidratando-se previamente as lâminas. O tratamento prévio das lâminas permitiu que fosse obtida uma maior quantidade de material, rendendo concentrações com valores em média 20 ng/μL, com a relação 260/280 de, aproximadamente, 1,8. Dessa forma, a técnica mais adequada foi a extração de DNA com kit QIAamp Mini Kit (Qiagen, Suíça), com hidratação prévia das lâminas, sendo a escolhida para utilização nos protocolos de extração de DNA para análise de genótipos de *L. infantum*.

2. PCR LINR4/LIN19 E PCR MC1/MC2

2.1 PCR LINR4/LIN19 - AMPLIFICAÇÃO DA TOTALIDADE DO MINICÍRCULO

Dentre as 164 amostras, 52% (85/164) demonstraram a banda esperada de 720 pares de base, dentre as quais 33% provenientes de Montes Claros - MG, 21% provenientes de Natal – RN e 46% provenientes de São Paulo - SP.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,8% corado com GelRed, para avaliação da PCR LINR4/LIN19 (720pb) em amostras provenientes de Minas Gerais 1: *Ladder* 100pb; 2: amostra 123; 3: amostra 124; 4: amostra 125; 5: amostra 126; 6: amostra 127; 7: amostra 128; 8: amostra 129; 9: Controle positivo *L. (L.) infantum*.

2.2 PCR MC1/MC2 - AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO HIPERVARIÁVEL DO MINICÍRCULO DO kDNA.

Dentre as 164 amostras, 60% demonstraram a banda esperada de 447 pares de base, dentre as quais 41% provenientes de Montes Claros - MG, 26% provenientes de Natal – RN e 33% provenientes de São Paulo – SP.

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1,8% para avaliação da PCR MC1-MC2 (447pb) em amostras provenientes do Rio Grande do Norte. 1: *Ladder* 100pb; 2: amostra 205; 3: amostra 206; 4: amostra 207; 5: amostra 208; 6: amostra 209; 7: amostra 210; 8: amostra 211; 9: amostra 212; 10: amostra 213; 11: amostra 214; 12: amostra 215; 13: Controle positivo *L. (L.) infantum*.

3. PADRONIZAÇÃO DO TEMPO DE DIGESTÃO LINR4/LIN19 – ANÁLISE EM ELETROFORESE CAPILAR

Conforme Figuras 3 e 4 é possível observar que a digestão das amostras digeridas de 2 a 3 horas apresentaram melhor resultado (Figuras 3 e 4). Nas Figuras 5 e 6 observamos que não houve digestão completa do fragmento, quando o tempo foi de 45 minutos. (Figura 5 e 6). As amostras submetidas à digestão por 12 horas não apresentaram bandas significativas. Diante dos resultados, o tempo de digestão utilizado foi de 3 horas a 37°C.

Figura 3. Eletroferograma do controle positivo amplificado com LINR4 e LIN19 e digerido com RsaI durante 45 minutos

Figura 4. Eletroferograma do controle positivo amplificado com LINR4 e LIN19 e digerido com HpaII durante 45 minutos

Figura 5. Eletroferograma do controle positivo amplificado com LINR4 e LIN19 e digerido com RsaI durante 3 horas.

Figura 6. Eletroferograma do controle positivo amplificado com LINR4 e LIN19 e digerido com HpaII durante 3 horas

4. ANÁLISE DE RFLP POR AGRUPAMENTO EM DENDROGRAMA – LINR4/LIN19

Após a realização da PCR e a padronização do tempo ideal de digestão enzimática com RsaI e HpaII, os produtos foram submetidos à eletroforese capilar GelBot (Loccus, Brasil), o qual gerou tanto eletroferogramas quanto géis digitais. Para determinar a proximidade entre elas, foram construídos dois dendrogramas, sendo cada um deles correspondente aos padrões de digestão gerados por cada enzima individualmente. As amostras de Minas Gerais e Rio Grande do Norte foram digeridas com ambas as enzimas, porém as amostras de São Paulo não puderam ser analisadas da mesma forma, devido à escassez de material, o que impossibilitou a utilização do aparelho de eletroforese capilar.

4.1 ANÁLISE DENDROGRAMA – LINR4/LIN19 COM RsaI

Para demonstrar a distribuição das amostras de acordo com os padrões gerados foi feito um dendrograma referente à restrição com RsaI (Figura 7) utilizando o software Bionumerics 7.6 (Biomerieux, França). Observamos no dendrograma da figura 7 que há heterogeneidade genética entre as amostras, porém, sem regionalização. Amostras de Minas Gerais e Rio Grande do Norte localizaram-se em clusters próximos, porém mantendo pequenos aglomerados isolados provenientes do Rio Grande do Norte.

Figura 7. Dendrograma construído no software Bionumerics 7.6, utilizando os dados obtidos a partir da digestão enzimática com RsaI, de amplificado de *L. (L.) infantum*, com LINR4/ LIN19-PCR.

4.2 ANÁLISE DENDROGRAMA – LINR4/LIN19 COM HpaII

Os padrões encontrados após a digestão com HpaII dos amplificadores de LINR4/LIN19 não permitiram que fossem formados *clusters*. Ao realizarmos a análise através da construção de um dendrograma utilizando-se o método de UPGMA, as amostras dos dois estados analisados (Minas Gerais e Rio Grande do Norte) formaram braços únicos e frequentemente se mesclaram entre si em *clusters* heterogêneos, sendo assim, o dendrograma não apresentou resultados analisáveis.

5. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) – MC1/MC2

Após a digestão com RsaI esperava-se que o fragmento de 447pb fosse clivado em duas bandas sendo uma de 253pb e outra de 194pb, enquanto que a clivagem padrão esperada com HpaII geraria duas bandas de tamanho de 410pb e 37pb.

5.1 ANÁLISE DENDROGRAMA – MC1/MC2 COM RsaI

Ao analisarmos a restrição enzimática com RsaI dos produtos da MC1/MC2 foi confirmada a presença de heterogeneidade genética entre as amostras (Figura 08), além da observação da ocorrência de regionalização. Considerando-se que as amostras coletadas de pacientes de São Paulo permaneceram discretamente mais aglomeradas entre si quando comparadas com as amostras de Minas Gerais e Rio Grande do Norte, que permaneceram em *clusters* próximos e aleatoriamente mescladas entre si (Figura 8). Em verde, é possível visualizar os *clusters* formados com as amostras provenientes de Minas Gerais, em vermelho as amostras provenientes de São Paulo e em preto as amostras provenientes do Rio Grande do Norte.

Figura 8. Dendrograma construído no software Bionumerics 7.6 para fins de comparação, utilizando os dados obtidos a partir da digestão enzimática com RsaI de amplificado de *L. (L.) infantum* com MC1/ MC2

5.2 ANÁLISE DENDROGRAMA – MC1/MC2 COM HpaII

Os padrões encontrados após a digestão com HpaII dos amplificadores de MC1/MC2 não permitiram que fossem formados clusters consistentes o suficiente para afirmarmos que ocorreu aglomeração das amostras de acordo com sua região de procedência, entretanto, foi possível observar a alta diversidade entre os padrões das amostras. Ao realizarmos a análise através da construção de um dendrograma utilizando o método de UPGMA, as amostras dos três estados analisados (São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Norte) formaram clusters nos quais foram agrupadas amostras de acordo com a região de procedência (Figura 9). Em verde, é possível visualizar os clusters formados com as amostras provenientes de Minas Gerais, em vermelho as amostras provenientes de São Paulo e em preto as amostras provenientes de Rio Grande do Norte.

Figura 9. Dendrograma construído no software Bionumerics 7.6 para fins de comparação, utilizando os dados obtidos a partir da digestão enzimática com HpaII de amplificado de *L. (L.) infantum* com MC1/ MC2

6. SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Devido à baixa qualidade do sequenciamento dos produtos amplificados com LINR4/LIN19, optamos por fazer o sequenciamento somente dos produtos obtidos com MC1/MC2. Dessa forma, foram analisadas as mutações presentes que ocasionariam troca de aminoácidos ou não.

Todas as amostras incluindo a cepa referência usada como controle positivo, apresentaram uma mutação pontual na posição 189 onde ocorreu a troca de uma Guanina por uma Adenina, acarretando a troca de uma Treonina (Thr) por uma Alanina (Ala), o pico dessa mutação mostrou-se consistente no eletroferograma, dessa forma, consideramos como uma mutação verdadeira (Figura 10).

Figura 10. Demonstrativo da mutação presente na posição 189, onde ocorreu a troca de uma Guanina por uma Adenina, acarretando a troca de uma Treonina (Thr) por uma Alanina (Ala).

De acordo com cada região, foi possível observar mutações características presentes em proporções variadas.

6.1 SEQUENCIAMENTO DE SANGER – AMOSTRAS DE MINAS GERAIS

Nas amostras provenientes de Minas Gerais, a mutação predominante e que as diferenciou das amostras dos demais estados foi a troca de uma Adenina por uma Guanina na posição 336 e a inserção de uma Guanina na posição 337, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu), tal mutação estava presente em 62% das amostras desse estado (Figura 11).

Figura 11. Demonstrativo da mutação presente na posição 336 e 337, onde ocorreu a troca de uma Adenina por uma Guanina e a inserção de uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu) em amostras provenientes de Minas Gerais.

6.2 SEQUENCIAMENTO DE SANGER – AMOSTRAS DE SÃO PAULO

Vinte e um por cento (21%) das amostras provenientes de São Paulo possuíam uma Adenina no lugar de uma Guanina na posição 241, tendo como consequência a troca de uma Cisteína (Cys) por uma Tirosina (Tyr) (Figura 12). Trinta por cento (30%) apresentaram a deleção de duas Adeninas e uma Guanina na posição 337, 338 e 339 respectivamente, acarretando na perda de um Glutamato (Glu) e uma Glicina (Gly) (Figura 13). Vinte e sete por cento (27%) das amostras possuíam na posição 336 a troca de uma Adenina por uma Guanina e na posição 337 a inserção de uma Guanina,

acarretando na deleção de um Glutamato (Glu), característica também encontrada com predominância nas amostras de Minas Gerais (Figura 14).

Figura 12. Demonstrativo da mutação presente na posição 241, onde ocorreu a troca de uma Adenina por uma Guanina, acarretando na troca de uma Cisteína (Cys) por uma Tirosina (Tyr) em amostras provenientes de São Paulo.

Figura 13. Demonstrativo da mutação presente na posição 337, 338 e 339, onde ocorreu deleção de duas Adeninas e uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu) e uma Glicina (Gly), em amostras provenientes de São Paulo.

Figura 14. Demonstrativo da mutação presente na posição 336 e 337, onde ocorreu troca de uma Adenina por uma Guanina e a inserção de uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu), em amostras provenientes de São Paulo.

6.3 SEQUENCIAMENTO DE SANGER – AMOSTRAS DO RIO GRANDE DO NORTE

Dentre as amostras provenientes do Rio Grande do Norte, 45% possuíam uma mutação pontual combinada com a mutação predominante nas amostras de Minas Gerais, a qual se caracteriza pela inserção de uma Guanina na posição 334, combinada com a troca de uma Adenina por uma Guanina na posição 336 e com a inserção de uma Guanina na posição 337, gerando a deleção de um Glutamato (Glu) (Figura 15), o mesmo impacto presente nas amostras de Minas Gerais.

Figura 15. Demonstrativo da mutação presente na posição 334 e 3367, onde ocorreu a inserção de uma Guanina e a troca de uma Adenina por uma Guanina, respectivamente, acarretando na deleção de um Glutamato (Glu) em amostras provenientes do Rio Grande do Norte.

DISCUSSÃO

Diferentes genótipos de *L. (L.) infantum* são descritos, e, em geral, relacionados principalmente com a área de transmissão e com o reservatório. No entanto, sabe-se muito pouco a respeito do grau de diferenciação genotípica e sobre as possíveis consequências trazidas pelas mesmas, em que local do genoma do parasito se encontram as possíveis mutações, se diferentes genótipos de *Leishmania (L.) infantum* estariam relacionados com a região geográfica de ocorrência e se haveria genótipos relacionados à coinfeção com HIV.

A detecção de diferentes genótipos pode ser obtida por diferentes técnicas em diferentes materiais biológicos. Com o intuito de avaliar a presença de mutações em *Leishmania (L.) infantum* e sua correlação com variados hospedeiros, Alonso et al (2010) (22), analisaram diferentes cepas, utilizando amostras de medula óssea de cães, cultura de isolados de humanos e de flebotomíneos, amplificando a totalidade do minicírculo do kDNA com os oligonucleotídeos LINR4/LIN19 (aproximadamente 720pb), para posterior digestão enzimática por meio do RFLP. Estes autores observaram heterogeneidade genética quando foram comparadas as amostras de diferentes hospedeiros, porém ao analisar cada hospedeiro individualmente, as amostras demonstraram homogeneidade, entretanto vale ressaltar que todas eram colhidas da mesma região geográfica (Teresina – PI).

Com o objetivo de avaliarmos a presença de diferentes genótipos de *L. infantum* em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LV, provenientes de diferentes áreas geográficas, utilizamos a mesma estratégia utilizada por Alonso et al, 2010. Inicialmente amplificamos as amostras utilizando a PCR com os oligoiniciadores LINR4/LIN19 e observamos 52% de positividade. O baixo rendimento pode estar diretamente relacionado à baixa concentração de DNA, obtida

a partir dos esfregãos que encontravam-se armazenados a um longo tempo, o que pode ter comprometido a qualidade das amostras. Ainda que tenhamos minimizado este fator, após testarmos diferentes métodos de extração, escolhendo dentre eles o uso do protocolo fornecido pelo fabricante da Qiagen com hidratação prévia das lâminas. Trabalhos anteriores (24) descreviam que o tratamento prévio das lâminas com xilol, seria eficaz, porém, no trabalho referido, parâmetros como tempo de imersão em xilol e de retirada da lâmina, são descritos com subjetividade e sem períodos estabelecidos, dessa forma, a reprodução exata do método realizado não foi possível. Outros autores (28) descrevem a extração de DNA de lâminas utilizando kit comercial (Qiagen) sem tratamento prévio das amostras, apenas raspando o material com bisturi, porém, o rendimento mostrou-se inferior quando comparado ao rendimento obtido com hidratação. O protocolo estabelecido pelo fabricante determina que as lâminas sejam umedificadas com PBS 1x (Phosphate-buffered saline) pH 7,4 e posteriormente extraídas conforme as instruções, porém dessa forma não se recuperava a totalidade do material devido sua fixação na lâmina, além disso, a presença do corante poderia ser posteriormente, um fator prejudicial em relação à eficiência da PCR. Partindo do princípio da necessidade de primeiramente retirar a coloração da amostra e torna-la mais maleável no momento da raspagem, utilizamos a lógica inversa que se usa rotineiramente na imuno-histoquímica para fixar amostras em lâminas, fizemos o caminho inverso, imergindo-as em concentrações decrescentes de álcoois até a imersão final em água, com a finalidade de hidratar e assim facilitar a raspagem total do material e prosseguimento com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Esse tratamento resultou no aumento expressivo da quantidade e da qualidade do material extraído.

Utilizando uma abordagem diferente da utilizada por Alonso et al, (2010) em relação a comparação, no atual trabalho, foi considerada a procedência da amostra buscando verificar se havia correlação entre as alterações encontradas e a região geográfica. Como os autores citados, ao analisarmos os dendrogramas construídos a partir das análises das amostras amplificadas e digeridas no sistema LINR4/LIN19 - PCR/RFLP (RsaI), observamos a presença de heterogeneidade genética porém devido a baixa quantidade de amostras digeridas com êxito, não foi possível observar aglomerados bem definidos, somente pequenas tendências de agrupamento nas amostras do Rio Grande do Norte. Também devido à pequena quantidade de amostras que obtivemos êxito em digerir, não foi possível aglomerar em *clusters* definidos amostras provenientes de Minas Gerais, além disso, as amostras de São Paulo não apresentaram nenhum padrão de digestão.

Do ponto de vista de análise dos resultados obtidos com a digestão do amplificado com HpaII, os dados encontrados foram discordantes dos observados no trabalho de Alonso et al (2010), no qual as amostras amplificadas com LINR4/LIN19 apresentavam heterogeneidade. De acordo com nossas análises não foi possível construir um dendrograma, devido a presença de um padrão de digestão homogêneo, exceto nas amostras de Rio Grande do Norte nas quais não ocorreu digestão dos fragmentos, predizendo que possivelmente o sítio de ligação dessa enzima pudesse não estar íntegro ou até mesmo mutado nos parasitos provenientes dessa região geográfica do país. Não foi realizado o sequenciamento de Sanger desse alvo devido à baixa qualidade dos produtos amplificados, já que as amostras inicialmente sequenciadas apresentavam duas linhas de base e assim, tornou-se impossível diferenciar qual nucleotídeo realmente estava presente em cada posição. Para melhoramento dos amplificados nesse sentido foram utilizadas algumas estratégias como: purificar a

amostra diretamente do gel de agarose, purificar com kits diferentes e até mesmo tentar aumentar a quantidade de material disponível na reação, porém nenhuma das estratégias citadas foi eficaz para a obtenção de um sequenciamento de qualidade.

Buscando preencher a lacuna deixada pela discordância dos dados encontrados com os resultados da restrição enzimática com HpaII dos amplificadores com LINR4/LIN19, fez-se necessária a busca de dados mais consistentes no que se refere à homogeneidade de padrões de digestão do minicírculo do kDNA. Diante disso, optamos por utilizar oligoiniciadores que amplificassem a mesma região previamente analisada porém com dados mais consistentes e que permitissem que o sequenciamento fosse realizado com sucesso. Os oligoiniciadores escolhidos foram MC1/MC2, devido ao seu alto poder discriminatório. O mesmo alvo foi utilizado por Cortes et al, 2006 (25) para verificação de heterogeneidade genética em amostras de diferentes regiões geográficas de Portugal e coletadas de cães, flebotomíneos e humanos, porém foi realizada somente correlação direta entre região de procedência geográfica do isolado e o genótipo variante. Entretanto, no que se refere à análises com esse alvo em amostras brasileiras, um trabalho realizado por Silva et al 2015 (29) para análise de heterogeneidade de isolados de *L. (L.) infantum* em amostras de cães, humanos com formas clínicas e idades diversas advindos de Minas Gerais, entretanto, encontrou homogeneidade nos padrões de digestão, permitindo inferir que nesse estado não haveriam genótipos diverso circulando. No entanto, a baixa quantidade de amostras analisadas pode ter sido um fator limitante para que fossem encontradas variações genotípicas. Sendo assim, buscando dados mais consistentes no que se refere à heterogeneidade genética, foi realizada a amplificação de uma região do minicírculo com 447pb utilizando-se os primers MC1/MC2. A fim de obtermos *clusters* melhor

definidos, o número de amostras foi idealizado de forma que isso não fosse um fator delimitante (30, 31) para a construção do dendrograma. Deste modo, foram utilizadas 160 amostras somente de humanos variando somente a presença ou não da coinfeção com HIV e a região geográfica de procedência. Comparando cepas de *L. infantum* de cães, provenientes de diferentes áreas geográficas de São Paulo, através da análise de microssatélites, Motoie et al (2013) (30), compararam cepas de *L. (L.) infantum* de cães, provenientes de São Paulo, e observaram três subpopulações distintas que se distribuíam de acordo com a localização geográfica, demonstrando que com outras técnicas, seria possível detectar populações heterogêneas até mesmo dentro da mesma área de circulação de *L. infantum*. Analisando cepas dessa mesma espécie, provenientes de pacientes com LV e coinfectados LV-HIV do estado de São Paulo, Queiroz-Silva (2013) (31) observou diferentes genótipos, porém sem correlação dessa característica com o desfecho clínico do paciente (óbito ou cura) ou com a coinfeção ou não com HIV.

Os dados obtidos na PCR-RFLP com MC1/MC2 e utilizando as enzimas *RsaI* e *HpaII* foram aglomerados em dendrogramas separadamente, considerando-se que as digestões também foram feitas de forma independentes e consequentemente os géis também. Os dendrogramas criados utilizam como indicador de tempo de diferenciação genotípica o tamanho dos braços no qual a amostra encontra-se ligada. Dessa forma em ambos dendrogramas foi possível observar que a presença ou ausência de HIV nas amostras não foi responsável pela variação genotípica, considerando que as amostras de indivíduos coinfectados não obedecem uma ordem fixa e não estão diretamente ligadas a um agrupamento específico.

No que se refere à correlação com a distribuição geográfica, os genótipos variantes parecem estar diretamente relacionados à área de proveniência. Seguindo o princípio

de que o tamanho do braço do dendrograma está ligado ao tempo de diferenciação, todas as áreas respeitam a descrição de trabalhos anteriores, que retratam o Rio Grande do Norte e Minas Gerais como regiões de transmissão mais antigas e mais afetadas, enquanto São Paulo vem apresentando crescente número de casos, porém mais recentemente (33), dessa forma, os dados epidemiológicos corroboram os dados encontrados nos dendrogramas construídos a partir dos dados da PCR-RFLP, onde nos extremos da diferenciação se encontram aglomerados de amostras advindas de regiões com histórico de maior tempo de introdução da doença, diminuindo a diferenciação ao passo que se diminui o tempo de introdução da LV no estado.

Para confirmação e verificação do nível das mutações e o impacto possivelmente causado pelas mesmas, foi realizado o sequenciamento de Sanger. É importante afirmar que tal metodologia não foi previamente aplicada utilizando como alvo a região hipervariável do minicírculo do kDNA amplificada com os oligonucleotídeos MC1/MC2 nos trabalhos citados, e não permitindo que tivéssemos um padrão de referência. O trabalho realizado por Silva et al, 2015 (29) encontraram homogeneidade quando comparado ao genótipo B previamente descrito como original do Brasil. No entanto, o sequenciamento foi realizado somente *in silico* utilizando o software *RestrictionMapper*, não corroborando os dados encontrados no presente trabalho, no qual identificamos mutações características de cada região geográfica e uma mutação em comum presente em todas essas regiões e até mesmo na cepa referência utilizada como controle positivo, sendo ela a mutação na posição 189 a qual acarreta na troca de uma Treonina (Thr) por uma Alanina (Ala).

Por fim, é possível afirmar que, utilizando diferentes métodos de avaliação genotípica de *infantum* em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de LV, provenientes de diferentes áreas geográficas e coinfectados ou não com HIV,

nossos achados permitem-nos inferir que há diferentes genótipos de *L. infantum* circulando no Brasil. No entanto, esses genótipos não parecem ter relação com a infecção pelo HIV. Um olhar mais pormenorizado permite-nos inferir que em determinadas áreas geográficas, temos a presença de diferentes genótipos que parecem circular distintamente. As mutações e os dendrogramas permitem a observação da evolução do parasito no decorrer da expansão das áreas endêmicas, pois as regiões de transmissão mais antigas como Rio Grande do Norte e Minas Gerais demonstram menos acúmulo de mutações, enquanto que amostras de São Paulo apresentam além das mutações encontradas nos demais estados, novas variações que caracterizaram as amostras dessa região, este fato pode se dever à plasticidade do genoma de *L. infantum*. Um ponto crucial a ser avaliado em estudos posteriores é verificar se essas mutações estão relacionadas com alterações no metabolismo do parasito e se essa alteração poderia interferir na patogenia da leishmaniose visceral como um todo.

CONCLUSÃO

Foi possível detectar a presença de genótipos variantes de *Leishmania (L.) infantum* em amostras de pacientes com leishmaniose visceral e pacientes coinfectados com LV/HIV utilizando PCR com os oligoiniciadores MC1/MC2 e restrição enzimática com RsaI e HpaII, porém tais genótipos não estão relacionados à presença da coinfeção, considerando que mesclaram-se entre si nos dendrogramas e na análise do sequenciamento, as mutações permaneceram distribuídas de forma que não obedeciam ordem no que se refere à presença ou ausência de coinfeção LV/HIV. Entretanto, a correlação entre variação genotípica e região de procedência, mostrou-se existente na análise por PCR-RFLP e foi confirmada com o sequenciamento de Sanger utilizando os mesmos oligos, Dessa forma, ao encontrarmos mutações características do Rio Grande do Norte, de Minas Gerais e de São Paulo. Além da variação genotípica entre uma região e outra, foi possível observar genótipos variantes dentro da mesma região, porém, para obter agrupamentos consistentes intra estado, seria necessária a análise de um maior número de amostras, a fim de verificar a frequência da ocorrência de tais variações. As análises utilizando a PCR com os oligoiniciadores LINR4/LIN19 e as enzimas RsaI e HpaII demonstraram inconsistência, pois não corroboram dados anteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berman JD: Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis, 2007 Apr, 24(4):684–703.
2. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M, WHO Leishmaniasis Control Team: Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos One, 2012; 7(5):e356.
3. Lindoso JA CG, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, de Sousa-Gomes ML, Santos-Oliveira JR, Rabello A. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. PLoS Negl Trop Dis; 2014; 8(9):1-9.
4. Pastorino AC JC, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MM. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. J Pediatr 2002; 78(2):120-7.
5. Segatto M RL, Costa DL, Costa CH, Oliveira MR, Carvalho SF, Macedo AM, Valadares HM, Dietze R, Brito CF, Lemos EM. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Feb;107(1):39-47.
6. Lainson R, Shaw JJ. The leishmaniasis in biology and epidemiology. Evolution, classification and geographical distribution. London: Academic Press; 1987. p. 1- 120.
7. Palatnik-de-Sousa CB dSW, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2001; 65(5):510-7.
8. Gradoni L GM. *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status? Parasitol Today. 1994 10(7):264-7.
9. Pan American Health Organization. Leishmaniases. Epidemiological Report in the Americas. 2016. Report #4.

10. Cota GF dSM, Rabello A. Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in HIV Infected Patients: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(6):1-8.
11. de Oliveira JP FF, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, Barral A, de Oliveira CI. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. Kinetoplastid Biol Dis 2007; 6(5):1-8.
12. Stuart K., Kinetoplast DNA, mitochondrial dna with a difference. Mol Biochem Parasit, 1983 9: 93-104.
13. Noyes H.A., Reyburn H., Bailey J.W., Smith D. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. J. Clin. Microbiol. Oct. 1998; p. 2877–2881.
14. Angelici MC, Gradoni L Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. Parasitology
15. Leprohon P LD, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette M. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. Nucleic Acids Res. 2009; 37(5):1387-99.
16. Wincker P RC, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, Bastien P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Res. 1996; 24(9):1688-94.
17. Tibayrenc M AF. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol 2012; 18(9):405-10.
18. Balloux F LL, de Meeûs T. The population genetic of clonal and partially clonal

- diploids. *Genetics*; 2003; 164(4):1635-44.
19. Rougeron V DMT, Kako Ouraga S, Hide M, Bañuls AL. "Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)" in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. *PLoS Pathog*; 2010; 6(8):1-5.
  20. Gaunt MW YM, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR, Miles MA. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*; 2003; 421(6926):936-9.
  21. Machado CR A-PL, McCulloch R, Teixeira SM. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res*; 2006; 612(1):40-57.
  22. Dujardin JC BA, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, Le Ray D, Arevalo J, Tibayrenc M. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop* 1995; 59(4):293-307.
  23. Volf P BI, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *Int J Parasitol* 2007; 37(6):589-93.
  24. Schonian G., Jaffe C.L., et al, PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47; 349–358.
  25. Cortes S., Campino L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol Int* 2006; 55: 277– 283.
  26. Hamouchi A.E., Lemrani M., et al. Intraspecific genetic variability in a population of Moroccan *Leishmania infantum* revealed by PCR-RFLP of kDNA minicircles. *Acta Trop* 2017; 169; 142–149.
  27. Volf P SJ. Sex in *Leishmania*. *Science* 2009; 324(5935):1644.
  28. Alonso DP CD, de Mendonça IL, Costa CH, Ribolla PE. Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop*

- Med Hyg 2010; 82(5):819-21.
29. Silva T.A.M., Carneiro M., et al. Genetic homogeneity among *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* isolates from dog and human samples in Belo Horizonte Metropolitan Area (BHMA), Minas Gerais, Brazil. *Parasit. & Vectors* 2015; 8:226.
  30. Motoie G, Ferreira GE, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in Sao Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect Genet Evol*, 2013; 18:48-59.
  31. Queiroz-Silva I. TESE: Comorbidade leishmaniose visceral/AIDS no Estado de São Paulo, Brasil (1999-2010): aspectos epidemiológicos e moleculares. São Paulo. Tese [Doutorado em ciências] – Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. 2013.
  32. Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Canavate C, Cruz I, et al. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol* 2006; 6(6):440-6.
  33. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol*; 2003; 41(7):3126-32.
  34. Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, et al. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health*; 2006; 11(11):1708-14.
  35. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle

- kinetoplastic DNA. Appl Environ Microbiol 2000; 66(5):1933-8.
36. Reis L.L., Gonçalves M.J.F., et al, Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. Rev Soc Bras Med Trop; 2017; 50(5):638- 645.
37. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Kemp SJ, Noyes HA. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. Ann Trop Med Parasitol; 2002; 96(3):265-70.
38. Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schonian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. J Clin Microbiol; 2006; 44(2):495-503.

ANEXO I - TABELA DE ALTERAÇÕES GÊNICAS

A tabela a seguir relata detalhadamente as alterações encontradas em cada técnica utilizada em cada amostra e relaciona-as com a sua região de procedência geográfica.

Amostra	Alteração encontrada	Posição	Aminoácido trocado	Bandas com RsaI (aproximadamente)	Bandas com HpaII	Estado de origem
01	Troca A por G		Thr por Ala – 189 Deleção de Glu – 337	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção de AA					
02	Deleção TG	73 e 74	Leu por Ala – 72	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	189 (mesmo conflito com o genótipo O)	Thr por Ala – 189			
	Deleção de AA	337e 338 (mesmo conflito com o genótipo O)	Deleção de Glu – 337			
08	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	Sem o 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu – 336			
	Inserção G	337				
11	Troca A por G	179	Ile por Met – 179	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	186	Ile por Val – 186			
	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189			
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu – 337			
12	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	Não digeriu	410pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu – 336			
	Deleção de uma G	385	Deleção de Gly			

13	Não alinhou – repetir	Não é Leish		150pb, 300pb, 350pb e 500pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
14	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb	Montes Claros - MG
	Inserção G	337	Deleção de Glu – 337			
	Deleção de uma G	385	Deleção de Gly			
15	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb	Montes Claros - MG
	Inserção G	337	Deleção de Glu – 337			
16	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu – 336			
	Inserção G	337				
17	Sem mutação			194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
18	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu – 336			
	Inserção G	337				
84	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu – 336			
	Inserção G	337				
86	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu – 336			
	Troca de C por T	344	Troca sem troca de a.a.			
87	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Inserção G	334	Troca de Glu por Gly			
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
	Deleção de G	386	Deleção de Gly			

88	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu			
	Troca de C por T	343	Sem troca de a.a.			
	Troca CGT po TAA	344 a 346	Val por Lys			
89	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu – 336			
91	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	Não digeriu	Montes Claros - MG
	Deleção AAG	337, 338, 339	Deleção Glu e Gly			
92	Troca A por G	189	Thr por Ala – 189	194pb e 253pb	Não digeriu	Montes Claros - MG
	Troca T por C	208	Leu por Ser			
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu			
93	Troca A por G	125	Mutação sem troca de a.a.	194pb e 253pb	100pb, 410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	189	Thr por Ala			
	Inserção de G	335	Deleção de Glu			
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
94	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb sem o 37pb	Montes Claros - MG
	Troca G por C	213	Cys por Ser			
	Troca T por G	247	Troca Val por Gly			
	Deleção AA	336	Deleção de Glu			
95	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Inserção G	334	Deleção de Glu			
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Troca de Glu por Gly			

98	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
100	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
107	Troca A por G	189	Thr por Ala	400pb + bandas esperadas	410pb sem o 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu			
109	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Inserção G	334	Deleção de Glu			
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Troca de Glu por Gly			
111	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca G por T	296	Sem troca de a.a.			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
112	Troca A por G	57	Troca Ile por Val	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca de A por C	184	Troca Asp por Ala			
	Troca A por G	189	Troca Thr por Ala			
	Troca A por C	195	Troca Thr por Pro			
	Troca A por G	336	Deleção Glu			
	Inserção G	337	Deleção Glu			
114	Deleção de Glu	Deleção de Glu	Deleção de Glu	194pb e 253pb	Não digeriu	Montes Claros - MG
	Deleção AA	332 e 333	Sem troca de a.a.			

115	Troca A por G	189	Thr por Ala	400pb + bandas esperadas	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu			
117	Troca A por G	189	Thr por Ala	400pb + bandas esperadas	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
118	Troca A por G	189	Thr por Ala	400pb + bandas esperadas	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção de AA	337e 338	Deleção de Glu			
121	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	Não digeriu	Montes Claros - MG
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
122	Troca de A por G	181	Sem troca de a.a.	194pb e 253pb	Não digeriu	Montes Claros - MG
124	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	Não digeriu	Montes Claros - MG
	Deleção AA	336 e 337	Deleção de Glu			
125	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
	Troca de G por A	354	Troca Gly por Arg			
126	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Troca A por G	337	Deleção de Glu			
	Inserção G	338	Deleção de Glu			
127	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção AA	336 e 337	Deleção de Glu			

128	Troca A por G	181	Troca Tyr por Cys	194pb e 253pb	410pb e 37pb	Montes Claros - MG
	Deleção AAG	328 a 330	Deleção Val e Gly			
301	Troca A por G	131	Sem troca de a.a.	194pb, 253pb, 400pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Troca A por G	189	Thr por Ala			
	Troca G por A	241	Troca Cys por Tyr			
302	Troca A por C	26	Troca Stop por Cys	194pb, 253pb, 400pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Troca A por G	189	Thr por Ala			
	Troca G por A	241	Troca Cys por Tyr			
	Troca A por G	307	Troca Glu por Gly			
	Deleção de AAG	337, 338, 339	Deleção de Glu e Gly			
303	Troca de A por G	181	Sem troca de a.a.	Não digeriu	Não digeriu	São Paulo
309	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
311	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb, 253pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Troca G por A	241	Troca Cys por Tyr			
	Deleção AAG	337, 338, 339	Deleção de Glu e Gly			
313	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb, 253pb, 400pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Troca G por A	241	Troca Cys por Tyr			
	Troca A por G	307	Troca Glu por Gly			
	Deleção AAG	337, 338, 339	Deleção de Glu e Gly			
316	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Troca de G por T	364	Troca Trp por Leu			

318	Troca A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
322	Inserção de A	154	Sem troca de aa	194pb e 253pb	410pb, 37pb e 150pb	São Paulo
	Troca de A por G	189	Thr por Ala			
	Troca G por T	320	Ile por Met			
	Troca T por G	331	Leu por Arg			
	Inserção de G	334	Deleção de Leu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Trp			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
	Troca T por C	391	Phe por Ser			
	Troca C por A	393	Troca Gln por Lys			
327	Troca A por G	131	Stop por Trp	194pb, 253pb, 100pb	410pb, 37pb e 100pb	São Paulo
	Troca de A por G	189	Thr por Ala			
	Troca G por A	241	Cys por Tyr			
	Troca A por G	307	Glu por Gly			
	Deleção AA	337 338	Deleção Glu			
328	Troca A por G	131	Stop por Trp	194pb, 253pb, 100pb e 50pb	410pb, 37pb e 100pb	São Paulo
	Troca de A por G	189	Thr por Ala			
	Troca G por A	241	Cys por Tyr			
	Troca A por G	307	Glu por Gly			
	Deleção AA	337 338	Deleção Glu			
329	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Troca de A por G	336	Deleção de Trp			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
	Troca G por A	382	Gly por Glu			

330	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Deleção AA	337 338	Deleção de Glu			
	Troca C por T	344	Sem troca de aa			
	Troca T por C	391	Phe por Ser			
	Troca C por A	393	Gln por Lys			
333	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
	Troca de G por A	382	Troca de Gly por Glu			
335	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Troca A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção G	337	Deleção de Glu			
339	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Troca G por A	241	Cys por Tyr			
	Troca de A por G	307	Glu por Gly			
	Deleção AAG	337 338 e 339	Deleção Glu e Gly			
340	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Inserção de G	332	Deleção Trp			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
342	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb, 253pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Deleção AA	337 338	Deleção Glu			
344	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Deleção AA	337 338	Deleção Glu			
345	Troca de A por G	182	Sem troca de aa	194pb, 253pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Deleção de AA	330 331	Deleção Lys			

346	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb e 37pb	São Paulo
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
347	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Deleção AAG	337 338 e 339	Deleção Glu e Gly			
348	Troca de A por G	182	Sem troca de aa	194pb, 253pb	410pb sem o 37pb	São Paulo
	Deleção AA	330 331	Deleção Lys			
	Troca de T por A	334	Troca Val por Glu			
200	Troca de A por G	189	Thr por Ala	50pb, 194pb, 253pb e 350pb		Natal - RN
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
	Troca T por G	364	Troca Trp por Leu			
201	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
205	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
206	Troca de A por G	189	Thr por Ala	150pb, 194pb, 253pb	410pb, 37pb, 100pb	Natal - RN
207	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
208	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			

209	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
210	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	Somente 410pb	Natal - RN
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
	Troca G por T	364	Troca Trp por Leu			
211	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
212	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	Somente 410pb	Natal - RN
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
213	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
214	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	Somente 410pb	Natal - RN
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
215	Troca de A por G	143	Sem troca de aa	Não digeriu	Não digeriu	Natal - RN
	Deleção de G	278	Deleção de Gly			
	Troca de A por G	291	Deleção de Lys			
	Inserção de G	292	Deleção de Lys			

216	Troca de A por C	26	Troca Stop por Cys	150pb		Natal - RN
	Troca de C por T	128	Sem troca de aa			
	Troca de A por G	135	Ser por Gly			
	Troca de A por G	189	Thr por Ala			
	Deleção de G	324	Deleção Val			
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
217	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	335	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
219	Troca de A por G	189	Thr por Ala	150pb		Natal - RN
	Inserção de G	335	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
220	Troca de A por G	189	Thr por Ala	194pb e 253pb	Somente 410pb	Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
222	Troca de A por G	189	Thr por Ala	150pb, 194pb, 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			
	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
226	Troca de A por G	189	Thr por Ala	150pb, 194pb, 253pb		Natal - RN
	Inserção de G	334	Deleção de Glu			

	Troca de A por G	336	Deleção de Glu			
	Inserção de G	337	Deleção de Glu			
227	Troca A por G	184	Troca Tyr por Cys	194pb e 253pb	50pb, 80pb, 100pb, 150pb, 200pb, 250pb, 410pb	Natal - RN
	Troca A por G	331	Sem mudança de aa			
	Inserção G	332	Sem mudança de aa			