



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

YLSO DOS SANTOS QUEIROZ FILHO

**LEISHMANIOSE VISCERAL: PANORAMA GERAL DA  
DOENÇA E TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS NO  
ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA**

Recife

2023

YLSOSON DOS SANTOS QUEIROZ FILHO

**LEISHMANIOSE VISCERAL: PANORAMA GERAL DA  
DOENÇA E TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADOS NO  
ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Biomedicina da Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Wheverton Ricardo  
Correia do Nascimento  
Coorientador: Me. Jôuldes Matos Duarte

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Queiroz Filho, Ylson dos Santos .

Leishmaniose visceral: Panorama geral da doença e técnicas moleculares  
utilizadas no estudo da variabilidade genética / Ylson dos Santos Queiroz  
Filho. - Recife, 2023.

85 : il., tab.

Orientador(a): Wheverton Ricardo Correia do Nascimento

Coorientador(a): Jôuldes Matos Duarte

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Diversidade genética. 2. Técnicas moleculares. 3. Clonalidade. 4.  
Sexualidade. 5. Reprodução. I. Correia do Nascimento, Wheverton Ricardo.  
(Orientação). II. Matos Duarte, Jôuldes. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

YLSOSON DOS SANTOS QUEIROZ FILHO

**LEISHMANIOSE VISCERAL: PANORAMA GERAL DA  
DOENÇA E TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADOS NO  
ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Biomedicina da Universidade  
Federal de Pernambuco, como pré-  
requisito à obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 28/04/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento  
Departamento de Medicina Tropical - UFPE

---

Prof. Dra. Vláudia Maria Assis Costa  
Departamento de Medicina Tropical - UFPE

---

Prof. Dr. Walter Lins Barbosa Júnior  
Departamento de Parasitologia / Instituto Aggeu Magalhães - IAM / Fiocruz

Dedico este trabalho a minha mãe Maria Claudete Venâncio da Silva Queiroz e ao meu pai Ylson dos Santos Queiroz que me apoiaram e propiciaram todas as condições necessárias para chegar até o presente momento.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento, por aceitar conduzir o meu trabalho, pelo seu incentivo e dedicação que resultaram no meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional. Sempre admirei o senhor desde que fui seu aluno e quando me tornei monitor na sua disciplina minha admiração, não só profissional como pessoal, só fez aumentar, chegando à conclusão que meu orientador para meu trabalho de conclusão de curso tinha que ser o senhor. Muito obrigado professor!

A todos os professores que contribuíram com a minha formação acadêmica e profissional durante a minha vida, cuja dedicação e atenção foram essenciais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço a meus pais, que além de serem meus melhores amigos sempre estiveram comigo em todos os momentos da minha vida. Grato pelos puxões de orelha, pelos conselhos e por me incentivar e proporcionar as condições necessárias para iniciar e concluir essa graduação. Hoje a pessoa que estou me tornando é graças aos seus ensinamentos, vocês são minhas maiores inspirações de vida da pessoa que eu quero me tornar.

Agradeço a todos meus familiares, a minha avó, a minhas tias, meus primos e primas. Dedico especialmente essa conquista a minha bisavó Deosdenia, (post mortem), uma mulher que sempre cuidou de mim, torceu e comemorou todas as minhas vitórias e infelizmente não vai estar aqui para ver minha vitória maior que vai ser a conclusão dessa fase da minha vida, a saudade é enorme, mas sei que ela está muito feliz com o homem que estou me tornando.

Agradeço a meus amigos do Saidera, Raquel, Evelyn, Gabriela, Ingryd e Italo, que desde a época da escola estão comigo. São pessoas que sempre me proporcionaram momentos incríveis e estiveram presentes nos momentos delicados, sou muito feliz por ter a amizade de vocês e por poder comemorar cada conquista, amo vocês!

Agradeço ao grupo Porto em Algum Lugar, Wictor, Lucas, Samara, Tamiriz, Helliny, Daniel e Nathália. A amizade de vocês foi fundamental para a passar pelas dificuldades da vida acadêmica e pessoal, grato pelas saídas, pelas risadas, pelas festas, pelos sushis e principalmente pela companhia, muito obrigado!

Agradeço ao Clube das Winx, Ana, Stephane, Joyce, Vitória e Alberto. A companhia de vocês, as reuniões para estudar, as brincadeiras, os resumos, as risadas e as companhias das aulas durante da graduação foram essenciais para chegar até a conclusão.

Agradeço a minha filha, Chiara, que mesmo sendo uma cachorrinha é o amor da minha vida. Mesmo sem entender, sempre me fez companhia quando estava estudando e tentava me animar quando algo acontecia e me deixava para baixo. Sou o pai mais feliz do mundo por ter a filha mais linda que um pai de pet poderia ter, te amo infinitamente!

Agradeço especialmente a Jorge Henrique, que está além de ser o meu melhor amigo é ser a pessoa mais parceira e compreensiva do mundo, o seu incentivo e a sua compreensão as várias horas em que estive ausente por causa do desenvolvimento deste trabalho foram cruciais para mim, muito obrigado mesmo, eu te amo muito!

SANTOS, Ylson. **Leishmaniose visceral: Panorama geral da doença e técnicas moleculares utilizados no estudo da variabilidade genética**. 2023. 85 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Olinda, 2023.

## RESUMO

Leishmaniose é um conjunto de doenças causada por protozoários parasitas obrigatórios do gênero *Leishmania* transmitida por insetos vetores fêmeas da família *Psychodidae*. Com registros de casos datados de 2.500 AC até os dias atuais, a Leishmaniose são doenças que despertam a curiosidade de médicos e pesquisadores devido aos variados sintomas, sua endemicidade associadas a áreas tropicais, subtropicais e da bacia do Mediterrâneo, diferentes vetores e sub gêneros relacionados a transmissão. Porém, a variabilidade genética descrita dentro do gênero ainda é alvo de diversos estudos para elucidar a sua origem e capacidade de adaptação que influencia na dispersão do parasito no ambiente e sua relação com os hospedeiros. Com o avanço da ciência e ao advento da biologia molecular, o desenvolvimento e aplicação de técnicas em estudos epidemiológicos de leishmanioses, como por exemplo, o uso de marcadores genéticos passou a ser aplicado na elucidação de questões relacionadas à taxonomia, evolução, resistência e imunossupressão, além da detecção de diversidade genética intraespecífica e interespecífica apresentada, pois deve-se ressaltar que a plasticidade genotípica dos parasitas e vetores das leishmanioses possibilitou a adaptação às mais adversas condições para a obtenção de vantagem seletivas nos ciclos de transmissão. Dentre as principais técnicas moleculares para avaliar polimorfismos, variabilidade genética e clonalidade entre as espécies, destacam-se, a eletroforese de multilocos enzimáticos, a análise dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição, os polimorfismos de DNA amplificado ao acaso, a PCR de iniciador único em condições de baixa estringência, a PCR ancorada a repetições de sequências simples, o Sequenciamento de DNA através da tipagem por sequenciamento de multilocos e tipagem por multilocos de microssatélites. Dada a importância da gravidade da leishmaniose visceral, o alto número de casos no Brasil e a necessidade do controle epidemiológico da doença, o presente trabalho tem como objetivo investigar, por meio de revisão narrativa da literatura a diversidade genética e o impacto da clonalidade e sexualidade nas espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose visceral através do emprego de técnicas da biologia molecular, onde observou-se a importância da aplicação das técnicas em estudos referentes a pluralidade gênica nas espécies e a prevalência da reprodução clonal em detrimento da reprodução sexual.

**Palavras-chave:** Diversidade genética; Técnicas moleculares; Clonalidade; Sexualidade; Reprodução.

SANTOS, Ylson. **Visceral leishmaniasis: Overview of the disease and molecular techniques used in the study of genetic variability**. 2023. 85 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Olinda, 2023.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a set of diseases caused by obligate protozoan parasites of the genus *Leishmania* transmitted by female insect vectors of the Psychodidae family. With case records dating from 2,500 BC to the present day, Leishmaniasis are diseases that arouse the curiosity of physicians and researchers due to the varied symptoms, their endemicity associated with tropical, subtropical and Mediterranean basin areas, different vectors and related subgenera the transmission. However, the genetic variability described within the genus is still the subject of several studies to elucidate its origin and adaptability that influences the dispersion of the parasite in the environment and its relationship with the hosts. With the advancement of science and the advent of molecular biology, the development and application of techniques in epidemiological studies of leishmaniasis, such as the use of genetic markers, began to be applied in the elucidation of issues related to taxonomy, evolution, resistance and immunosuppression, in addition to the detection of intraspecific and interspecific genetic diversity presented, since it should be noted that the genotypic plasticity of the parasites and vectors of leishmaniasis made it possible to adapt to the most adverse conditions to obtain selective advantage in the transmission cycles. Among the main molecular techniques to evaluate polymorphisms, genetic variability and clonality among species, the following stand out: enzymatic multilocus electrophoresis, analysis of restriction fragment size polymorphisms, random amplified DNA polymorphisms, primer PCR DNA sequencing under low stringency conditions, PCR anchored to single sequence repeats, DNA sequencing by multilocus sequencing typing, and microsatellite multilocus typing. Given the importance of the severity of visceral leishmaniasis, the high number of cases in Brazil and the need for epidemiological control of the disease, the present work aims to investigate, through a narrative review of the literature, the genetic diversity and the impact of clonality and sexuality in the species *Leishmania* causing visceral leishmaniasis through the use of molecular biology techniques, where the importance of applying the techniques in studies regarding the genetic plurality in species and the prevalence of clonal reproduction to the detriment of sexual reproduction was observed.

**Keywords:** Genetic diversity; Molecular techniques; Clonality; Sexuality; Reproduction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Casos de leishmaniose visceral por UF no Brasil em 2021.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 19 |
| Figura 2: Casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2021. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 19 |
| Figura 3: Classificação da <i>Leishmania</i> em gênero, subgênero, complexos e espécies<br>.....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 24 |
| Figura 4: Formas amastigotas da <i>Leishmania</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 25 |
| Figura 5: Formas promastigotas da <i>Leishmania</i> sp.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 26 |
| Figura 6: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 27 |
| Figura 7: Perfil enzimático do sistema Glucose-6 Fosfato desidrogenase - G6PDH (A);<br>Perfil enzimático do sistema fosfoglucomutase – PGM (B); Perfil enzimático do<br>sistema Malato Desidrogenase - MDH (C).....                                                                                                                                                                  | 47 |
| Figura 8: Eletroforese em gel de acrilamida a 10% impregnado por prata. M: marcador<br>de peso molecular 50pb, cepas de referência: La: <i>Leishmania amazonensis</i> , Lb:<br><i>Leishmania braziliensis</i> , Lc: <i>Leishmania chagasi</i> , amostras positivas de flebotomíneos<br>provenientes de área de transmissão intensa de LV estão identificadas pelos números.<br>..... | 52 |
| Figura 9: Perfis RAPD obtidos com os primers OP-O7 (A) e OP-O13 (B) para ilustrar<br>exemplos de perfis monomórficos e polimórficos. SD: Sudão; TN: Tunísia; M:<br>marcador de tamanho de DNA de 100 pb. ....                                                                                                                                                                        | 56 |
| Figura 10: Assinaturas de KDNA do fragmento de minicírculo de 447 pb de <i>L. infantum</i><br>isoladas de pacientes humanos. Os produtos da reação LSSP-PCR foram carregados<br>em cada pista de um gel de poliacrilamida a 6% e corados com prata. ....                                                                                                                             | 59 |
| Figura 11: SSR-PCR de <i>L. braziliensis</i> M2903 (linha 2), <i>L. amazonensis</i> PH8 (linha 3),<br><i>L. major</i> - cepas BH49 (linha 4) e BH121 (linha 5) e cepas de referência da OMS de<br><i>L. major</i> FN (linha 6) e 5ASKH (linha 7). A escada Kb DNA é mostrada (linha 1).....                                                                                          | 62 |
| Figura 12: Alvos de tipagem de sequência multilocus para <i>Leishmania donovani</i> . SNP,<br>polimorfismo de nucleotídeo único; GPI, glucose-6-fosfato isomerase; ICD, isocitrato<br>desidrogenase; Ch, cromossomo. a: Codificando o marcador nuclear, b: Marcador<br>nuclear não codificante.....                                                                                  | 64 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1: Artigos selecionados para o estudo da variabilidade genética em <i>Leishmania</i> spp. .... | 42 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

|            |                                   |
|------------|-----------------------------------|
| <b>DNA</b> | Ácido Desoxirribonucleico         |
| <b>IRT</b> | Tipagem de região intergênica     |
| <b>MLG</b> | Genótipos multilocus              |
| <b>PCR</b> | Reação em Cadeia da Polimerase    |
| <b>OMS</b> | Organização Mundial da Saúde      |
| <b>SNP</b> | Polimorfismo de nucleotídeo único |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                            | <b>15</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                                  | <b>17</b> |
| 2.1 Epidemiologia .....                                                                                               | 17        |
| 2.2 História da Leishmaniose.....                                                                                     | 20        |
| 2.3 Classificação do parasita .....                                                                                   | 23        |
| 2.4 Morfologia .....                                                                                                  | 24        |
| 2.5 Ciclo biológico.....                                                                                              | 26        |
| 2.6 Aspectos clínicos da doença .....                                                                                 | 28        |
| 2.7 Diagnóstico .....                                                                                                 | 30        |
| 2.8 Tratamento .....                                                                                                  | 32        |
| 2.9 Genética .....                                                                                                    | 33        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                                                                              | <b>36</b> |
| 3.1 Objetivo geral.....                                                                                               | 36        |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                                                       | 36        |
| <b>4. METODOLOGIA .....</b>                                                                                           | <b>37</b> |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>                                                                                             | <b>37</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                             | <b>43</b> |
| 6.1 Clonalidade versus sexualidade .....                                                                              | 43        |
| 6.2. Testes moleculares utilizados na análise da diversidade genética em Leishmania .....                             | 45        |
| 6.3 Eletroforese de multilocos enzimáticos ( <i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i> , MLEE).....                    | 45        |
| 6.4 Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , RFLP)..... | 51        |
| 6.5 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> , RAPD) .....                  | 55        |

|                                                                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.6 PCR de iniciador único em condições de baixa estringência ( <i>Low-Stringency Single Specific Primer-PCR</i> , LSSP-PCR) .....                                                                                  | 58        |
| 6.7 PCR ancorada a repetições de sequências simples ( <i>Simple Sequence Repeats-PCR</i> , SSR-PCR) .....                                                                                                           | 61        |
| 6.8 Sequenciamento de DNA, tipagem por sequenciamento de multilocos ( <i>Multilocus Sequence Typing</i> , MLST) e tipagem por multilocos de microssatélites ( <i>Multilocus Microsatellite Typing</i> , MLMT) ..... | 63        |
| <b>7. CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                           | <b>68</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                          | <b>69</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Leishmanioses são um conjunto de antroponozoonoses que figura entre as seis endemias prioritárias do mundo de acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde) (GONTIJO; MEL, 2004). A doença é causada por um protozoário pertencente ao gênero *Leishmania*, sendo transmitida através da picada de insetos hematófagos denominados de flebótomos ou flebotomíneos e chamados popularmente de mosquito palha ou birigui, podendo infectar além do ser humano, animais silvestres e domésticos (VILELA, 2013).

Segundo a OMS, ocorrem cerca de 50.000 novos casos de leishmaniose visceral por ano, sendo relatada a circulação da doença em 80 países sendo a maioria localizados em regiões tropicais e subtropicais (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021). A Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil representam 90% da ocorrência dos casos em todo o mundo (ZIJLSTRA, 2021). A leishmaniose visceral é endêmica em vários países da América Latina, sendo o Brasil o país com o maior número de casos notificados. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), em 2020 foram registrados mais de 11 mil casos de leishmaniose visceral nas Américas, com uma taxa de mortalidade de cerca de 5%. Além do Brasil, outros países da América Latina com alta incidência de leishmaniose visceral são Argentina, Colômbia, México e Venezuela (OPAS, 2022). De acordo com Ministério da Saúde, em 2021 foram detectados 1.683 de leishmaniose visceral no Brasil, sendo 265 casos no Norte, 775 casos no Nordeste, 233 casos na região Sudeste, 6 casos no Sul do país e 83 casos no Centro-oeste (SINAN/SVS/MS, 2021).

O protozoário causador da doença apresenta um ciclo heteroxênico possuindo um hospedeiro invertebrado, a fêmea infectada do inseto flebotomíneo, e um hospedeiro vertebrado, o ser humano (VILELA, 2013). Devido a diversidade de espécies de *Leishmania*, distribuições geográficas específicas, juntamente com a resposta imunológica de cada hospedeiro frente a infecção apresenta-se dois tipos de leishmaniose: a forma tegumentar ou cutânea e visceral ou calazar (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021). Na leishmaniose cutânea as lesões mais comuns são úlceras e em situações mais graves podem lesionar as mucosas orais e nasais, já a leishmaniose visceral acomete órgãos internos como o baço, medula óssea e fígado

e apresenta sintomatologia variada de acordo com a localização no organismo do hospedeiro e carga parasitária (VILELA, 2013; PRADHAN *et al.*, 2022).

Uma vez que a diversidade das populações parasitárias poderia influenciar a evolução e a distribuição de caracteres relacionados à virulência, resistência às drogas e à infectividade, surgiram diversas técnicas de biologia molecular para estudo desta variabilidade genética interespecífica e intraespecífica (ROUGERON *et al.*, 2011). Uma das primeiras técnicas desenvolvidas, *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), baseou-se na análise de polimorfismos de enzimas que atuam nas vias metabólicas. Esta técnica objetivou resolver questionamentos de taxonomia evolutiva, epidemiologia molecular e apresentações clínicas diferenciadas (SCHÖNIAN; KUHLS; MAURICIO, 2011). Adicionalmente, surgiram outras técnicas, como *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (CUPONILLO *et al.*, 2003), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (MKADA-DRISS *et al.*, 2014), *Low-Stringency Single Specific Primer-PCR* (LSSP-PCR) (ALVARENGA *et al.*, 2012), *Simple Sequence Repeats-PCR* (SSR-PCR) (SEGATTO; LEMOS, 2012) *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (ZHANG *et al.*, 2013) e *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT) (KUHLS ET AL., 2007).

Baseado nos resultados da biologia molecular, teorias foram criadas a fim de explicar a variabilidade genética dentro do gênero *Leishmania*, baseadas principalmente no debate entre a reprodução clonal e sexual (AVISE, 2015). Dentre os principais modelos destacam-se os que sugerem que a reprodução ocorreria de maneira sexuada, onde o genótipo seria instável e sofreria alterações a cada recombinação (sexualidade). Por outro lado, outro modelo afirma que se trataria de uma espécie clonal mantendo seu genótipo estável sem sofrer recombinação ao longo do espaço e do tempo (clonalidade) (TIBAYRENC; AYALA, 2021).

Embora muito se tenha avançado na compreensão da história natural das leishmanioses, a variabilidade genética continua sendo área repleta de possibilidades para estudos (RAMÍREZ; LLEWELLYN, 2014). A utilização de técnicas moleculares para solucionar dúvidas e projetar perspectivas futuras nas relações parasita-hospedeiro podem ser úteis na avaliação da virulência e na identificação de possíveis alvos terapêuticos (SILVA; ALVES, 2014). Portanto, o objetivo desta revisão foi realizar uma fundamentação teórica sobre marcadores moleculares utilizados no estudo da variabilidade genética intra e interespecífica de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose visceral (TIBAYRENC; AYALA, 2021).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fundamentação teórica foi baseada no panorama geral do gênero *Leishmania*, em especial a Leishmaniose visceral, e dos marcadores moleculares utilizados no estudo da variabilidade genética intra e interespecífica.

A Leishmaniose é uma doença de abrangência global que afeta inúmeros países sendo a maioria tropicais e subtropicais. Por afetar países com populações de pequena visibilidade a doença acaba sendo negligenciada pelas autoridades (NEVES, 2011). Adicionalmente, o fato de o mundo estar passando por mudanças ambientais pelo desflorestamento, alterações climáticas que afetam a distribuição dos vetores e a expansão da população humana em áreas endêmicas, tornou-se imprescindível o estudo da variabilidade genética do gênero *Leishmania* com o intuito de elucidar a capacidade de adaptação que influencia na dispersão do parasito no ambiente e sua relação com os hospedeiros (TORTORA, 2012). Os resultados dessa investigação poderiam auxiliar no planejamento de políticas públicas para o controle e combate do protozoário, e assim, reduzir o número de casos (SILVA; ALVES, 2014).

A compreensão da variabilidade genética por meio de técnicas moleculares é importante para entender qual a forma de reprodução entre os indivíduos da espécie, além disso a compreensão é importante para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos, elaboração de novos métodos diagnósticos já que os atuais nem sempre apresentam a especificidade e a sensibilidade desejáveis, confecção de novas abordagens terapêuticas ou aprimoramento das abordagens já existentes e desenvolvimento de políticas públicas por autoridades voltadas às populações humanas mais afetadas por diferentes cepas do mesmo patógeno.

### 2.1 Epidemiologia

A leishmanioses são doenças de distribuição global, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) a leishmaniose visceral é endêmica em mais de 80 países, na maioria em países de regiões tropicais e subtropicais, no qual Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil concentram cerca de 90% dos casos de ocorrência global.

Estima-se que há aproximadamente 12 milhões de pessoas habitando regiões de risco para leishmanioses, sendo por volta de 50.000 novos casos por ano e devido a sua ocorrência em países com populações majoritariamente de baixa renda, a doença é considerada negligenciada pelas autoridades (OMS, 2015).

No Brasil, a doença é causada pela espécie *Leishmania (L.) chagasi* que está presente nas cinco regiões do país, ocorrendo principalmente nas regiões norte e nordeste. Com o advento da urbanização, a doença que estava mais restrita às zonas rurais, apresentou uma migração para zonas urbanas como São Luís (MA), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Natal (RN) e, mais recentemente, Belo Horizonte (MG), Palmas (TO), Campo Grande (MT), Araçatuba (SP) e Corumbá (MS), segundo o SVS-MS-Brasil (SINAN/SVS/MS, 2021). No ano de 2003 o percentual de casos no Nordeste foi de 58% em relação ao total de casos diagnosticados no país, enquanto na região Norte foi 15%, no Centro-oeste de 7% e no Sudeste de 19%. As explicações mais aceitas para essa migração das zonas rurais para urbanas se relacionam com a mudança de fluxo migratório, desmatamento e alterações nos ecossistemas causadas pelo ser humano, inserção de hospedeiros infectados onde já havia a presença do vetor, além de fatores sociais como desnutrição, pobreza, falta de saneamento básico e higiene da população (DESJEUX, 2004). Em 2021 foram detectados 1.683 casos de leishmaniose visceral no Brasil, sendo 265 casos no Norte, 775 casos no Nordeste, 233 casos na região Sudeste, 6 casos no Sul do país e 83 casos no Centro-oeste (SINAN/SVS/MS, 2021) (Figura 1).

Figura 1: Casos de leishmaniose visceral por UF no Brasil em 2021.

Fonte: SINAN/SVS/MS, 2021

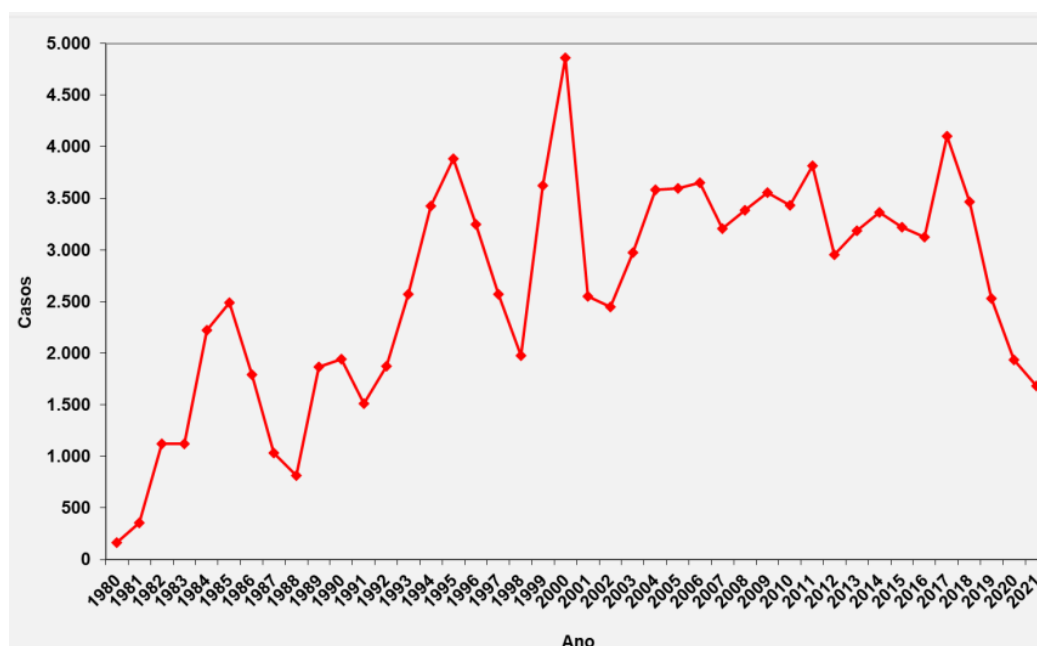


Figura 2: Casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2021.

Fonte: SINAN/SVS/MS, 2021

No início da década de 90, 7.616 casos de leishmaniose foram detectados no estado de Pernambuco, desses, 1.310 (17,2%) eram da forma visceral da doença, nesse mesmo período, 119 cidades do estado detectaram casos da doença, sendo a maioria em cidades localizadas no sertão pernambucano (SILVA DF, VASCONCELOS SD, 2003). A leishmaniose visceral encontra-se distribuída por todo território pernambucano, registrando casos em todas as regiões do estado, especialmente em um *cluster* no agreste do estado formado pelos municípios de Altinho, Caruaru, Riacho das Almas, São Caetano e Surubim, concentrando a maior parte dos casos. Nas outras regiões do estado, se destacam os municípios de Salgueiro (Sertão), Petrolina (Sertão do São Francisco), Itamaracá (Região Metropolitana de Recife) e Goiana (Zona da Mata) (DANTAS-TORRES F, BRANDÃO-FILHO SP, 2005). Em 2020, para a leishmaniose visceral, o Estado registrou 106 casos novos, com a incidência de 1,1 caso por 100 mil habitantes e no ano de 2021, foram registrados 67 casos de leishmaniose visceral (SINAN/SVS/MS, 2021).

## 2.2 História da Leishmaniose

A Leishmaniose é um grupo de doenças infecciosas que são retratadas desde a antiguidade, com os primeiros registros sendo na forma de lesões da Leishmaniose cutânea por volta de 2.500 AC em múmias egípcias e cristãs da Núbia, registros esses que se estenderam ao longo dos anos em achados de múmias em diversas partes do mundo (KRZEMINSKI; KRZEMINSKA, 2003). Até que em 1756, Russell, durante uma viagem a cidade de Aleppo, na Índia fez a primeira descrição detalhada da doença, tendo percebido que além de homem e cães, os gatos eram acometidos pela mesma doença (HERRER; CHRISTENSEN, 2005).

Apesar dos aspectos clínicos da doença terem sido descritos detalhadamente, a dúvida sobre o que ou quem era responsável pela transmissão da doença perpassou anos (YOUNG; DUNCAN, 1994). Em 1764, um médico e cosmógrafo do Vice-Reinado do Peru chamado Comes Bueno, relatou que indígenas peruanos na região da Amazônia alegavam que a *uta*, atualmente leishmaniose tegumentar americana, era transmitida por pequenos insetos que também eram chamados de *uta*, sendo por meio de um médico peruano, Lo Villar, em 1859, que

analisou os registros das primeiras descrições da doença e a transmissão relatada pelos indígenas levantando a hipótese de que os flebotomíneos eram os responsáveis pela transmissão da doença (LAINSON; SHAW, 2005).

Mesmo havendo descoberto o agente transmissor, ainda havia uma incógnita toda vez que surgia algum paciente com sintomas parecidos, qual seria o real causador da enfermidade? O médico escocês Sir William Cunningham foi um dos primeiros a observar o parasita do gênero *Leishmania*, em 1885 na Índia, onde os identificou em esfregaços de medula óssea de um paciente com uma doença conhecida como "febre dum-dum", que é agora reconhecida como uma forma grave de leishmaniose visceral (PESSOA, 1958; ALBUQUERQUE *et al.*, 1996), e que somente em 1898, na Rússia, o pesquisador Peter Fokitsch Borovsky fez as primeiras observações de que se tratava de um protozoário o verdadeiro responsável pelas enfermidades denominadas de botão d'Aleppo, botão de Deli ou botão do Oriente publicando em uma revista militar russa a descrição detalhada do parasita (ALLISON, 1993). Três anos depois, 1901, o médico inglês William Leishman identificou os "tripanossomas" em esfregaços sanguíneos oriundos do baço de um paciente indiano falecido de "febre dum-dum", evidenciando a semelhança das formas amastigotas com as formas do agente etiológico da tripanossomíase, com base nesse achado e em outras pesquisas da época. Em 1903, outro médico inglês, Charles Donovan, confirmou o que ficou conhecido como corpos de Leishman-Donovan nos esfregaços sanguíneos de pacientes indianos acometidos pela Leishmaniose Visceral, porém mesmo, com essas descobertas e pesquisas anteriores, ainda existiam dúvidas referente ao agente etiológico se seria um protozoário (LAINSON, R., SHAW, JJ, 1987).

Ainda no mesmo ano, um médico estadunidense, J. H. Wright, ao analisar amostras de úlceras obtidas por meio de um paciente infantil oriundo da Síria, relacionou as formas encontradas nas amostras e o diagnóstico do botão do Oriente e nomeou o agente etiológico causador de *Welcozoma tropicum*, atualmente conhecida como *Leishmania tropica* Wright (ALLISON, 1993). A pergunta realizada na época se o agente causador seria um protozoário foi solucionada meses depois por Ronald Ross, um importante médico inglês, que ao analisar as amostras de Donovan confirmou que se tratava de um protozoário e criou um novo gênero, o gênero *Leishmania* (Ross, 1903), em homenagem ao William Leishman (KERN; SARA, 2000).

No ano seguinte, 1904, Rogers a partir do primeiro cultivo *in vitro* bem-sucedido das formas flageladas, constatou que o parasita de Leishman e Donovan reproduzia-se no sangue humano na forma de amastigotas intracelulares ovais, e dentro da sua linha evolutiva, se diferenciavam em promastigotas flagelados (LAINSON; SHAW, 1984). Com todas essas descobertas e com o avanço dos estudos, diversos pesquisadores e médicos constataram que o Calazar não seria endêmico apenas na Índia, pois já haviam relatos de casos semelhantes descritos na China e Tunísia (ALLISON, 1993).

Entre os anos de 1908 a 1910, Nicolle, ao estudar o calazar infantil, afirmou que o mesmo poderia ser inoculado em cachorros e algumas espécies de macacos, descobrindo que algumas raças de cães já possuíam um tipo de Leishmaniose que seria muito próxima a Leishmaniose humana, supondo que a doença poderia ser transmitida para crianças através de mordidas de pulgas infectadas oriundas de cães e macacos infectados (ALVAR *et al*, 2012). Ao fazer experimentos envolvendo macacos e cães e analisar os resultados obtidos a partir dos parasitas indianos e tunisianos, observou a ocorrência de duas espécies de Leishmaniose, porém com a inoculação do calazar indiano não obteve o resultado esperado, mas observou-se o desaparecimento de barreiras que acreditava existir entre as duas espécies (ALLISON, 1993).

Os primeiros casos da Leishmaniose nas américas foram relatados por Carini e Paranhos, no Sul do Brasil, em 1909. Em 1911 Gaspar de Oliveira Vianna nomeou o agente causador da Leishmaniose cutânea de *Leishmania braziliensis* (SERGENT *et al.*, 1921; ARAGÃO, 1922). Os primeiros registros da Leishmaniose visceral no Brasil foram realizados pelo médico sanitaria Carlos Chagas, que viajando através do Vale do Rio Amazonas, entre 1911 e 1912, suspeitou da existência da doença ao analisar diversos pacientes com esplenomegalia de causas idiopáticas (ALBUQUERQUE; MARLI *et al*, 1996). Em 1913, a Leishmaniose visceral apresentou sua primeira descrição em seres humanos nas Américas, quando o médico Migone observou a presença do parasita ao realizar uma autópsia em um munícipe de Boa Esperança, atual estado do Mato Grosso do Sul. (CHAGAS *et al*, 1937; CUNHA; CHAGAS, 1937). Após o falecimento de Carlos Chagas em 1934, demorou alguns anos para as pesquisas serem retomadas, até que em 1936, Evandro Chagas, primogênito de Carlos Chagas fez, o primeiro diagnóstico *in vivo* de um paciente infectado, um jovem de 16 anos morador de Aracaju, Sergipe, juntamente

com outros pesquisadores, relacionaram a transmissão da doença com a picada do vetor flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, nomeando assim o parasita de *Leishmania chagasi* (TORTORA, 2012).

Em 1939, após uma epidemia gravíssima de malária no nordeste, devido a importação de um vetor africano, a Comissão Encarregada do Estudo da Leishmaniose Visceral Americana, chefiada por Evandro Chagas, foi transformada em Serviço de Estudos de Grandes Endemias (SEGE), tendo como objetivo investigar todas as endemias rurais em todas as regiões do país, tirando o foco do estudo na leishmaniose (BARRETO, 2012).

Por apresentar poucos casos *in vivo* na época, tinha-se uma concepção de que a doença tinha caráter endêmico, pois em quatro décadas, apenas 34 casos de leishmaniose visceral haviam sido relatados no Brasil, sendo a maior parte no Pará e na Bahia (DEANE; DEANE., 1955). Porém em 1953, deflagrou-se uma epidemia no norte do Ceará, sendo a primeira documentada em toda a América, no qual entre 1953 à 1957, o número total de casos registrados no Brasil saltou de 34 para 1.832, 81,38% de casos apenas no Ceará, representando 2.179 casos em toda a América, sendo 2.145 casos apenas no nordeste brasileiro (98%) (DEANE., 1958).

### 2.3 Classificação do parasita

O protozoário causador da leishmaniose é classificado taxonomicamente em Reino: Protista; Subreino: Protozoa; Filo: Sarcomastigophora; Subfilo: Mastigophora; Classe: Zoomastigophora; Ordem: Kinetoplastida; Subordem: Trypanosomatina, Família: Trypanosomatidae, Gênero: *Leishmania*., além disso o gênero *Leishmania* pode ser classificado em dois subgêneros, *L. Viannia* e *L. Leishmania* (NEVES, 2001). Cerca de 53 espécies já foram descritas dentro do gênero, das quais 31 têm a capacidade de infectar mamíferos e 20 já foram classificadas como parasitas patógenos humanos (AKHOUNDI, MOHAMMAD *et al.*, 2016)

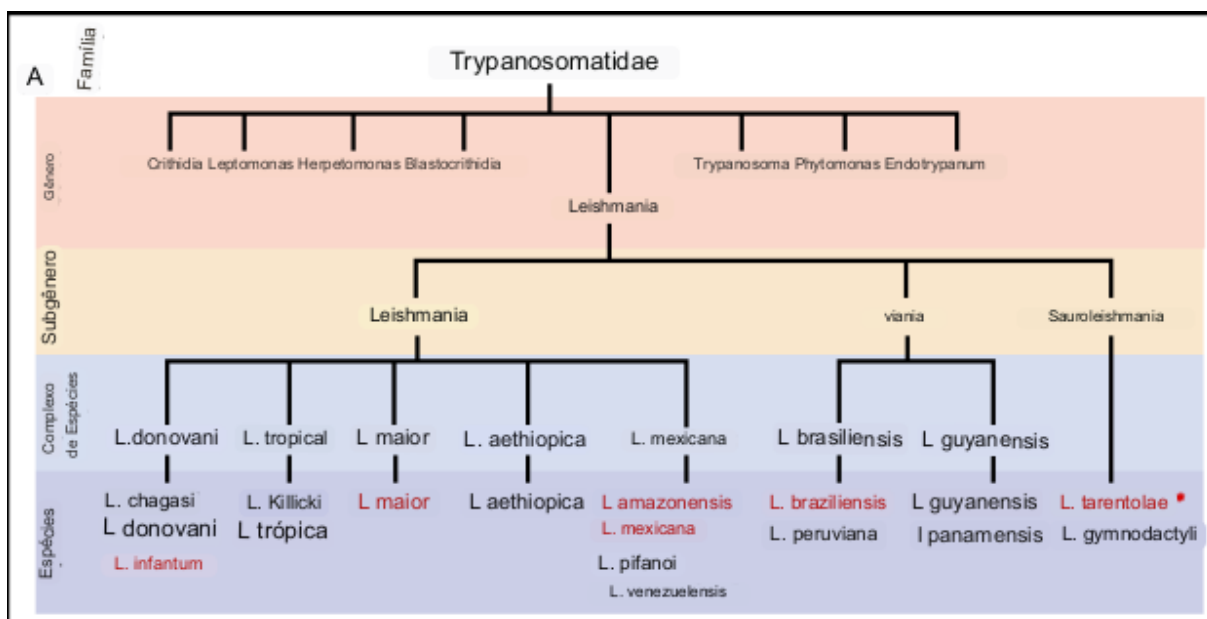


Figura 3: Classificação da *Leishmania* em gênero, subgênero, complexos e espécies

Fonte: REAL *et al.*, 2013

A leishmaniose visceral é causada por parasitas que pertencem ao complexo *Leishmania Donovan* (Laveran e Mesnil, 1903; Ross, 1903), complexo composto por duas espécies de *Leishmania*, sendo elas, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (também conhecida como *Leishmania chagasi*) (BARRETO, 2012; NEVES, 2016). A *Leishmania (L.) infantum* é uma zoonose que atinge principalmente crianças, enquanto a *Leishmania (L.) donovani* é uma antroponose que infecta principalmente adultos. Com isso os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença vão ser diferentes por se tratar de parasitas de diferentes espécies (NEVES, 2011).

## 2.4 Morfologia

Durante o ciclo de vida do protozoário, duas principais formas evolutivas distintas vão se apresentar, a forma promastigota, sendo essa flagelada, móvel, encontrada no intestino médio do inseto vetor e a forma amastigota que não possui flagelo livre e consequentemente, não possui movimento e se localiza no

interior das células do hospedeiro vertebrado (GONTIJO, 2003; SUNTER; GULL, 2017).

A forma amastigota é intracelular, possui um formato oval, mede entre de 1 a 3 $\mu$ m, parasita o sistema mononuclear do hospedeiro vertebrado. Esta célula possui um único núcleo que não é central e um blefaroplasto que possui um aspecto que se assemelha a de ponto onde dele se origina e fica conectado o axonema que se estende até a extremidade do parasita (DEDET, 2002). Seu único corpo parabasal é localizado lateralmente ao blefaroplasto, não sendo visível na microscopia ótica. Sua única mitocôndria, na extremidade posterior do corpo é arredondada e contém um cinetoplasto, que é uma organela que contém DNA mitocondrial composta por filamentos de kDNA que se organiza em cadeias circulares (ZEIBIG, 2014) (Figura 2).

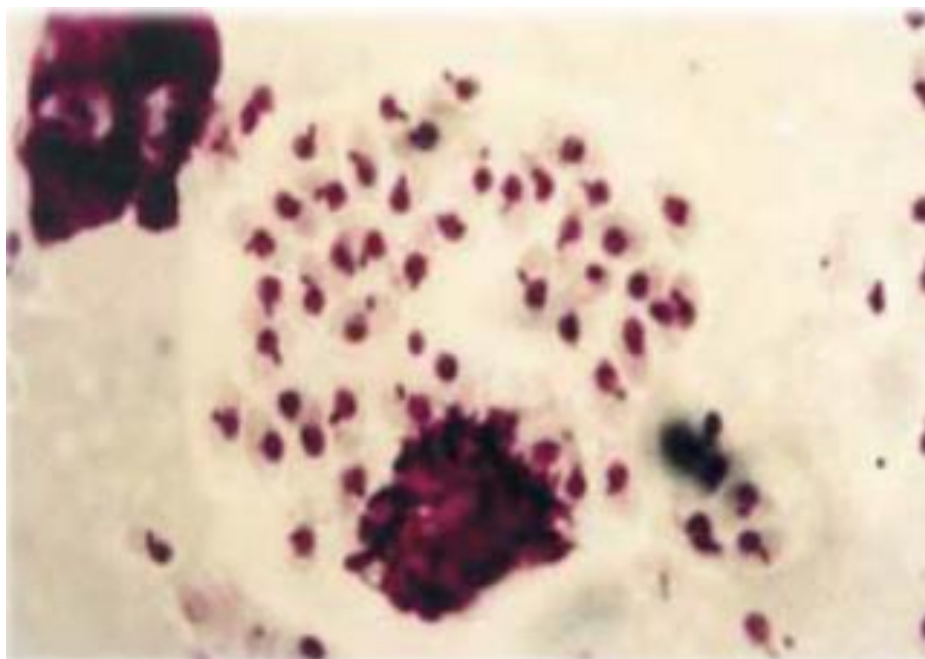


Figura 4: Formas amastigotas da Leishmania.

Fonte: BRASIL, 2017.

A forma promastigota detém um flagelo livre na região anterior que fornece mobilidade ao parasita, além disso, possui um formato fusiforme e alongado sendo encontrada no interior do trato digestivo do inseto vetor. Seu tamanho varia de 15 a 20 $\mu$ m com um cinetoplasto anterior ao núcleo (NEVES, 2011). Durante o processo de diferenciação, vai apresentar duas formas: promastigota procíclica e promastigota metacíclica (TORTORA, 2012). A forma procíclica não é infecciosa

sendo encontrada no interior do inseto vetor, local no qual irá se multiplicar e diferenciar na forma metacíclica sendo essa forma infecciosa transmitida para o hospedeiro vertebrado (ZEIBIG, 2014) (Figura 3).

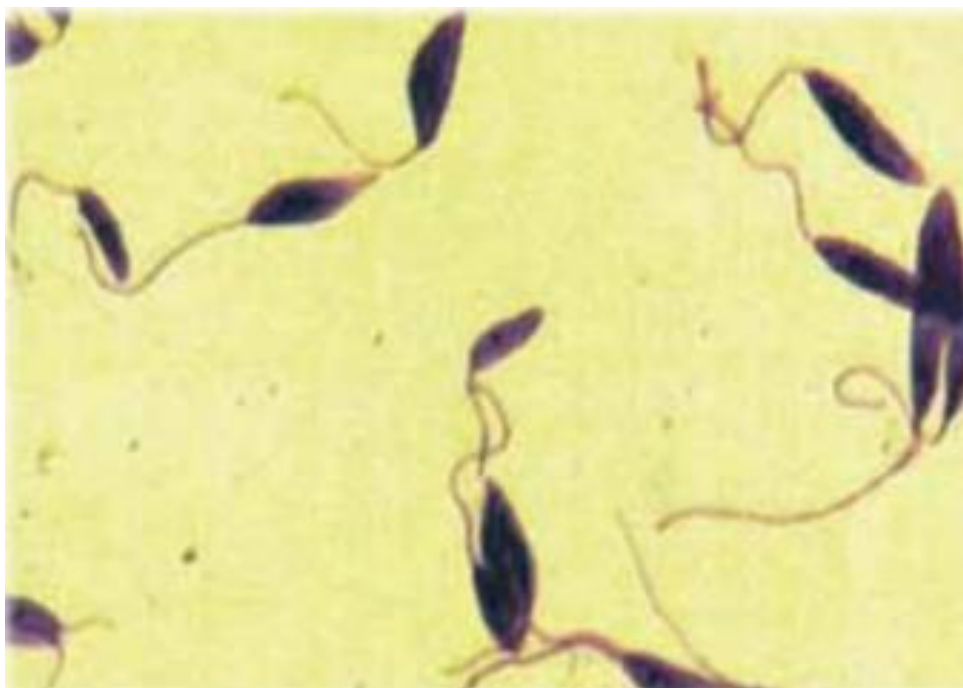


Figura 5: Formas promastigotas da *Leishmania* sp.

Fonte: BRASIL, 2017.

## 2.5 Ciclo biológico

O ciclo biológico da *Leishmania* ocorre por via vetorial sendo classificado como heteróximo devido ao seu desenvolvimento ocorrer em dois hospedeiros distintos, um invertebrado e outro vertebrado (REY, 1991). O ciclo se inicia com o repasto sanguíneo do inseto vetor, mosquitos fêmeas de flebotomíneo. O hospedeiro invertebrado, que durante a alimentação em um indivíduo ou hospedeiro infectado ingere as formas amastigotas, que se desenvolvem e multiplicam-se no interior do intestino do inseto até a forma flagelada denominada promastigota metacíclica, que migra para o aparelho picador-sugador do inseto, denominada probóscide, sendo inoculadas por regurgitação ao fazer o repasto no ser humano e/ou outros hospedeiros vertebrados (BADARÓ, 2002; DEDET; PRATLONG, 2009).

A saliva do inseto tem ação quimiotática para monócitos e imunomoduladores, além de interagir com macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo sua ação nas células efectoras na destruição do parasita (ZEIBIG, 2014). A forma metacíclica adentra nos macrófagos por meio da endocitose e uma vez no interior ocorre uma diferenciação em amastigotas, que por meio de divisão binária se multiplicam no interior da célula, no fagossomo, até levá-la a destruição (GONTIJO, 2003). Após o rompimento da célula ocorre a liberação das amastigotas e o processo se repetirá com a internalização por outros macrófagos, até que a fêmea de um novo flebotomíneo durante o repasto em um indivíduo infectado vai ingerir as formas amastigotas e o ciclo vai recomeçar (NEVES, 2011) (Figura 4).

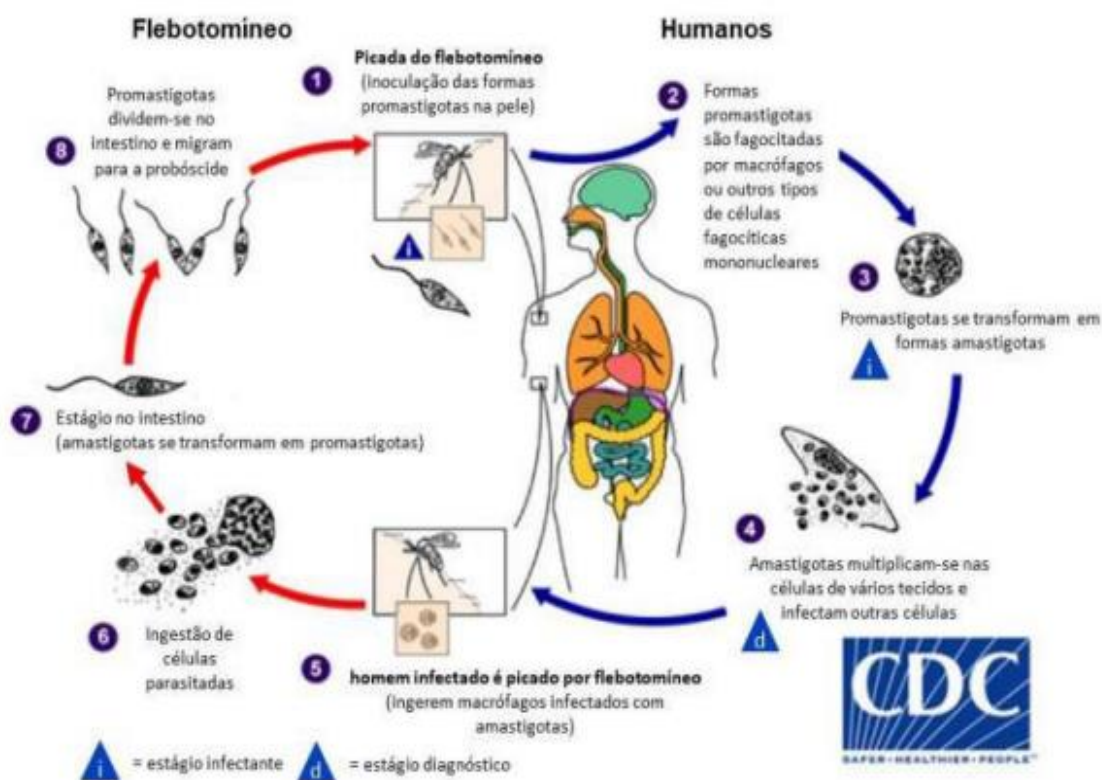


Figura 6: Ciclo biológico da *Leishmania*

Fonte: Centers For Disease Control And Prevention, 2020.

## 2.6 Aspectos clínicos da doença

As alterações clínicas apresentadas na leishmaniose visceral se relacionam ao órgão em que há a proliferação do protozoário, se dividindo em duas fases: a fase assintomática e a fase sintomática, relacionadas diretamente à condição imunológica do paciente (NETTO, 2016).

Na fase assintomática, observa-se um equilíbrio entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, no qual os indivíduos podem desenvolver uma sintomatologia inespecífica, variada com sintomas como febre baixa, diarreia, sudorese e tosse seca, podendo evoluir para a cura espontânea ou para a manutenção do parasita no organismo sem nenhuma evolução clínica do paciente para o resto da vida e o diagnóstico pode ser realizado de maneira acidental ou epidemiológico (PASTORINO *et al.*, 2002). A imunidade inata desempenha um papel importante na contenção inicial da infecção e na ativação da imunidade adaptativa. A interação da *Leishmania* com células do sistema imune inato, especialmente macrófagos, tem papel crítico na evolução da doença (GRETA *et al.*, 2021). Os macrófagos são as principais células-alvo da *Leishmania* no organismo. Quando os parasitas entram em contato com os macrófagos, eles são internalizados em vacúolos parasitóforos e começam a se multiplicar dentro dessas células (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2012). Os macrófagos, por sua vez, ativam mecanismos de defesa, como a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, para combater a infecção. Além disso, as células dendríticas são importantes na ativação da imunidade adaptativa pois essas células apresentam antígenos para os linfócitos T, o que leva à ativação de células T específicas para o parasita. As células T ativadas podem produzir citocinas que estimulam os macrófagos a destruir os parasitas (KUMAR *et al.*, 2010). O sistema imunológico desempenha um papel importante na resposta do hospedeiro à infecção pela *Leishmania* e a produção de citocinas pelas células T desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune (DESJEUX P, 2004). Existem dois tipos principais de resposta imune celular envolvidas na leishmaniose: a resposta Th1 e a resposta Th2 (HOLZMULLER *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006). A resposta Th1 é considerada protetora contra a leishmaniose, é mediada por células T helper do tipo 1 e é caracterizada pela produção de citocinas como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), essas citocinas ativam macrófagos e outros tipos de células do sistema imunológico para eliminar o parasita. Por outro

lado, a resposta Th2 é considerada não protetora e pode resultar em uma infecção crônica, pois a resposta Th2 é mediada por células T helper do tipo 2 e é caracterizada pela produção de citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10). Essas citocinas podem inibir a atividade dos macrófagos e diminuir a capacidade do sistema imunológico em eliminar o parasita (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; REIS *et al.*, 2006). O período inicial da doença corresponde a fase aguda observando sintomas como febre alta, hepatoesplenomegalia discreta e palidez das mucosas. Pacientes na fase assintomática vão apresentar a resposta imunológica do tipo Th1 sendo mais eficiente em combater o protozoário, porém a mudança da fase assintomática para a fase sintomática ocorre por uma quebra da barreira funcional dos linfonodos, acompanhada juntamente com o aumento da prostaglandina E e da diminuição da produção de IL-10, causados principalmente por um quadro de desnutrição e imunossupressão causada por outras doenças, como infecção pelo HIV, tuberculose, doenças autoimunes, devido a infecções ou utilização de fármacos pós-transplantes para evitar rejeição do órgão transplantado (NETTO, 2016; DA-CRUZ *et al.*, 2002).

A fase sintomática vai ser caracterizada por uma resposta imunológica do tipo Th2, que é mais permissiva a proliferação e disseminação do parasita, apresentando uma evolução do quadro geral com febre irregular, emagrecimento contínuo, desnutrição proteico-calórica, hepatoesplenomegalia, edema generalizado, dispneia, dores musculares, caquexia, epistaxes e retardo na puberdade, além de causar um quadro imunossupressor tornando o hospedeiro suscetível a infecções bacterianas que podem conduzir a óbito (NEVES, 2011; ROGERS *et al.*, 2002). Os principais sintomas vão estar relacionados com os órgãos parasitados, podendo acarretar alterações esplênicas, principal sintoma da LV, que é propiciado pela hipertrofia e hiperplasia das células do sistema fagocitário mononuclear do baço; alterações hepáticas com o parasitismo das células de Kupffer, que são densamente parasitadas levando à dilatação dos vasos sinusóides hepáticos, hipertensão portal e ascite; alterações no tecido hemocitopoiético, devido a medula óssea estar densamente parasitada, causando um quadro de pancitopenia, anemia, trombocitopenia, etc.; alterações renais com a invasão dos rins provocando glomerulonefrite e a Albuminúria (50% dos pacientes); alterações pulmonares devido a infecções bacterianas secundárias que acontecem pelo quadro de imunossupressão; hipertrofia dos linfonodos; quadros de diarreia oriundos de edemas

e alongamentos das vilosidades; descamação e queda de cabelo causadas por alterações cutâneas (ZEIBIG, 2014). O tempo de incubação varia de 3 a 8 meses, após esse período pode iniciar a sintomatologia ou o indivíduo ficar assintomático para o resto da vida (NETTO, 2016; GARCIA *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2005).

Os anticorpos contra a *Leishmania* são produzidos pelos linfócitos B, que são ativados através da apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos, onde podem se ligar aos parasitas e promover sua eliminação através de diferentes mecanismos, como a opsonização, que facilita a fagocitose pelos macrófagos, e a ativação do sistema complemento, que leva à lise dos parasitas (AMBROSIO *et al.*, 2021). Também podem estar envolvidos na patogênese da doença, pois em alguns casos os anticorpos podem formar complexos com antígenos da *Leishmania* e depositá-los em tecidos, como rins e fígado, onde podem causar inflamação e danos aos tecidos, além disso, os anticorpos podem desencadear respostas imunes excessivas (ANDRADE *et al.*, 2020). O equilíbrio entre os efeitos protetores e patogênicos dos anticorpos depende da resposta imune do hospedeiro e das características do parasita (NETTO, 2016).

## 2.7 Diagnóstico

O diagnóstico vai ser baseado em parâmetros epidemiológicos, no exacerbamento da produção de anticorpos, em achados clínicos e laboratoriais, porém o diagnóstico só poderá ser firmado por meio do encontro do parasita no tecido infectado (PASTORINO, 2002). No diagnóstico clínico, avalia-se os sinais e sintomas do paciente correlacionando com o histórico de residência em local endêmico e se necessário realiza-se o diagnóstico diferencial para esquistossomose (NETTO, 2016; BADARÓ, 2002).

O padrão-ouro no diagnóstico laboratorial vai ser pela observação direta das formas amastigotas no material biológico do paciente, obtidos preferencialmente através de aspirado de medula óssea que além de ser o procedimento mais simples e mais seguro, permite também uma melhor visualização do parasita mesmo apresentando uma sensibilidade que varia de 76-85% (GONTIJO;

CARVALHO, 2003). Outro método é a punção aspirativa esplênica, que apresenta maior sensibilidade, variando de 90-95%, porém apresenta maiores riscos como ruptura do baço e hemorragias fatais (SUNDAR, 2002).

Outra forma de diagnóstico é por meio de testes sorológicos como, a imunofluorescência indireta (IFI), teste mais utilizado no SUS; Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a reação de Fixação do Complemento, que detectam a presença de anticorpos contra a *Leishmania* na amostra de sangue do paciente (PASTORINO, 2002). Apesar do diagnóstico sorológico ser preferível devido a resposta imune humoral acentuada no paciente e os testes apresentarem uma sensibilidade e especificidade considerada altas, eles podem apresentar algumas desvantagens como, resultados falso-positivos ou falso-negativos necessidade de tempo, equipamentos especializados, laboratoristas treinados, interpretação diferenciada e necessidade de repetição após 30 dias (ASSIS, 2008).

No diagnóstico molecular várias técnicas são empregadas para identificar o gênero e a espécie de *Leishmania* em amostras clínicas, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR), e Nested-PCR, a PCR em tempo real, a PCR multiplex e a PCR-RFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição) (MARQUES, 2007; DISCH, 2003). O alvo molecular mais comum usado para a detecção é o gene que codifica o RNA ribossômico (rRNA), que é altamente conservado na maioria das espécies de *Leishmania* (KAR, 1995). A PCR convencional é uma técnica que amplifica um segmento de DNA específico usando iniciadores que se ligam a sequências conhecidas do alvo molecular, possui uma sensibilidade maior que 90% e especificidade de 100% (DISCH, 2003). A Nested-PCR envolve duas rodadas de amplificação, aumentando a sensibilidade da técnica. A PCR em tempo real é uma variação da PCR convencional, que permite a detecção, em tempo real, da amplificação do DNA do parasita (BENSOUSSAN *et al.*, 2006). A PCR multiplex é uma técnica que permite a detecção simultânea de vários alvos moleculares em uma única reação de PCR (BRITO *et al.*, 2000). A PCR-RFLP é uma técnica que utiliza a digestão enzimática do DNA amplificado para criar um padrão de fragmentos de restrição que pode ser usado para identificar e diferenciar espécies de *Leishmania* (MARQUES, 2007). A análise do padrão de fragmentos de restrição pode ser realizada por eletroforese em gel ou sequenciamento. Em resumo, a detecção molecular de *Leishmania* envolve a multiplicação e detecção de um alvo molecular específico em

amostras clínicas. Existem várias técnicas disponíveis, cada uma com suas vantagens e desvantagens. A escolha da técnica depende do objetivo do diagnóstico e da disponibilidade de recursos técnicos e humanos (SUNDAR, 2002).

## 2.8 Tratamento

De acordo com o Ministério da Saúde, o tratamento para a leishmaniose visceral é limitado e baseia-se na destruição do parasita dentro do hospedeiro, para isso utiliza-se drogas chamadas de antimoniais pentavalentes (Sb+5), sendo elas: o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime) e estibogluconato de sódio (Pentostan), em que apesar de serem drogas efetivas no tratamento, a alta toxicidade, efeitos colaterais e o longo tempo de tratamento aumentam os riscos de complicação para o paciente (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; COLER; REED, 2005). O principal efeito adverso do Glucantime ocorre no sistema cardiovascular no qual dependendo da dose e do tempo de utilização pode acarretar distúrbios de repolarização, sendo necessário o acompanhamento do paciente com a finalidade de detectar arritmias cardíacas (GONTIJO, 2004; YARDLEY *et al.*, 2006).

No Brasil o principal fármaco distribuído é o Glucantime sendo distribuído gratuitamente na rede pública de saúde. A dosagem recomendada pelo Ministério da Saúde é de 20mg de Sb+5/kg/dia por via endovenosa ou intramuscular, durante 20 dias até, no máximo 40 dias (NETTO, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2006)

Outro tratamento baseia-se na utilização do fármaco Anfotericina B, considerado o tratamento de escolha para casos graves ou resistentes, além de poder ser utilizado em pacientes imunocompetentes, no entanto, nesses pacientes, como aqueles com HIV, transplantados ou em tratamento imunossupressor, a eficácia e a segurança do fármaco podem ser afetadas, pois a imunossupressão pode afetar a resposta ao tratamento, tornando o fármaco menos eficaz e aumentando o risco de efeitos colaterais, sendo necessário monitoramento de um médico especialista e a possibilidade de ajuste da dose ou considerar outras opções de tratamento, dependendo da gravidade da infecção e da condição imunológica do paciente. E

embora seja de via oral, o que representa uma maior adesão e possuir uma boa resposta ao tratamento, o alto custo do fármaco e sua distribuição dependente da situação socioeconômica de cada país, dificultam assim a utilização em larga escala da droga (MARTY, 2002; MONGE-MAILLO *et al.*, 2021).

## 2.9 Genética

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam uma genética complexa, variando entre as diferentes espécies. O genoma do parasita é composto por milhares de genes organizados em clusters em seus cromossomos (ROGERS *et al.*, 2011). A comparação dos genomas de diferentes espécies de *Leishmania* revelou que há uma grande semelhança entre eles, com poucos genes sendo específicos de cada espécie e alguns desses genes podem estar associados à virulência e ao tropismo do parasita, fatores importantes para o desenvolvimento das diferentes formas de leishmanioses (PEACOCK *et al.*, 2007).

O genoma é composto por cerca de 35 a 40 milhões de pares de bases, contendo aproximadamente 8000 a 9000 genes e a organização cromossômica da *Leishmania* é única, com cada cromossomo contendo vários genes, que são organizados em clusters (BANULS *et al.*, 2007) (Tabela1). O parasita é capaz de sofrer rearranjos cromossômicos, como amplificação e deleção de genes, recombinação homóloga e não homóloga, além de ter um mecanismo de reparo de DNA bastante eficiente. O genoma é composto por duas partes distintas: o DNA nuclear e o DNA mitocondrial, também conhecido como kDNA. O kDNA está localizado na única mitocôndria da *Leishmania* e é constituído por maxicírculos e minicírculos que se unem para formar uma rede de DNA (ROGERS *et al.*, 2011). Essa rede representa cerca de 10-15% do DNA total. Os maxicírculos contêm genes que codificam RNAs ribossomais e transportadores, enquanto os minicírculos contêm RNAs guias. A organização do kDNA é única e contribui para a plasticidade genômica da *Leishmania*, o que lhe permite adaptar-se rapidamente a diferentes ambientes (MORRIS *et al.*, 2001).

O gênero é composto por várias espécies que apresentam arranjos genômicos semelhantes, com cerca de 34 a 36 pares de cromossomos numerados de acordo com o tamanho, que varia de aproximadamente 250 kilobases a 4

megabases (BANULS *et al.*, 2007). As espécies do Velho Mundo, como *L. donovani* (DOWNING *et al.*, 2011) e *L. major* (IVENS *et al.*, 2005), possuem 36 cromossomos, enquanto as espécies do Novo Mundo, como *L. mexicana* (ROGERS *et al.*, 2011) e *L. amazonenses* (PEACOCK *et al.*, 2007) possuem apenas 34 cromossomos, exceto as espécies do complexo *L. braziliensis* (PEACOCK *et al.*, 2007), que possuem 35 cromossomos. Alguns genes presentes em *L. infantum* (PEACOCK *et al.*, 2007) estão ausentes ou presentes apenas como pseudogenes em *L. major* e *L. braziliensis*, e cerca de 19 a 25 desses genes são codificadores de proteínas hipotéticas sem função conhecida, embora algumas funções possam ser previstas por similaridades de sequência (IMAMURA *et al.*, 2016). Essas informações são importantes para entender a diversidade genética da *Leishmania* e para o desenvolvimento de estratégias de tratamento mais eficazes contra a leishmaniose (SMITH *et al.*, 2007).

|                                  | <i>L. (L.)<br/>major</i> | <i>L. (V.)<br/>braziliensis</i> | <i>L. (V.)<br/>infantum</i> | <i>L. (L.)<br/>mexicana</i> | <i>L. (V.)<br/>donovani</i> | <i>L. (S.)<br/>tarentolae</i> | <i>L. (L.)<br/>amazonensis</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <b>Contigs</b>                   | 36                       | 1041                            | 37                          | 35                          | 2154                        | N/A                           | 3199                           |
| <b>Genoma tamanho (Mb)</b>       | 32,8                     | 33,7                            | 32,1                        | 32,1                        | 32,4                        | 30,4                          | 29,6                           |
| <b>Cromossomos</b>               | 36                       | 35                              | 36                          | 34                          | 36                          | 36                            | 34                             |
| <b>Número de genes preditos</b>  | 8298                     | 8153                            | 8216                        | 8007                        | 8252                        | 8201                          | 8100                           |
| <b>Gene densidade (genes/Mb)</b> | 260                      | 228                             | 252                         | 256                         | 254                         | 270                           | 273                            |
| <b>C+G conteúdo (%)</b>          | 59,3                     | 57,8                            | 59,3                        | 60,5                        | >60                         | 57,2                          | 58,5                           |
| <b>Referências</b>               | Ivens et al. (2005)      | Peacock et al. (2007)           | Peacock et al. (2007)       | Rogers et al. (2011)        | Downing et al. (2011)       | Raymond et al. (2012)         | Real et al. (2013)             |

Tabela 1: Principais genomas publicados de espécies da *Leishmania*.

Fonte: OLIVEIRA, 2015

Existem vários marcadores de variabilidade genética na *Leishmania* que são utilizados para caracterizar diferentes cepas e linhagens da parasita (SCHWENKENBECHER *et al.*, 2004). Alguns dos principais marcadores incluem:

- Marcadores moleculares baseados em sequência de DNA: incluem o sequenciamento de genes específicos ou regiões genômicas como ITS (espaçador transcrito interno), hsp70 (proteína de choque térmico), gGAPDH

(gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e outros, que permitem a comparação de sequências de diferentes cepas (SCHONIAN, G. *et al.*, 2008);

- Análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP): esta técnica envolve a digestão do DNA com enzimas de restrição e a análise dos fragmentos gerados por eletroforese, permitindo a distinção de diferentes padrões de banda (MAHNAZ T. *et al.*, 2011);
- Amplificação de fragmentos de DNA aleatórios (RAPD): é uma técnica de PCR que utiliza primers aleatórios para amplificar regiões genômicas variáveis, gerando um padrão de bandas que pode ser utilizado para a caracterização de diferentes cepas (ELFARI *et al.*, 2005);
- Sequenciamento de genoma completo: esta técnica permite a comparação de genomas completos de diferentes cepas, permitindo a identificação de genes específicos, a comparação de sequências e a análise de variações genéticas entre diferentes isolados (ALAM *et al.*, 2014).

Os genes mais utilizados para a identificação são a pequena subunidade ribossomal (SSU rRNA) e a grande subunidade ribossomal (LSU rRNA), que são altamente conservados entre as diferentes espécies de *Leishmania* (HAMARSHEH *et al.*, 2009). Já para o diagnóstico molecular espécie-específico, existem diversos genes alvo que são utilizados, dependendo da espécie de *Leishmania* que se pretende detectar (REAL *et al.*, 2013). Alguns dos genes mais utilizados para o diagnóstico espécie-específico são:

- csp70: gene que codifica uma proteína de choque térmico e que apresenta alta variabilidade entre as diferentes espécies de *Leishmania*. É amplamente utilizado para a identificação de espécies do complexo *L. donovani*, como *L. donovani* (DOWNING *et al.*, 2011), *L. infantum* (PEACOCK *et al.*, 2007) e *L. chagasi* (IVENS *et al.*, 2005);
- cpb: gene que codifica para uma proteína quimiotripsina-cisteína. É amplamente utilizado para a identificação de espécies do complexo *L. braziliensis* como *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (PEACOCK *et al.*, 2007);
- ITS1: região genômica que se localiza entre os genes que codificam o SSU rRNA e o LSU rRNA. É utilizado para a identificação de espécies do subgênero *Viannia* (ROGERS *et al.*, 2011), como *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensi*; (PEACOCK *et al.*, 2007);

- 18S rRNA: gene que codifica para uma subunidade ribossomal. É utilizado para a identificação de espécies do subgênero *Leishmania*, como *L. major* e *L. tropica* (REAL *et al.*, 2013).
- K26: O estudo da pelo gene k26 é realizado por meio da análise de variações na sequência nucleotídica ou na expressão da proteína K26. A proteína K26 é altamente conservada entre as diferentes espécies de *Leishmania*, mas apresenta variações antigênicas entre as diferentes cepas e isolados do parasita (FARASH *et al.*, 2017). A análise da variabilidade genética pode ser realizada usando técnicas como sequenciamento de nucleotídeos, análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e análise de polimorfismos de sequência única (SSP) (MOHEBALI *et al.*, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar, por meio de uma revisão narrativa da literatura, a diversidade genética intraespecífica e interespecífica de *Leishmania* sp por meio do emprego das técnicas de biologia molecular.

#### 3.2 Objetivos específicos

Realizar um levantamento histórico das técnicas moleculares empregadas no estudo da variabilidade genética de espécies de *Leishmania* causadoras da Leishmaniose Visceral;

Descrever sobre clonalidade e sexualidade, analisando o fluxo gênico entre os parasitas entendendo como fatores internos e externos ao protozoário influenciam na pluralidade gênica dentro do gênero;

#### 4. METODOLOGIA

Realizou-se uma revisão do tipo integrativa da literatura. A triagem de artigos publicados em revistas acadêmicas científicas disponíveis online de diversos autores foi realizada nas plataformas de busca PUBMED e Scielo, pois são as duas principais bases de dados de literatura científica do mundo, além de sites governamentais de dois países, Brasil e Estados Unidos, durante o período de dezembro de 2022 a março de 2023. Não foram realizadas restrições em relação ao ano de publicação do estudo.

A pesquisa foi realizada por meio do cruzamento entre Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e Termos Livres (TL) nos idiomas inglês, espanhol e português baseou-se na busca de artigos que possuam como palavras chaves *Visceral Leishmaniasis*, *MLEE*, *RFLP*, *RAPD*, *LSSP-PCR*, *SSR-PCR*, *MLST*, *MLMT*, *Model Evolution Clonal*, *Dispersion of Leishmanina*. aplicando-se os operadores booleanos AND/OR.

Como critério de inclusão, para a revisão foram utilizados artigos que dissertam sobre a evolução e variabilidade genética de *Leishmania spp.* associados à virulência, vetores e resistência em diferentes regiões geográficas e os principais métodos moleculares utilizados para estudar a variabilidade.

O presente trabalho utilizou como critério de exclusão artigos que buscam apenas o diagnóstico, epidemiologia genética, tratamento da doença ou qualquer outro tema que não esteja ligado diretamente a variabilidade genética.

#### 5. RESULTADOS

Com base na revisão bibliográfica realizada, foi possível identificar um número total de 378 artigos, dos quais 266 foram na base de dados PUBMED e 112 no SciELO, sendo detectada a duplicidade em 38 artigos e informações adicionais foram obtidas através da pesquisa em sites governamentais, como do governo do Brasil (Ministério da Saúde) e dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention).

Os artigos foram submetidos a uma prévia leitura e selecionados ou descartados com base nos critérios estabelecidos para inclusão ou exclusão e após esse processo 8 artigos foram escolhidos para a leitura completa e elaboração da revisão bibliográfica descritiva, dispostos no quadro 1.

Após a leitura dos artigos publicados no período de 2000 até 2022, ficou evidente que existem muitos artigos referentes a utilização das técnicas, principalmente a técnica MLEE no estudo da pluralidade gênica dentro do gênero *Leishmania* referente principalmente ao tema da reprodução dos espécimes, epidemiologia e dispersão dos parasitas.

| Autor / Título / Ano                                                                                                                                                                     | País   | Periódico                       | Técnica | Objetivo da técnica                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Resultados principais                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>ROUGERON <i>et al.</i>, 2011</b></p> <p>Multifaceted Population Structure and Reproductive Strategy in <i>Leishmania donovani</i> Complex in One Sudanese Village</p>              | França | PloS Neglected Tropical Disease | MLEE    | É um método de análise que usa modelos evolutivos para inferir a filogenia de diferentes espécies com base em dados moleculares, como sequências de DNA ou proteínas. Ele usa a máxima verossimilhança para estimar os parâmetros do modelo evolutivo e encontrar a árvore filogenética mais provável. | Utilizou a técnica de MLEE para avaliar o impacto da clonalidade no complexo <i>Leishmania donovani</i> e como o tempo afeta a subdivisão genética dessa espécie. Os resultados indicaram que a clonalidade tem um impacto significativo na <i>L. donovani</i> , ao contrário de outras espécies de <i>Leishmania</i> , e que o tempo é um fator importante na subdivisão genética dessa espécie. |
| <p><b>GOUZELOU <i>et al.</i>, 2013</b></p> <p>Genetic diversity and structure in <i>Leishmania infantum</i> populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis</p> | Grécia | Parasites & Vectors             | MLEE    | Esse modelo é baseado em modelos evolutivos que descrevem a evolução dos dados moleculares ao longo do tempo, incluindo a taxa de mutação e a proporção de nucleotídeos ou enzimas.                                                                                                                    | O estudo analisou a estrutura populacional da <i>L. infantum</i> em Chipre e regiões adjacentes, e identificou a predominância de cepas MON-1 e a diversidade genética das cepas croatas. A análise também mostrou a formação de um grupo monofilético de cepas MON-1 em Chipre, possivelmente devido ao isolamento natural da ilha.                                                              |

|                                                                                                                                                                                                                  |             |                                 |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>CUPOLILLO <i>et al.</i>, 2003</b></p> <p>Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil</p> | Brasil      | ASM Journals                    | RFLP | <p>Técnica utilizada na análise de variações no DNA, por meio de enzimas de restrição que cortam o DNA em fragmentos menores que são separados por eletroforese em gel. A análise dos padrões de fragmentos permite identificar diferenças na sequência do DNA entre a amostra.</p>                            | <p>Este estudo demonstrou que a disseminação clonal é importante em algumas regiões geográficas e que a maioria dos genótipos do parasita é específica para determinadas áreas. A alta diversidade genética e a transmissão entre espécies favorecem a capacidade do patógeno infectar múltiplos hospedeiros e produzir variantes genéticas que os tornam mais generalistas.</p>                                |
| <p><b>MKADA–DRISS <i>et al.</i>, 2014</b></p> <p>Screening and Characterization of RAPD Markers in Viscerotropic Leishmania Parasites</p>                                                                        | Reino Unido | PloS Neglected Tropical Disease | RAPD | <p>A técnica RAPD amplifica segmentos de DNA usando primers aleatórios e separa-os por eletroforese em gel para identificar variações genéticas em organismos. Os padrões de bandas resultantes são únicos para cada organismo, permitindo determinar a variabilidade genética dentro ou entre populações.</p> | <p>Os resultados da análise RAPD foram congruentes com estudos anteriores e permitiram a identificação de 19 marcadores de DNA que podem ser usados para desenvolver ensaios baseados em PCR e identificar e caracterizar parasitas viscerotrópicos causadores de leishmaniose visceral. Esses marcadores estão associados a sequências complexas inter e intra-taxonômicas e variações de microssatélites.</p> |

|                                                                                                                                                                                                           |               |                                        |                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>SEGATTO; LEMOS, 2012</b></p> <p>Genetic diversity of <i>Leishmania infantum</i> field populations from Brazil</p>                                                                                   | <p>Brasil</p> | <p>SciELO</p>                          | <p>SSR-PCR<br/>RAPD</p> | <p>A técnica é usada em biologia molecular e utiliza marcadores moleculares chamados SSRs, que são sequências curtas de DNA repetidas em tandem. Com o uso de <i>primers</i> específicos para cada sequência repetida, os marcadores são amplificados por PCR, permitindo a identificação.</p>                                                  | <p>Os pesquisadores revelaram que a maioria dos genótipos de <i>L. braziliensis</i> estava associada a áreas geográficas específicas. Por outro lado, os isolados de <i>L. infantum</i> foram agrupados de acordo com a origem geográfica por meio de análises de RAPD e SSR-PCR, mas seus perfis genéticos foram semelhantes, sugerindo que as populações parasitárias de diferentes regiões do Brasil são homogêneas. A baixa distância genética detectada entre os isolados e as baixas taxas de heterozigosidade nas populações estudadas corroboram essa similaridade.</p> |
| <p><b>ALVARENGA <i>et al.</i>, 2012</b></p> <p>KDNA Genetic Signatures Obtained by LSSP-PCR Analysis of <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>infantum</i> Isolated from the New and the Old World</p> | <p>Brasil</p> | <p>PloS Neglected Tropical Disease</p> | <p>LSSP-PCR</p>         | <p>A técnica é utilizada na análise da diversidade genética de microrganismos. Ela amplifica fragmentos de DNA usando um primer específico para uma sequência única combinado com um primer de baixa especificidade em condições de baixa estrigência, permitindo a amplificação de fragmentos de DNA com pequenas diferenças na sequência.</p> | <p>A análise da região hipervariável do kDNA de <i>L. infantum</i> de parasitos isolados de casos humanos e cães infectados do Brasil e de Portugal demonstrou que as amostras provenientes do mesmo reservatório (humano ou canino) têm correlação genética semelhante. No entanto, a localização geográfica das cepas de <i>L. infantum</i> não teve relação com as assinaturas do kDNA.</p>                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                                                                                |          |                                 |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>ZHANG et al., 2013</b></p> <p>Phylogenetic and evolutionary analysis of Chinese <i>Leishmania</i> isolates based on multilocus sequence typing</p>                                       | Israel   | PloS Neglected Tropical Disease | MLST | <p>É empregada na tipagem molecular de microrganismos. Vários loci de genes são amplificados por PCR e sequenciados, as sequências resultantes são comparadas entre as amostras para determinar sua diversidade genética e relacionamentos evolutivos.</p>                                                             | <p>Foram identificados sete alvos gênicos para cepas de <i>Leishmania</i> na China, e a filogenia e evolução desses isolados foram investigadas. Sugeriu-se que mudanças ambientais resultantes da atividade humana podem ter afetado a estrutura populacional e diversidade filogenética das cepas. Além disso, a análise mostrou que a origem geográfica das cepas era um fator mais importante do que o tipo de apresentação clínica da doença para determinar a relação genética entre as amostras.</p> |
| <p><b>KUHLS et al., 2007</b></p> <p>Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis</p> | Alemanha | ScienceDirect                   | MLMT | <p>A técnica envolve a amplificação de fragmentos de DNA contendo regiões altamente variáveis e repetitivas chamadas microsatélites ou SSRs. Vários loci de microsatélites são amplificados por PCR e as sequências são comparadas para determinar a diversidade genética e as relações evolutivas entre amostras.</p> | <p>A técnica foi aplicada em 91 cepas de <i>Leishmania spp</i> de várias regiões endêmicas de leishmaniose visceral para identificar seis populações principais geneticamente distintas, incluindo subestruturas relacionadas ao local e tempo de isolamento das cepas. As populações parecem ser predominantemente clonais, com maior diversidade alélica na região do Mediterrâneo e menor na Índia.</p>                                                                                                  |

Quadro 1: Artigos selecionados para o estudo da variabilidade genética em *Leishmania spp*.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Clonalidade versus sexualidade

Clonalidade é um termo empregado para descrever a reprodução assexuada, na qual um organismo ou uma população de organismos produz descendentes geneticamente idênticos ao progenitor, não ocorrendo uma mistura de material genético entre os indivíduos e a herança genética é transmitida de forma direta e sem variações (BUSSOTTI *et al.*, 2018). A clonalidade é importante do ponto de vista evolutivo, pois apresenta eficiência reprodutiva, visto que não há necessidade de um parceiro para reprodução, preserva de características vantajosas e oferece estabilidade genética (OZIAS-AKINS *et al.*, 2020). No entanto, ela também pode tornar as populações mais vulneráveis a doenças e outras ameaças, tendo em vista que a falta de variação genética pode limitar a capacidade de adaptação, além disso, a clonalidade pode resultar em problemas genéticos, como a acumulação de mutações deletérias e a redução da heterogeneidade genética (BACHTROG, 2003).

Já a sexualidade é um processo de reprodução em que os organismos se reproduzem por meio da combinação de células reprodutivas, como óvulos e espermatozoides, que contêm metade da informação genética de cada um dos genitores. Isso resulta em uma prole com uma combinação única de material genético, aumentando a pluralidade genética dentro de uma população, permitindo que as populações se adaptem melhor a ambientes em mudança, tornando a reprodução sexual um meio importante de evolução e sobrevivência das espécies (PEACOCK *et al.*, 2007; IMAMURA *et al.*, 2016). A reprodução sexual também tem outras vantagens evolutivas, como a probabilidade de combinar características benéficas de diferentes indivíduos, o que pode resultar em uma prole mais forte e adaptável. Além disso, a reprodução sexual pode ajudar a eliminar mutações deletérias e outros danos ao DNA que possam acumular ao longo do tempo (BROOKER, 2015; ROGERS *et al.*, 2011).

A discussão sobre clonalidade e sexualidade sempre levantou controvérsias na *Leishmania spp.*, devido a sua importância para o diagnóstico, tratamento e controle da leishmaniose, como por exemplo, a resistência a drogas que pode surgir rapidamente em populações altamente clonais de tornando o tratamento da doença mais difícil (MAHNAZ T. *et al.*, 2011).

Ao longo dos anos, diferentes teorias foram elaboradas, baseadas em diferentes conjuntos de evidências e muitos pesquisadores acreditam que a reprodução na *Leishmania spp.* pode variar dependendo das espécies, regiões geográficas e condições ambientais (REAL *et al.*, 2013). As principais hipóteses estudadas argumentam que dentro do gênero *Leishmania*, as populações dos parasitas apresentam pouca diversidade genética, ou seja, eles são altamente clonais, sendo compostos por indivíduos geneticamente idênticos ou muito semelhantes, sugerindo que esses parasitas se reproduzem principalmente por divisão celular assexuada de forma longitudinal, produzindo dois clones idênticos, ou de forma transversal, produzindo quatro clones idênticos, com pouca ou nenhuma recombinação genética, além disso, as populações de *Leishmania* podem ser altamente heterogêneas, com diferentes graus de clonalidade em diferentes regiões geográficas (HAMARSHEH *et al.*, 2009). No entanto, há evidências de que a troca de material genético também ocorre entre diferentes linhagens, sugerindo que a reprodução sexual pode ocorrer em algumas circunstâncias, sendo essa reprodução um processo raro e controverso, que envolve a troca de material genético entre dois parasitas através de um processo chamado de conjugação, no qual os parasitas se unem e trocam material genético através de um canal especializado (ELFARI *et al.*, 2005; BUSSOTTI *et al.*, 2018).

Partindo de observações sobre a diversidade genética dentro da mesma espécie, pode-se concluir que os parasitas *Leishmania spp.* circulam em uma pluralidade de transmissores e hospedeiros, formando um combinado de subgrupos distintos (AVISE, 2015). Isso significa que diferentes cenários ecoepidemiológicos podem ter um impacto na variabilidade genética das populações de *Leishmania*, onde em áreas com alta incidência da enfermidade, os clones dos parasitas podem se propagar de maneira mais ou menos eficaz, correspondendo a cenários epidemiológicos mais ou menos complexos (TIBAYRENC; AYALA, 2021). Alguns clones podem ser escolhidos por meio de mecanismos biológicos em hospedeiros e vetores, o que resulta na geração de novas variações genéticas adaptativas (CUPOLILLO *et al.*, 2003). A propagação de subgrupos parasitários heterogêneos na natureza proporciona probabilidade de infecção através de inóculos plurais que estarão sujeitos à pressão imunológica do hospedeiro, levando à seleção de clones (MILES *et al.*, 2009).

Na Leishmaniose, a clonalidade é predominante sendo quase a totalidade e isso ocorre porque a *Leishmania spp.* tem um ciclo de vida complexo, que envolve duas formas de células: as promastigotas, que vivem no trato intestinal dos insetos vetores, e as amastigotas, que vivem dentro dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados (ZEIBIG, 2014). Devido a isso, a reprodução ocorre principalmente de forma assexuada, gerando clones genéticos idênticos, e esse tipo de reprodução é favorecido pela capacidade da *Leishmania* de se reproduzir dentro das células dos hospedeiros, sem a exigência de se misturar com outras células da mesma espécie (KARUNAWEEERA; FERREIRA, 2018).

## **6.2. Testes moleculares utilizados na análise da diversidade genética em Leishmania**

Existem diferentes testes que podem ser empregados para detectar a pluralidade gênica da doença, dependendo do tipo de *Leishmania* envolvida e das técnicas disponíveis (TORTORA, 2012). A utilização destes testes permite a análise da flexibilidade genética dentro de uma comunidade de *Leishmania* e entre diferentes populações. Essa variabilidade pode ser utilizada para determinar a origem geográfica dos grupos de *Leishmania*, analisar a diversidade genética em diferentes regiões, identificar novos espécimes de *Leishmania* e monitorar a disseminação de populações resistentes a medicamentos (ROGERS *et al.*, 2011). Além disso, a análise da pluralidade genética da *Leishmania* pode contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e estratégias de controle da doença, permitindo um melhor entendimento dos mecanismos de virulência, resistência e adaptação da *Leishmania* ao ambiente (BANULS *et al.*, 2007). Os principais testes utilizados são:

## **6.3 Eletroforese de multilocos enzimáticos (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*, MLEE)**

O estudo de variações polimórficas em enzimas é uma das metodologias mais antigas para descrever os isolados biológicos de *Leishmania* em termos de suas características e estudos demonstram que essa técnica revelou

diferentes graus de variação genética entre espécies distintas (ROUGERON *et al.*, 2011), permitindo, assim, a identificação e a descrição de diferentes subpopulações dentro de uma mesma espécie e a diferenciação entre espécies diferentes (MOMEN, 1984; TIBAYRENC; AYALA, 2021).

O princípio da técnica se baseia na extração da proteína total das células de *Leishmania*, seguida pela separação das enzimas em diferentes bandas, utilizando a técnica de eletroforese em gel de amido ou poliacrilamida (ROUGERON *et al.*, 2011). As bandas são coradas com um substrato que reage com a enzima e forma um padrão único de bandas para cada cepa de *Leishmania* e em cada locus enzimático, uma ou mais enzimas são analisadas (CUPOLILLO *et al.*, 2003). As variações nas sequências genéticas dos loci enzimáticos representam as diferentes variantes alélicas da enzima. Cada variante alélica é representada por uma banda diferente no gel de eletroforese (ROGERS *et al.*, 2011). Quando vários loci enzimáticos são analisados juntos, um perfil eletroforético único é gerado para cada cepa de *Leishmania*, o que permite a identificação e o reconhecimento de diferentes alelos e variantes alélicas em diferentes populações do parasita (SREENIVAS *et al.*, 2013).

Para as análises isoenzimáticas dos parasitas, algumas das enzimas mais comumente utilizadas incluem aconitato hidratase, glucose-6-fosfato-desidrogenase, glicose-fosfato-isomerase, isocitrato desidrogenase, malato desidrogenase, enzima málica, nucleotidase, peptidase (L-prolina), aldolase, fosfoglicomutase e 6-fosfoglico-desidrogenase (CUPOLILLO *et al.*, 2000) (Figura 7). Considerando que as diferentes variantes alélicas das enzimas possuem diferentes cargas elétricas, tamanhos e formas influenciam a sua migração no gel de eletroforese (TIBAYRENC; AYALA, 2021). Essas diferenças de mobilidade resultam em perfis eletroforéticos distintos no gel de eletroforese para cada variante alélica, portanto, a análise desses padrões permite distinguir e caracterizar diferentes variantes alélicas de uma enzima, bem como identificar polimorfismos genéticos em diferentes grupos de *Leishmania* (SREENIVAS *et al.*, 2013).

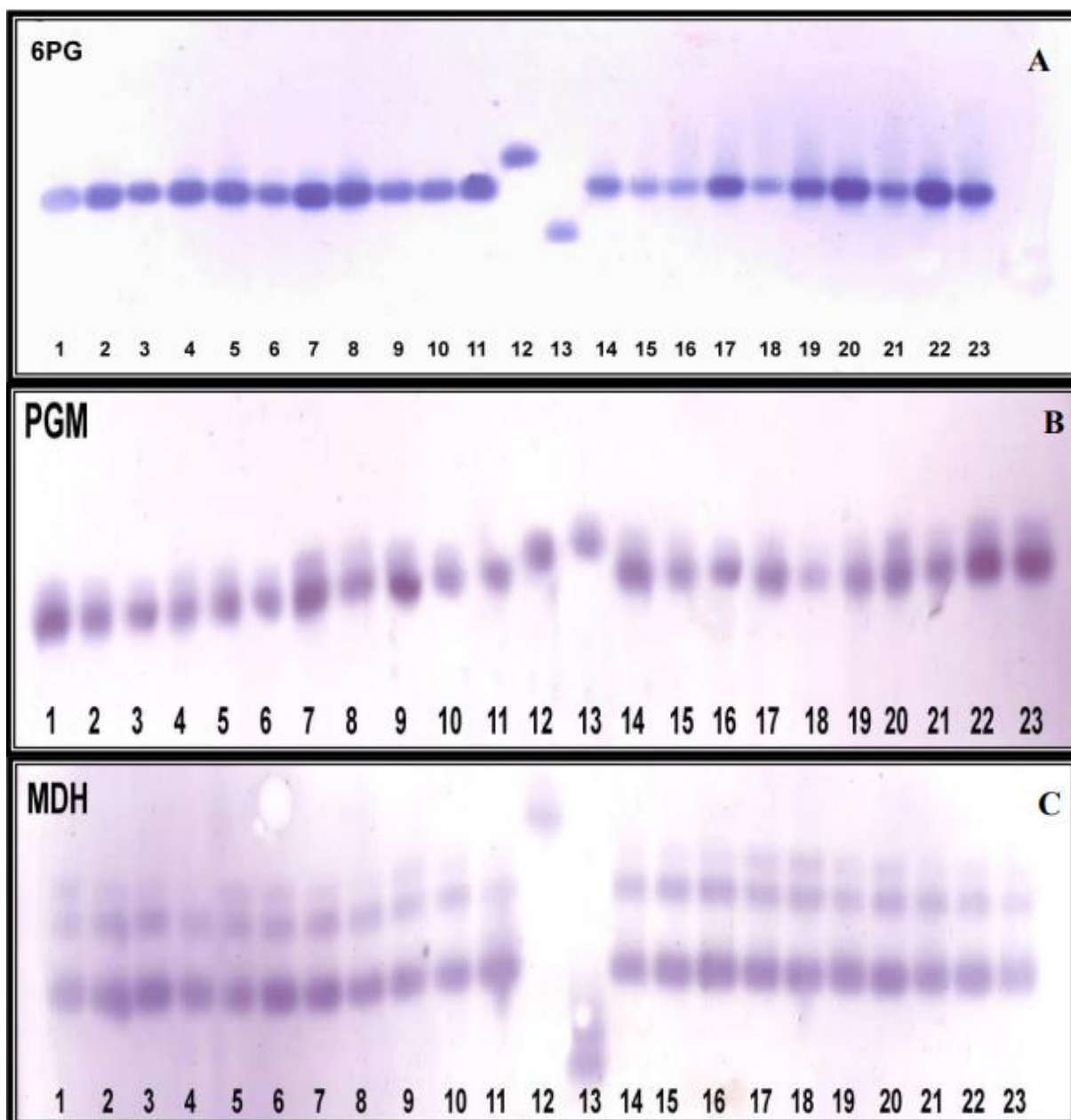


Figura 7: Perfil enzimático do sistema Glucose-6 Fosfato desidrogenase - G6PDH (A); Perfil enzimático do sistema fosfoglucomutase – PGM (B); Perfil enzimático do sistema Malato Desidrogenase - MDH (C).

Fonte: COUTINHO, 2010.

Apesar de ser considerada uma técnica poderosa e procedimento convencional para identificação de espécies e subespécies de *Leishmania* em diferentes regiões geográficas, avaliando a pluralidade genética dentro de cada população, o método de MLEE apresenta algumas limitações (BANULS *et al.*, 2007). As principais se referem a exigência de prévio cultivo dos parasitas requer, uma quantidade considerável de amostras e não podem distinguir diferenças genéticas muito pequenas, como variações SNP, que são variações genéticas que ocorrem

quando um único nucleotídeo no DNA é substituído por outro nucleotídeo em uma determinada posição de uma sequência de DNA (MORRIS *et al.*, 2001). Além disso, as isoenzimas utilizadas como marcadores moleculares são limitadas em sua amplitude de variação alélica, já que as enzimas apresentam funções metabólicas essenciais para a respiração celular, portanto, não podendo ser alteradas, isso pode resultar na não identificação de polimorfismos em um ou vários loci isoenzimáticos existente, o que pode limitar a capacidade discriminatória da técnica (SREENIVAS *et al.*, 2013). No entanto, a MLEE possui a vantagem de que os alelos isoenzimáticos são expressos de forma codominantes, o que permite a distinguir facilmente os genótipos homozigóticos e heterozigóticos de um determinado locus, exceto para um único gene com um único SNP. Essa utilidade permite a estimativa de parâmetros como frequências genótípicas e alélicas, bem como variações do equilíbrio de Hardy-Weinberg em um locus ou do equilíbrio de ligação gamética entre loci (FRANSSEN; TAKELE; ADEM; SANDERS; MÜLLER; KROPF; COTTON, 2021).

Por exemplo, um estudo teve como propósito examinar os aspectos epidemiológicos da *L. infantum*, responsável por causar leishmaniose visceral na região sudeste da Europa, com atenção especial para Turquia, Chipre e Grécia, bem como incluir amostras provenientes dos países dos Bálcãs. No estudo relacionou as cepas MON-1 e MON-98 e afirmou que a *Leishmania infantum* é a principal responsável pela ocorrência da leishmaniose visceral humana e canina, bem como de casos isolados de leishmaniose cutânea em diversas regiões que abrangem a bacia do Mediterrâneo (GOUZELOU *et al.*, 2013). As cepas MON-1 e MON-98 da *Leishmania* foram coletadas de humanos e caninos na Turquia, Chipre, Bulgária, Grécia, Albânia e Croácia, e caracterizadas pelo ensaio k-26 de PCR e eletroforese enzimática multilocus (MLEE), considerada o método padrão para a classificação e caracterização das diferentes cepas de *Leishmania*, no qual pretendia avaliar a diversidade genética e comparar a estrutura populacional por tipagem de microsatélite multilocus (MLMT) e os tipos de MLM foram analisados por algoritmos baseados em modelo e distância para inferir a estrutura populacional de *L. infantum* (HIDE *et al.*, 2001; SCHÖNIAN *et al.*, 2008).

O resultado do estudo forneceu uma compreensão mais abrangente da estrutura populacional de *L. infantum* em Chipre, uma ilha localizada na região sudeste da Europa e dos Bálcãs e descobriu-se que a cepa *L. infantum* MON-1 é a predominante na região, enquanto 16,8% das cepas identificadas eram MON-98.

(GOUZELOU *et al.*, 2013). Utilizando a ferramenta de tipagem K26 para confirmar a presença de *L. infantum* spp. e, ao mesmo tempo, distinguir entre zimodemas MON-1 e não MON-1 dentro do conjunto de cepas, obteve-se resultados que indicaram a existência de populações genéticas distintas, que revelam a clara diferenciação entre as cepas europeias do sudeste e sudoeste, bem como a formação de um grupo monofilético, conjunto de espécies que compartilham um ancestral comum, que inclui todos os isolados MON-1 caninos de Chipre (CHRISTODOULOU *et al.*, 2012). O agrupamento de isolados MON-1 pode ser explicado pelo isolamento natural da ilha de Chipre e pelo efeito de estrangulamento causado pelas campanhas de erradicação realizadas contra a malária e a equinococose (SCHÖNIAN *et al.*, 2008). Também foi identificado um número maior de cepas MON-98 em humanos na Turquia e na Grécia, mas não foi identificada uma população distinta, incluindo todas as cepas MON-98. Esses resultados confirmam estudos anteriores e revelaram uma clara diversidade entre as cepas espanholas continentais e das ilhas de Maiorca e Ibiza, em contraste com o agrupamento de cepas gregas continentais e de ilhas (HARALAMBOUS *et al.*, 2008). A análise filogenética também revelou duas subpopulações croatas distintas, sugerindo diferenciação substancial e fluxo gênico entre linhagens de ambos os zimodemas, onde, em suma, uma série de efeitos evolutivos resultou em subestruturação consecutiva, indicando uma diversificação considerável em ambas as linhagens de zimodemas (KUHLS *et al.*, 2008; GOUZELOU *et al.*, 2013).

Outro exemplo, é do complexo *Leishmania donovani* em uma vila sudanesa, onde entre os anos de 1997 e 2000, foram obtidas 61 cepas de parasitas do complexo *Leishmania donovani*, as quais foram posteriormente cultivadas em laboratório, de onde 10 cepas foram isoladas de caninos e 51 cepas de humanos (ROUSSET, 2004). As cepas foram obtidas de diferentes hospedeiros pois a transmissão ocorre entre as diferentes espécies hospedeiras, uma vez que os animais são frequentemente infectados pela leishmaniose e podem servir como reservatórios para a doença, sendo importante destacar que a coexistência de diferentes parasitas de *Leishmania* na mesma área geográfica pode complicar a epidemiologia e a prevenção da doença, pois diferentes espécies ou subespécies podem ter diferentes padrões de transmissão e respostas a tratamentos (BANULS *et al.*, 2007). Das 61 amostras coletadas e cultivadas, foi identificado que 33 delas pertenciam à espécie *Leishmania donovani*, 17 eram da espécie *Leishmania infantum* e 11 pertenciam à espécie *Leishmania archibaldi* (ROUSSET, 2004).

No estudo, não foi adequado considerar a amostra como uma única população, uma vez que existiam várias entidades genéticas coexistindo e havia uma diferenciação genética entre as linhagens humana e canina, com isso, as amostras foram estudadas pela técnica de MLEE e os resultados demonstraram que a clonalidade pode ter um impacto significativo no complexo *Leishmania donovani*, ao contrário de outras espécies de *Leishmania*, visto que as cepas da espécie de *L. donovani* não apresentaram diversificação genética considerável em relação as cepas das outras espécies estudadas (SREENIVAS *et al.*, 2013). A partir da análise genética, indicou que há uma baixa troca de genes (fluxo gênico) entre cães e seres humanos como hospedeiros de *Leishmania infantum*, isso sugere a existência de dois ciclos distintos do parasita envolvendo provavelmente diferentes espécies de vetores e reservatórios, enquanto no caso da *Leishmania archibaldi*, a diferença entre os ciclos de vida do parasita não é tão evidente, porém pode ser resultado do tamanho modesto das amostras coletadas para análise (ROUSSET, 2004). Já para a espécie *Leishmania donovani*, a maior especificidade das amostras para humanos coletadas em relação às amostras coletadas de cães tornou inviável a realização de testes para avaliar a presença de diferentes ciclos de vida do parasita (PRUGNOLLE *et al.*, 2010). Além disso os resultados também indicaram que o tempo é um fator significativo na subdivisão genética da *Leishmania donovani* e a explicação mais plausível é que à medida que os pacientes são diagnosticados e tratados, há uma redução no tamanho da subpopulação no ano seguinte e essa diminuição resulta em uma diferenciação genética, como resultado de um gargalo populacional ou da substituição de lugares vazios por outras cepas do parasita (BANULS *et al.*, 2007). Foi interessante notar que não foi observada nenhuma diferenciação genética significativa entre as formas clínicas de *L. donovani*, que causam leishmaniose visceral. Esse resultado sugere que o desenvolvimento da leishmaniose cutânea pós-cura (PKDL) em pacientes tratados pode estar mais relacionado a fatores do hospedeiro do que a fatores do parasita (ROUGERON *et al.*, 2011).

Outra discussão levantada no estudo indica que a raridade de MLGs (*MultiLocus Genotypes*) e a forte heterogeneidade dentro das subamostras são comuns para *L. donovani*, como já foi observado na África Oriental, esses padrões sugerem a presença de cepas geneticamente distintas (GELANEW T, KUHLS K, HURISSA Z, WELDEGEBREAL T, HAILU W *et al.* 2010). No entanto, o padrão encontrado em *L. donovani* no subcontinente indiano é diferente, com todos os loci

apresentando baixa variabilidade genética e dominados por um único MLG, sem desvios da panmixia em subamostras homogêneas (ALAM MZ, KUHLS K, SCHWEYNOCH C, SUNDAR S, RIJAL S *et al.* 2009). Esses resultados sugerem que esta região pode ter sido colonizada por uma cepa distinta daquelas presente na África, porém futuros estudos devem investigar o efeito de hospedeiros individuais na diferenciação populacional e nos modos de reprodução clonal, endogâmico e cruzado na distribuição genotípica desses parasitas (ROUGERON *et al.*, 2011).

#### **6.4 Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)**

O Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) é um método molecular empregado para investigar a pluralidade gênica entre diferentes estirpes do parasita *Leishmania* (KUHLS *et al.*, 2005). A técnica se baseia na fragmentação do DNA da *Leishmania* spp. com uma enzima de restrição específica, que cliva o ácido desoxirribonucleico em pontos particulares, originando fragmentos com tamanhos distintos (SCHÖNIAN *et al.*, 2003). As endonucleases de restrição utilizadas no RFLP reconhecem sequências de DNA específicas e dividem a dupla hélice do DNA em locais palindrômicos de corte, produzindo fragmentos com tamanhos variados. Cada enzima de restrição possui um grupo de sequências de corte exclusivas, o que resulta em padrões únicos de fragmentos clivados por enzimas de restrição para cada estirpe de *Leishmania* (MORITZ; WELCH; ANALYSIS, 2006).

Os fragmentos são então separados por eletroforese em gel de agarose, visualizados através de um corante específico e a análise dos padrões de fragmentos de restrição permite identificar a ocorrência de polimorfismos no DNA das diferentes estirpes de *Leishmania*, no qual, as endonucleases de restrição não irão reconhecer alguns locais de clivagem originando assim perfis eletroforéticos distintos (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

A técnica utiliza marcadores genéticos para distinguir genótipos homozigotos e heterozigotos (MARFURT *et al.*, 2003). Esses marcadores são expressos de forma codominante, o que significa que, os alelos dos genitores são igualmente expressos e, portanto, podem ser facilmente detectados e comparados. Devido a isso, a técnica é particularmente útil no reconhecimento de conexões entre

marcadores em genes que comandam uma característica específica de interesse (ROTUREAU *et al.*, 2006). Isso ocorre porque os padrões de fragmentos de restrição gerados pela digestão enzimática do DNA são altamente específicos para cada cepa de *Leishmania*, e esses padrões são capazes de ser utilizados para identificar alelos diferentes em diferentes indivíduos (MIRAHMADI *et al.*, 2018) (Imagem 8).

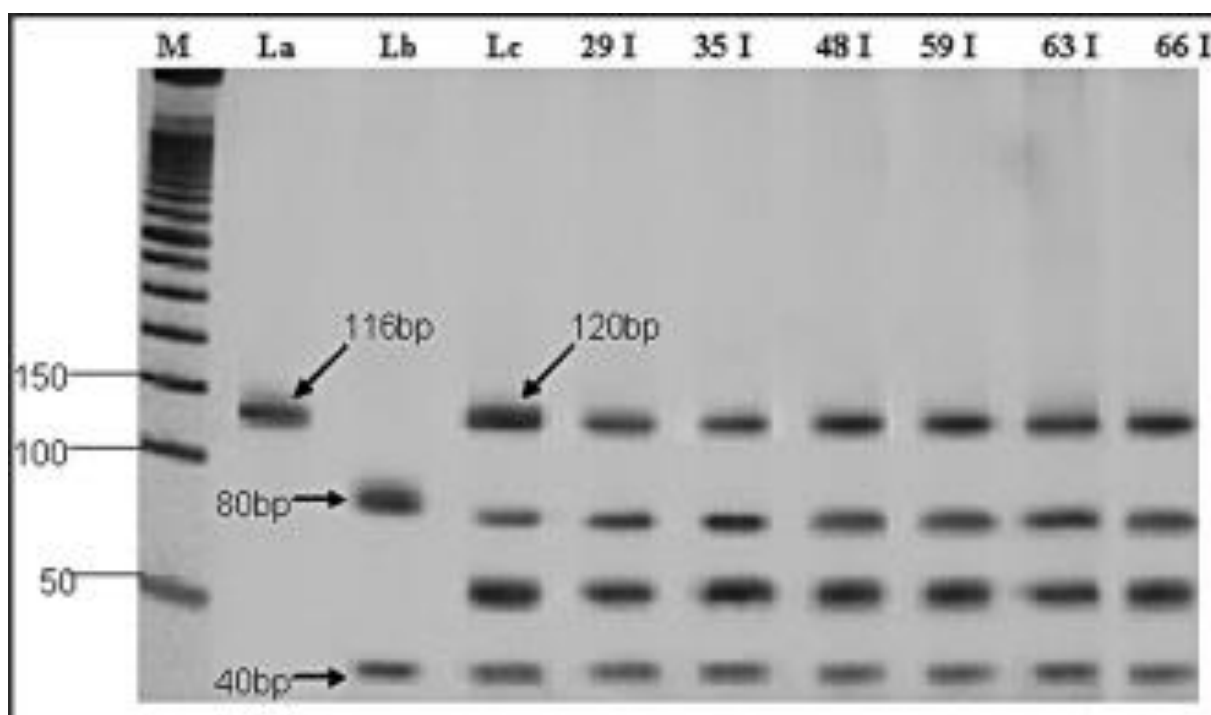


Figura 8: Eletroforese em gel de acrilamida a 10% impregnado por prata. M: marcador de peso molecular 50pb, cepas de referência: La: *Leishmania amazonensis*, Lb: *Leishmania braziliensis*, Lc: *Leishmania chagasi*, amostras positivas de flebotomíneos provenientes de área de transmissão intensa de LV estão identificadas pelos números.

Fonte: MICHALSKY *et al.*, 2011.

A técnica de RFLP do kDNA (DNA do cinetoplasto) pode ser utilizada na investigação epidemiológica e na classificação taxonômica de leishmanioses., permitindo o acompanhamento de estirpes circulantes em humanos, hospedeiros domésticos e hospedeiros silvestres, o que pode ajudar a definir situações epidemiológicas em áreas endêmicas (MONTALVO *et al.*, 2010). Além disso, a técnica pode ser utilizada para identificar infecções mistas por diferentes espécies de *Leishmania* em um único paciente e para detectar infecções concomitantes em diferentes tecidos. Por fim, a técnica de RFLP do kDNA também pode ajudar a descrever novas espécies de *Leishmania* (ROTUREAU *et al.*, 2006). Algumas

aplicações práticas dessas técnicas incluem a detecção de coinfeção por *L. infantum* e *L. braziliensis* em um paciente do Rio de Janeiro, a identificação simultânea de infecção cutânea, visceral e ocular por *L. braziliensis* em paciente transplantado renal, bem como a caracterização de *Leishmania (L.) forattinii*, novo tipo de *Leishmania* encontrado em gambás e roedores no Brasil (GONTIJO *et al.*, 2002).

A técnica RFLP-PCR é uma metodologia que utiliza endonucleases de restrição em segmentos de DNA previamente amplificados por PCR específica (FERROGLIO *et al.*, 2006). Essa técnica permite a análise da variabilidade genética dentro e entre espécies de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo, permitindo a distinção entre várias amostras de *L. braziliensis* e *L. (V.) amazonensis* coletadas a partir de lesões na pele. Além disso, essa técnica também foi empregada para analisar a diversidade interespecífica entre *L. infantum* e *L. L. chagasi*, sugerindo que fossem considerados uma espécie só (SILVA *et al.*, 2010). Algumas pesquisas que empregaram a técnica RFLP-PCR no estudo da epidemiologia molecular da *Leishmania* utilizaram o gene codificador da proteína gp63 como substrato utilizado durante a digestão por enzimas de restrição; dessa forma, é possível obter informações precisas em relação a pluralidade genética de espécies diferentes de *Leishmania*, contribuindo para a compreensão da epidemiologia dessas doenças e auxiliando na elaboração de estratégias de prevenção e controle (ROTUREAU *et al.*, 2006; HAJJARAN *et al.*, 2011)

Estudos utilizando RFLP têm revelado que há uma alta diversidade genética de *Leishmania* em regiões endêmicas da América Latina, como o Brasil, e que a transmissão da doença está relacionada com fatores ambientais e com a presença de diferentes vetores de transmissão (GONTIJO *et al.*, 2002). Além disso, a técnica RFLP tem sido útil para identificar fontes de infecção em casos de transmissão vetorial de leishmaniose, bem como para analisar a eficácia de medidas de controle da doença, pois ao comparar os padrões de fragmentos de DNA obtidos a partir de diferentes fontes de infecção, pesquisadores podem identificar semelhanças ou diferenças nos perfis de RFLP. Essas diferenças podem indicar se os parasitas têm uma origem comum ou se são geneticamente distintos e essas informações podem ajudar a rastrear a fonte da infecção e entender os padrões de transmissão da leishmaniose. (MONTALVO *et al.*, 2010). Porém, vale destacar que a técnica RFLP exige equipamentos especializados e é trabalhosa, o que pode limitar sua utilização em algumas situações (MELO; LINARDI; VITOR, 2005).

Exemplificando, em um estudo relacionado à *Leishmania braziliensis*, no qual foi estudado um total de 101 cepas de *Leishmania braziliensis* em hospedeiros distintos, em diversas regiões geográficas brasileiras, que foram atribuídos a 15 zimodemas agrupados em dois grandes grupos genéticos e considerando a relevância da leishmaniose para a saúde pública no Brasil e a influência do polimorfismo genético dos parasitas na epidemiologia da doença (DENGJEL *et al.*, 2001). Realizou testes de tipagem utilizando a eletroforese enzimática multilocus (MLEE) e a análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) dos espaçadores transcritos internos (ITS) dos genes de RNA ribossômico, a fim de avaliar o nível de variação genética na população natural (CUPOLILLO *et al.*, 1995).

Os dados obtidos a partir do estudo de diferentes cepas oriundas de diferentes hospedeiros e regiões ecológicas no Brasil indicaram uma população clonal tendo uma estrutura de distribuição variando com diferentes tipos de zimodemas, como o IOC/Z-27, que são amplamente encontrados em diversas regiões brasileiras, e outros, como o IOC/Z-35 e IOC/Z-45, que parecem ser únicos e restritos a focos endêmicos específicos nas cinco regiões brasileiras (CUPOLILLO *et al.*, 2003). Após a realização da análise IRT, foi constatado um alto nível de diferenciação entre os isolados provenientes de distintas regiões, confirmando a eficácia dessa técnica em discriminar entre parasitas que estão intimamente relacionados (DENGJEL *et al.*, 2001). Os três grupos genotípicos diferentes que foram identificados podem ser considerados uma variação genética significativa dentro do parasita *L. braziliensis* e isso pode ajudar a explicar por que esses parasitas são tão plásticos e têm a habilidade de se adaptar às mudanças nas condições ecológicas (CUPOLILLO *et al.*, 2003).

Os resultados deste estudo indicaram que a maioria dos genótipos do parasita é específica para determinadas áreas geográficas (MORRIS *et al.*, 2001). Por exemplo, o genótipo B1 é composto por isolados coletados em uma localização geográfica específica no Espírito Santo, durante um período de tempo distinto (entre 1982 e 1995). Isso demonstra a importância da disseminação clonal deste organismo na natureza, pelo menos em algumas regiões (GONTIJO, 2003). A estabilidade do genótipo B1 ao longo dos anos, adaptando-se às mudanças ambientais na mesma área, fornece evidências que suportam a importância da disseminação clonal (CUPOLILLO *et al.*, 2003). De acordo com as análises, a diversidade molecular observada em parasitas da Bacia Amazônica parece estar relacionada ao elevado

número de vetores de flebotomíneos e/ou animais reservatórios envolvidos nos ciclos de transmissão (GRIMALDI JUNIOR; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989). Por outro lado, as populações que circulam na costa atlântica brasileira (representando 81,2% dos isolados coletados de humanos e cães em comunidades antigas estabelecidas em áreas não florestadas) apresentaram um nível menor de heterogeneidade em comparação com as cepas amazônicas, onde nessas regiões, as espécies peridomésticas de flebotomíneos, como *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia whitmani*, são consideradas os principais vetores responsáveis pela transmissão (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1999).

O estudo também apontou que fatores como alta diversidade genética e oportunidades de transmissão entre espécies favorecem a capacidade de patógenos infectarem múltiplos hospedeiros e isso se deve à produção de mais variantes genéticas em patógenos com maior acumulação de mutações, o que os torna mais generalistas (NIMRI *et al.*, 2002), além disso, a adaptação do hospedeiro está ligada e limitada pela variabilidade genética, pois parasitas que infectam vários hospedeiros diferentes têm maior probabilidade de serem encontrados em diferentes ciclos de transmissão, ademais, foi observado que os parasitas isolados de áreas geograficamente próximas tendem a ser mais geneticamente similares (GOMES *et al.*, 1995; VEASEY *et al.*, 2020). Outra informação relevante é que a mobilidade dos vetores e reservatórios pode estar associada à disseminação de clones de *Leishmania spp*, como sugerido recentemente, entretanto, é crucial destacar a flexibilidade desses parasitas em se adaptar a diferentes condições ambientais e uma possível evolução conjunta com seus vetores, algo que tem sido observado em países do Velho Mundo (VEASEY *et al.*, 2020).

### **6.5 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD)**

A técnica tem como princípio a amplificação aleatória de fragmentos de DNA parasitário utilizando oligonucleotídeos inespecíficos que reconhecem sequências curtas no genoma (MKADA-DRISS *et al.*, 2014). Se houver polimorfismos, que são variações genéticas, esses oligonucleotídeos irão reconhecer diferentes sítios nos iniciadores, gerando um padrão de bandas distinto após a amplificação

(RAMÍREZ; LLEWELLYN, 2014). Quanto mais polimorfismos existirem no genoma das amostras, maior será a quantidade de bandas não compartilhadas entre elas e os diferentes perfis gerados podem ser analisados numericamente em softwares específicos, como GeneMarker, PopGene, BioNumerics e RAPDistance (BINNECK; NEDEL; A DELLAGOSTIN, 2002) (Imagem 9).

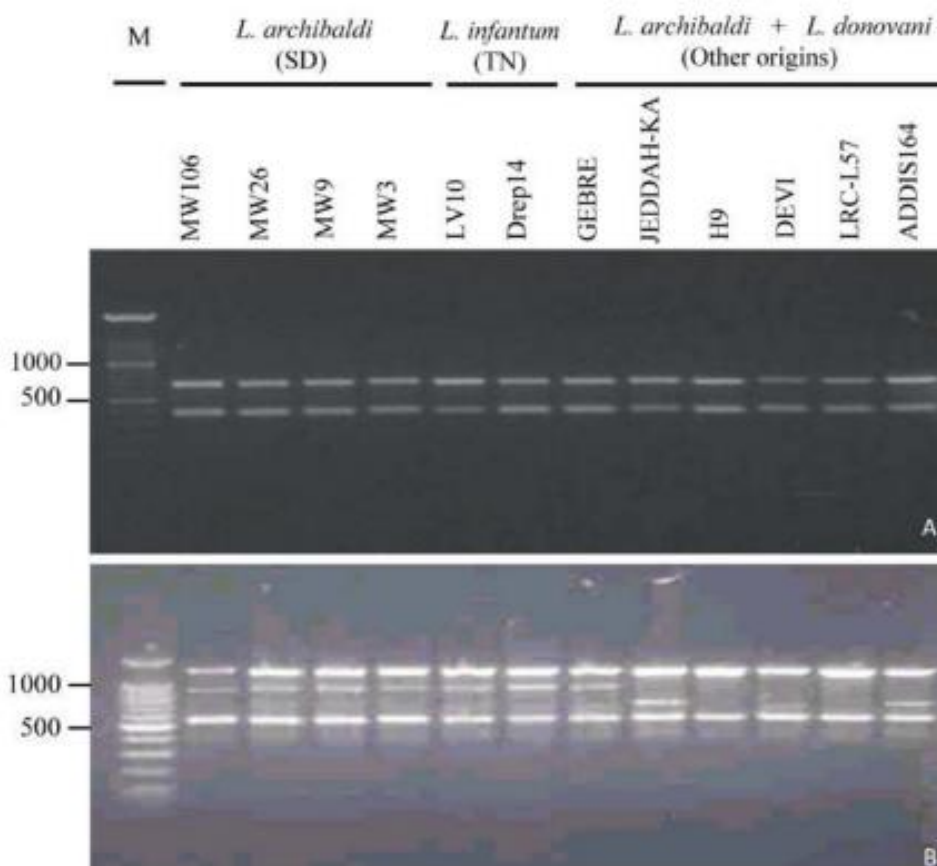


Figura 9: Perfis RAPD obtidos com os primers OP-07 (A) e OP-013 (B) para ilustrar exemplos de perfis monomórficos e polimórficos. SD: Sudão; TN: Tunísia; M: marcador de tamanho de DNA de 100 pb.

Fonte: MKADA-DRISS *et al.*, 2014

O RAPD é uma ferramenta que pode ser usada para avaliar a variabilidade genética dentro e entre espécies de *Leishmania*, permitindo identificar diferenças no DNA que podem estar associadas a características biológicas importantes, como a virulência, a capacidade de resistir a tratamentos e a habilidade de infectar diferentes hospedeiros (SILVA; ALVES, 2014). Uma das vantagens da técnica RAPD é que ela não requer a construção prévia de uma biblioteca de iniciadores específicos para o organismo em questão, em vez disso, um grupo

"polivalente" de oligonucleotídeos pode ser usado para qualquer organismo (CUPOLILLO *et al.*, 2003; SCHRIEFER *et al.*, 2004; VEASEY *et al.*, 2020).

A principal limitação da técnica RAPD é a detecção de apenas um alelo por locus, tornando impossível a distinção entre genótipos heterozigotos e homozigotos. Idealmente, essa técnica deve ser utilizada em conjunto com outras, como a MLEE, para confirmar o agrupamento de zimodemas (MKADA-DRISS *et al.*, 2014). Estudos com o marcador RAPD em *Leishmania spp.* permitiram avaliar a diversidade genética intraespecífica em diferentes áreas geográficas, evidenciando a multiclonalidade das populações parasitárias e a presença de clones geneticamente relacionados em pacientes com leishmaniose. Os resultados obtidos com a técnica RAPD contribuíram para a comparação de isolados de *Leishmania* de diferentes regiões do mundo, permitindo identificar semelhanças entre eles (SILVA *et al.*, 2009). Um estudo que teve como objetivo encontrar marcadores genéticos de DNA em parasitas de *Leishmania* em diferentes regiões geográficas para diferenciar entre as espécies de parasitas. Foram selecionadas doze cepas de *Leishmania*, incluindo *L. infantum*, *L. donovani* e *L. arquipaldi*, com origens diversas em países como Quênia, Etiópia, Arábia Saudita e Índia. Foram amplificadas 155 bandas de DNA, das quais 60,65% foram consideradas polimórficas. Sete dos 28 primers usados forneceram padrões genéticos idênticos para todas as cepas. A análise genética permitiu agrupar os parasitas de acordo com a sua origem geográfica. Alguns dos fragmentos de DNA amplificados foram selecionados para clonagem e sequenciamento. No total, 22 fragmentos foram clonados e sequenciados com sucesso (MKADA-DRISS *et al.*, 2014).

No estudo usou diferentes cepas de parasitas de várias regiões geográficas, incluindo Tunísia, Sudão e França (AOUN *et al.*, 2000; AOUN *et al.*, 2001). Todas as cepas foram criopreservadas anonimamente e aprovadas pelos comitês de ética correspondentes. Dois isolados do Sudão não foram tipados por análises de isoenzimas, mas foram atribuídos a complexos de *L. infantum* / *L. donovani* por meio de técnicas de DNA (MKADA-DRISS *et al.*, 2014).

Para identificar padrões genéticos em amostras de *L. arquipaldi*, foram sintetizados cem pequenos segmentos de DNA (primers de 10 bases) e utilizados em experimentos RAPD. Após duas rodadas de amplificação (GUIZANI *et al.*, 2002), 28 primers que forneceram perfis genéticos estáveis foram selecionados. A amplificação RAPD foi realizada, os produtos foram separados por eletroforese em

gel de agarose e as bandas foram visualizadas sob luz UV após coloração com brometo de etídio (ZEMANOVÁ *et al.*, 2004). A análise RAPD de 12 cepas de *Leishmania donovani* / *Leishmania infantum* foi realizada para agrupá-las por região geográfica. 28 primers foram utilizados, gerando de 1 a 11 bandas amplificadas, com 7 primers fornecendo perfis monomórficos e 21 gerando diferentes níveis de diferenciação taxonômica. Foram amplificadas 155 bandas, das quais 94 eram polimórficas (60,65%). Os parasitas foram agrupados de acordo com sua atribuição de espécies e/ou origens geográficas (MKADA-DRISS *et al.*, 2014).

O dendrograma destacou um agrupamento semelhante dos parasitas de acordo com sua origem geográfica quando reduzimos o conjunto de dados aos perfis obtidos com 9 primers que amplificaram as 22 bandas RAPD clonadas. Foram identificados 22 clones no total, sendo que 19 destes apresentaram sequências com alta similaridade com sequências conhecidas de *Leishmania infantum* e três com sequências de *L. donovani* (MKADA-DRISS *et al.*, 2014).

#### **6.6 PCR de iniciador único em condições de baixa estringência (Low-Stringency Single Specific Primer-PCR, LSSP-PCR)**

Essa técnica de detecção utiliza a amplificação de um segmento específico do DNA do parasita por meio de PCR (ALVARENGA, 2012). Em seguida, os produtos da primeira amplificação são submetidos a uma segunda amplificação utilizando um único iniciador em condições de baixa estringência, o que permite que o iniciador se ligue a sequências nucleotídicas menos específicas (DESJEUX, 2004). Com isso, podem ser gerados produtos de diferentes tamanhos, que serão separados e identificados por eletroforese, resultando em um padrão complexo de várias bandas. Este padrão pode ser alterado por polimorfismos de base única, o que permite a discriminação de diferentes variantes genéticas da *Leishmania* (PENA *et al.*, 1994; HERRER e CHRISTENSEN, 2005) (Imagem 10).

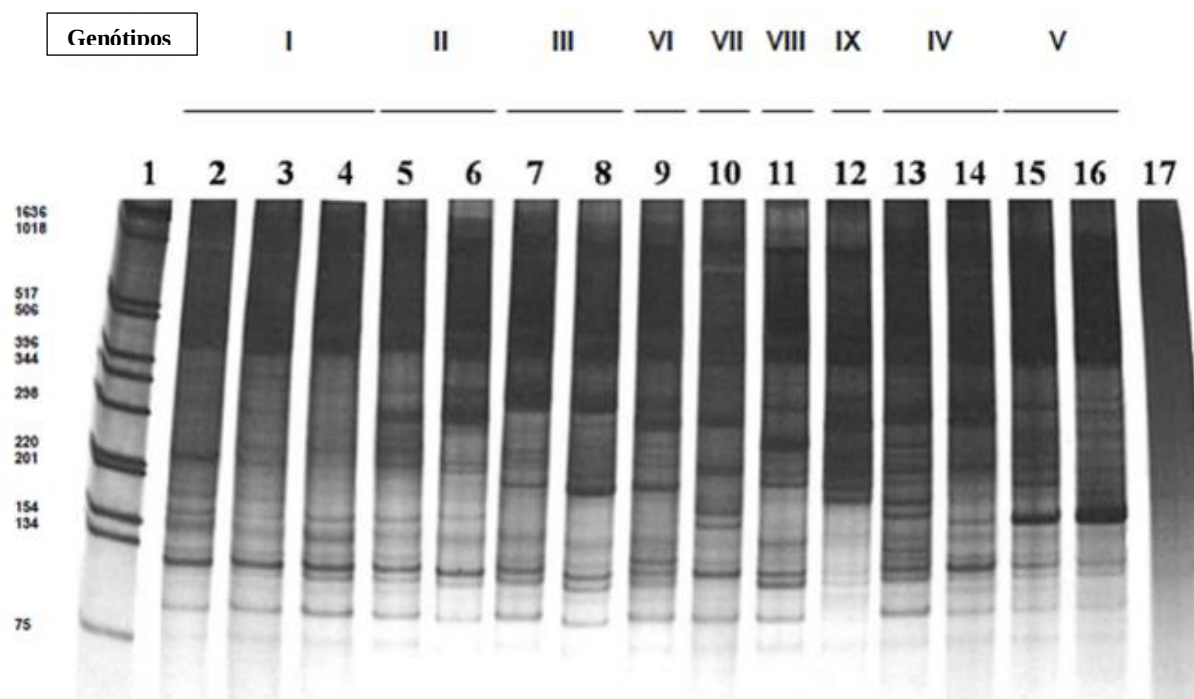


Figura 10: Assinaturas de KDNA do fragmento de minicírculo de 447 pb de *L. infantum* isoladas de pacientes humanos. Os produtos da reação LSSP-PCR foram carregados em cada pista de um gel de poliácridamida a 6% e corados com prata.

Fonte: ALVARENGA, 2012.

A LSSP-PCR permitiu a detecção de variações genéticas intraespecíficas no kDNA de *L. (V.) braziliensis* presentes em lesões de mucosa oral e nasal (ROGERS *et al.*, 2011). Foi possível identificar perfis genéticos distintos em lesões da mesma pessoa, coletadas em um intervalo de um ano. Isso demonstra a capacidade da técnica em identificar variações genéticas em amostras clínicas, o que pode auxiliar no diagnóstico e tratamento adequado da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2010). É importante destacar que essa técnica pode gerar resultados falsos positivos, devido a contaminação cruzada de amostras durante o processamento, como, quando amostras de DNA de *Leishmania spp.* de uma amostra positiva são inadvertidamente transferidas para uma amostra negativa durante a extração de DNA ou a preparação de reações de PCR e portando deve ser confirmada por outras técnicas de diagnóstico, como a cultura de tecidos ou a detecção de anticorpos específicos (IVENS *et al.*, 2005). No entanto, a técnica de PCR de iniciador único em condições de baixa estrigência pode ser útil para a detecção precoce da Leishmaniose em pacientes com suspeita de infecção (KHAN *et al.*, 2014).

No estudo, foram analisadas cepas de *L. infantum* isoladas de casos humanos e caninos de leishmaniose visceral no Brasil e em Portugal (ALVARENGA, 2012). O polimorfismo genético dessas cepas foi verificado usando a técnica LSSP-PCR para a análise da região hipervariável dos minicírculos do DNA do cinetoplastídeo (kDNA) (KUHLS *et al.*, 2011). Foram utilizadas 40 cepas de *L. infantum* isoladas de pacientes humanos e cães com leishmaniose visceral em Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil) e Lisboa (Portugal), sem vínculos epidemiológicos identificáveis entre eles. As cepas foram cultivadas, criopreservadas e caracterizadas como *L. infantum* MON-1 usando análise de Eletroforese Enzimática Multilocus (MLEE) (ALVARENGA, 2012).

O DNA total foi isolado de culturas de promastigotas usando um protocolo convencional que envolveu etapas de digestão enzimática, extração e precipitação. Foi realizada a amplificação de um fragmento de minicírculo kDNA de 447 pb usando primers específicos (MC1 e MC2). A técnica de PCR foi empregada, utilizando DNA do parasita e um kit de reagentes específico (CHARGUI *et al.*, 2009). Os produtos da PCR foram analisados em géis de poliacrilamida corados com prata. As amostras de DNA foram purificadas após a amplificação por PCR. Em seguida, uma segunda amplificação foi realizada em condições específicas usando um iniciador (CHICHARRO *et al.*, 2002). Os perfis resultantes foram analisados em géis de poliacrilamida corados com prata. A análise dos tamanhos dos fragmentos principais foi feita com o auxílio de um software especializado (ALVARENGA, 2012).

Foram encontradas oito variações genéticas únicas, sendo duas exclusivas das cepas de referência. Alguns polimorfismos estavam relacionados à origem geográfica das cepas, como uma transição de A para G na posição 91. Também foi identificado um polimorfismo específico em cepas humanas de Portugal, presente também em cepas de cães do Brasil. A análise dos perfis genéticos revelou alta variabilidade intraespecífica entre as 40 cepas de *L. infantum* isoladas do Brasil e Portugal. Os perfis obtidos por LSSP-PCR mostraram fragmentos de DNA variados, com alguns padrões compartilhando grupos de bandas. Com base no tamanho e número dos fragmentos de DNA, foram identificados nove genótipos distintos entre as cepas humanas, com os genótipos I, II e III agrupando o maior número de cepas, seguidos pelos genótipos IV e V (ALVARENGA, 2012).

Os perfis de DNA obtidos por LSSP-PCR da região hipervariável do kDNA de *L. infantum* isolados de reservatórios caninos mostraram alta variabilidade

genética. Esses isolados foram agrupados em oito genótipos principais, sendo o genótipo I o mais comum. Houve compartilhamento parcial ou completo de bandas entre diferentes perfis de kDNA de isolados caninos. Ao combinar os perfis de kDNA de casos humanos e caninos, foi possível construir uma árvore filogenética que separou os isolados em dois ramos principais (A e B). Os genótipos obtidos de isolados humanos foram agrupados em dois subgrupos, enquanto os isolados caninos foram agrupados em dois clusters. A análise estatística mostrou que os genótipos de linhagens humanas e caninas eram distintos com alta confiança (ALVARENGA, 2012).

Os perfis de LSSP-PCR do kDNA de amostras de *L. infantum* de casos humanos e cães infectados do Brasil e Portugal mostraram semelhanças genéticas entre isolados do mesmo reservatório (humano ou canino). No entanto, não houve relação entre os perfis de kDNA e a origem geográfica das cepas de *L. infantum*. Isso significa que os perfis genéticos não foram influenciados pela localização geográfica das cepas, mas sim pela sua origem como humano ou canino (ALVARENGA, 2012).

### **6.7 PCR ancorada a repetições de sequências simples (*Simple Sequence Repeats*-PCR, SSR-PCR)**

A metodologia é baseada na amplificação através de *primers* específicos de regiões de DNA contendo repetições em tandem de sequências curtas e altamente variáveis, conhecidas como microssatélites ou SSRs e o produto da PCR é então separado por eletroforese em gel de agarose e corado através do brometo de etídio (SEGATTO; LEMOS, 2012). A análise dos padrões de fragmentação obtidos entre diferentes amostras permite a identificação de diferenças na sequência do DNA, que podem estar relacionadas à diversidade genética entre as populações de parasita (KUHLS ET AL., 2007) (Imagem 11).

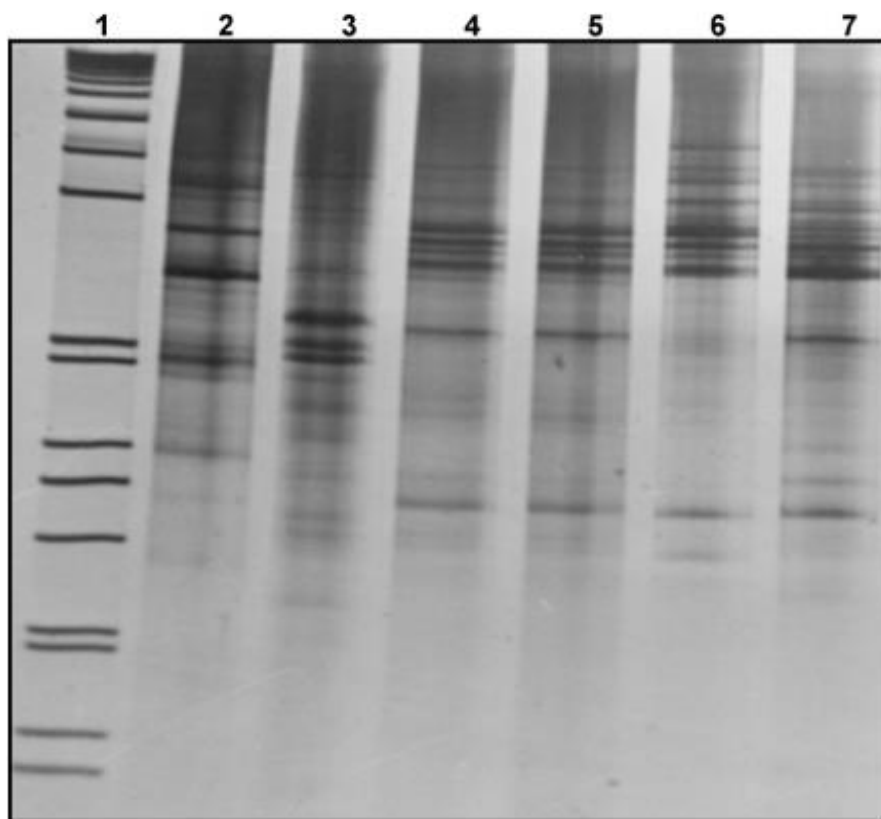


Figura 11: SSR-PCR de *L. braziliensis* M2903 (linha 2), *L. amazonensis* PH8 (linha 3), *L. major* - cepas BH49 (linha 4) e BH121 (linha 5) e cepas de referência da OMS de *L. major* FN (linha 6) e 5ASKH (linha 7). A escada Kb DNA é mostrada (linha 1).

Fonte: SILVA *et al.*, 2009

Os genomas de organismos eucariotos possuem muitas sequências de DNA repetidas, algumas mais complexas e outras mais simples, como os microssatélites (PEACOCK *et al.*, 2007). Essas sequências são altamente variáveis, o que as torna úteis como marcadores genéticos para a análise da diversidade genética (IVENS *et al.*, 2005). Cada microssatélite funciona como um locus alélico e apresenta variação na quantidade de repetições, o que gera polimorfismos genéticos. A análise dos padrões de fragmentação obtidos pela SSR-PCR permite identificar as diferenças na sequência do DNA entre diferentes amostras (DOWNING *et al.*, 2011). Essa técnica tem como vantagem em relação a outras técnicas a alta quantidade de polimorfismos presentes nas regiões microssatélites, que permitem uma ampla cobertura do genoma e uma análise abrangente da diversidade genética, além de ser uma técnica rápida, relativamente barata, o que requer uma quantidade mínima de DNA de amostra (HAMARSHEH *et al.*, 2009). No entanto, sua limitação é que é necessário desenvolver marcadores específicos para cada organismo de interesse,

o que envolve a construção de uma biblioteca de fragmentos genômicos, e a técnica pode ser sensível a variações na qualidade e quantidade do DNA extraído das amostras, e a interpretação dos padrões de fragmentação pode ser complexa em populações altamente mistas (GOUZELOU *et al.*, 2013).

#### **6.8 Sequenciamento de DNA, tipagem por sequenciamento de multilocos (*Multilocus Sequence Typing*, MLST) e tipagem por multilocos de microssatélites (*Multilocus Microsatellite Typing*, MLMT)**

Para estudar a evolução genética e epidemiologia de patógenos, é comum utilizar técnicas de sequenciamento de DNA. Na leishmaniose, são amplificados alvos genéticos específicos por meio de PCR e sequenciados, como as sequências genômicas dos espaçadores transcritos internos e da subunidade 5.8S do DNA ribossomal (KUHLS *ET AL.*, 2007). Essas sequências são depositadas em bancos de dados públicos, como o GenBank, e posteriormente analisadas (GONTIJO, 2003). A análise dessas sequências permitiu a identificação e separação dos subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*, a discriminação entre espécies do Velho Mundo e aquelas pertencentes ao complexo *L. mexicana*, a separação dos complexos de espécies do Velho Mundo e a separação de espécies dentro dos complexos (KUHLS *et al.*, 2007). Esses resultados não divergiram da classificação proposta por meio de MLEE, outra técnica utilizada em genética molecular para caracterização de populações de organismos (DÁVILA; MOMEN, 2000) (Imagem 2).

| Locus                  | Número do cromossomo | Nº de sítios polimórficos/ SNPs | Sequências de primers (5'-3')                                                                                                                | Temperatura de recozimento do cromossomo (°C) | bp   |
|------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------|
| GPI <sup>a</sup>       | 12                   | 0                               | F:GACCGAGGCACTTGAAG<br>R6: TGAATGAGCTGGTAGAATG                                                                                               | 57                                            | 1150 |
| ICD <sup>a</sup>       | 10                   | 5                               | F:ATGTTCCGCCATGTTTCGG<br>R:TTACGCGCTCATCGCCTT                                                                                                | 61                                            | 1267 |
| Ch28 <sup>a</sup>      | 28                   | 18                              | INTF:GTCGCAGTCCAACTCCCATA<br>INTR:CGCATAGCAAAGCCAAA                                                                                          | 53                                            | 1530 |
| Ch36-1190 <sup>a</sup> | 36                   | 8                               | F:GCTTCTCGCTATTGCTCGTC<br>R:ACTGGCAGGCACACATCAG<br>INTFA: GCGGCTACCTCGCCCTCAGT<br>INTFB:GTGAAGGACCAAGCTGCCTGG<br>INTRA;TGTGAAGCACCAGCAGGACGG | 59                                            | 1640 |
| Ch36-0350 <sup>b</sup> | 36                   | 3                               | F:ACTTGCTCTTGGTACGG<br>R:TGGAGGACGGAGAGACTTTG<br>INTF:GTGAATGGAGGGCAGACG<br>INTR:GTCGTGAAAAGCGAGAAGGT                                        | 61                                            | 850  |

Figura 12: Alvos de tipagem de sequência multilocus para *Leishmania donovani*. SNP, polimorfismo de nucleotídeo único; GPI, glucose-6-fosfato isomerase; ICD, isocitrato desidrogenase; Ch, cromossomo. a: Codificando o marcador nuclear, b: Marcador nuclear não codificante.

Fonte: TESFAYE *et al.*, 2014

A técnica de MLST é utilizada para medir variações na sequência de nucleotídeos do DNA de parasitas, em um conjunto específico de genes chamados de genes *housekeeping* (DÁVILA; MOMEN, 2000). Esses genes são importantes para a manutenção das funções celulares básicas e por meio dessa técnica, é possível caracterizar isolados distintos com base em seus perfis alélicos únicos (PEACOCK *et al.*, 2007). A técnica envolve a realização de PCR e sequenciamento do DNA, no qual as diferenças na sequência de nucleotídeos entre as amostras podem ser avaliadas para um número variável de genes, dependendo do nível de discriminação desejado (ROGERS *et al.*, 2011). Para analisar e interpretar os dados obtidos, são utilizadas ferramentas de biologia computacional. A técnica de MLST é uma ferramenta valiosa para a identificação e caracterização de parasitas, permitindo o estudo da epidemiologia e evolução desses organismos, porém em alguns casos, essa técnica pode enfrentar dificuldades quando a espécie em análise apresenta variação genética

muito reduzida para diferenciar os isolados (MORRIS *et al.*, 2001). Isso pode ocorrer em alguns eucariotos, onde dessas situações os níveis de diversidade genética nos loci analisados podem não ser suficientes para permitir a discriminação dos isolados por meio da técnica de MLST (HERRERA *et al.*, 2017).

No estudo, foi realizado o uso da técnica de tipagem de sequência multilocus (MLST) em cinco genes que codificam enzimas (fh, g6pdh, icd, mpi, pgd) e dois genes conservados (hsp70, lack), a fim de investigar as relações filogenéticas entre diferentes cepas chinesas de *Leishmania*. Para isso, as sequências de nucleotídeos dos sete genes foram alinhadas em conjunto e analisadas para a construção de árvores filogenéticas utilizando métodos de junção de vizinhos e máxima parcimônia (SUN *et al.*, 2012). Adicionalmente, foram obtidas sequências de 25 cepas adicionais (24 pertencentes ao complexo *L. donovani* e uma pertencente a *L. gerbilli*) do GenBank (banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos) a fim de inferir a história evolutiva molecular da *Leishmania* na China e em outras áreas endêmicas ao redor do mundo. As análises filogenéticas permitiram a classificação da *Leishmania* chinesa em quatro grupos distintos: (i) Um grupo composto por 13 isolados provenientes de diferentes focos na China, pertencentes ao clado A. Esses isolados foram patogênicos tanto para humanos quanto para caninos. Esse grupo foi subdividido em dois subgrupos, clado A1 e clado A2, que apresentavam uma relação de parentesco mais próxima entre si do que com outros membros do complexo mundial de *L. donovani*. (ii) Um grupo denominado clado B, que incluía uma cepa de referência de *L. turanica* e cinco cepas chinesas de Xinjiang. (iii) O clado C, composto pelas cepas SELF-7 e EJNI-154, que apresentavam uma relação próxima ao clado B. Ambos os isolados foram identificados como pertencentes à espécie *L. gerbilli* (ZHANG *et al.*, 2013)

Observou-se que a origem geográfica das cepas era mais importante para a relação genética do que o tipo de apresentação clínica da doença (SEGATTO *et al.*, 2012). Mudanças ambientais de origem humana podem ter influenciado a estrutura da população e a diversidade genética (SCHONIAN *et al.*, 2008). Além disso, os hospedeiros desempenham um papel importante no resultado da leishmaniose (DOWNING *et al.*, 2011).

Apesar de os resultados indicarem que as cepas chinesas de *Leishmania* formam um agrupamento robusto, revelando uma história evolutiva mais complexa do que se pensava contribuindo para uma melhor compreensão da filogenia

e história evolutiva das espécies de *Leishmania* na China, alguns isolados apresentaram falha na amplificação de certos genes enzimáticos, e uma cepa de *L. braziliensis* mostrou uma relação distante com as espécies do Velho Mundo (KUHLIS *et al.*, 2007). Também foi destacado que os isolados chineses de *Leishmania* (clado A1 e A2) foram agrupados com outros membros do complexo *L. donovani* em todo o mundo, sugerindo uma história evolutiva complexa dessas espécies na China (ZHANG *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que a classificação dos isolados chineses de *Leishmania* como uma espécie não descrita ainda é um assunto em debate, e podem existir vieses de amostragem e variantes de sequência entre diferentes células dentro de uma mesma população (REALE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2013).

Outra técnica é a MLMT, tipagem por multilocus de microssatélites que se baseia no uso de marcadores genéticos chamados microssatélites (IMAMURA *et al.*, 2016). São selecionados vários locais específicos do genoma do parasita, onde os microssatélites estão localizados, locis, e seguida, o DNA do parasita é extraído e amplificado usando técnicas de PCR para amplificar os microssatélites em cada locus (IVENS *et al.*, 2005). Os fragmentos amplificados são então analisados usando técnicas de eletroforese em gel ou sequenciamento de DNA, permitindo determinar o tamanho dos fragmentos de DNA em cada locus e comparando os padrões de tamanho dos microssatélites entre diferentes isolados de *Leishmania*. (BANULS *et al.*, 2007).

No estudo, a técnica MLMT foi aplicada em 91 cepas de *Leishmania*, incluindo várias espécies, provenientes de regiões endêmicas de leishmaniose visceral. Foram utilizados 15 marcadores microssatélites desenvolvidos para o complexo *L. donovani*. As cepas foram obtidas de regiões como África Oriental, Índia, China, Mediterrâneo, América do Sul e Oriente Médio (KUHLIS *et al.*, 2007; RIOUX *et al.*, 1990; QUISPE *et al.*, 2004; IBRAHIM *et al.*, 2001).

Observou-se a existência de subestruturas com base no local e no tempo de isolamento das cepas. As populações de *Leishmania* são predominantemente clonais, com alto nível de endogamia (PRATLONG *et al.*, 2001). A diversidade alélica foi maior no Mediterrâneo, intermediária na África e menor na Índia. A técnica MLMT mostrou ser uma ferramenta poderosa para estudos taxonômicos, genéticos populacionais e epidemiológicos do complexo *L. donovani* (KUHLIS *et al.*, 2007).

A MLMT identificou seis grandes populações geográficas com isolamento genético, reforçando a existência de duas espécies/subespécies distintas dentro de *L. donovani*: *L. donovani* e *L. infantum*. O grupo *L. infantum* foi subdividido em duas populações, MON-1 e não MON-1. O *L. chagasi*, sinônimo do Novo Mundo de *L. infantum*, foi encontrado em ambas as populações (KUHLS *et al.*, 2007). Houve indícios de uma possível introdução recente desse parasita na China. As cepas do norte da África, Turquia e Israel foram separadas das cepas do sul da Europa, com exceção de uma cepa da França (MAURICIO *et al.*, 2001; QUISPE *et al.*, 2004).

Foram identificadas quatro populações geneticamente isoladas de cepas de *L. donovani* na África Oriental e Índia. Na Índia, as cepas foram divididas em dois clusters distintos, enquanto algumas foram agrupadas com cepas do Quênia. No Sudão/Etiópia, foram detectadas duas populações distintas, com diferentes zymodemas. Variação genética também foi observada dentro dessas populações, associada ao ano de isolamento das cepas. Cepas do leste africano atribuídas a diferentes espécies apresentaram dispersão entre as populações do Sudão/Etiópia 1 e 2, o que invalida a espécie *L. archibaldi* e indica que *L. infantum* não existe na África Oriental, corroborando estudos anteriores (KUHLS *et al.*, 2007).

Todas as cepas da Índia, exceto duas, formaram o grupo uniforme chamado Índia 1, representando o zimodema MON-2. Essas cepas foram isoladas principalmente em Bihar, uma região endêmica de leishmaniose visceral. A existência de populações geneticamente isoladas é apoiada por diferenças na biologia e no comportamento clínico das cepas de *L. donovani*. A transmissão por diferentes vetores pode estar relacionada às populações distintas na África Oriental (KUHLS *et al.*, 2007). A técnica MLMT revelou uma estrutura genética predominantemente clonal nas cepas de leishmaniose visceral, com altos níveis de endogamia, o que tem importância epidemiológica (SCHWENKENBECHER *et al.*, 2006; FELSENSTEIN *et al.*, 2004).

## 7. CONCLUSÃO

Diante das informações levantadas, é possível concluir que a clonalidade predomina quase que totalmente nas espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose visceral e pode ter implicações importantes para a epidemiologia, devido à rápida disseminação de genótipos específicos. No entanto, a presença ou ausência de clones varia entre as diferentes espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie. Isso depende de fatores como o ciclo de vida do protozoário, os diferentes hospedeiros intermediários e definitivos, as diferentes vias de transmissão, as pressões seletivas, incluindo o uso de medicamentos e a resistência aos mesmos, e a migração e dispersão entre regiões geográficas. Esses fatores podem afetar a diversidade genética da população, levando à seleção de diferentes linhagens ou clones e influenciando a eficácia dos tratamentos. A colonização de novas regiões também pode criar novos ambientes e pressões seletivas, resultando na seleção de novas linhagens ou clones.

A pluralidade genética no gênero *Leishmania* é importante para entender a estrutura populacional, a propagação e a adaptação desses parasitas em diferentes ambientes e hospedeiros. O estudo da reprodução assexuada e sexual nos parasitas é fundamental para desenvolver estratégias de prevenção e controle eficazes. Compreender esses aspectos é crucial para o desenvolvimento de melhores estratégias de controle e tratamento das doenças causadas por *Leishmania*.

As técnicas moleculares desempenham um papel importante na avaliação da diversidade genética das espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose visceral, fornecendo informações sobre a estrutura populacional e a propagação desses parasitas. As técnicas mais utilizadas nesse contexto são a RFLP, a MLST e a MLMT. Essas técnicas permitem obter uma visão mais clara da dinâmica populacional das *Leishmania* e ajudam a identificar estratégias de prevenção e tratamento das doenças causadas por esses parasitas.

## 8. REFERÊNCIAS

1. ABADÍAS-GRANADO, I et al. **Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis**. 2021.
2. Albuquerque, Marli et al. **Resenha histórica da leishmaniose**. 1996. Internet, Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica-Fiocruz.
3. ALAM, Mohammad Zahangir et al. **Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetic homogeneity of Leishmania donovani strains in the Indian subcontinent**. 2009.
4. ALAM, M.Z.; BHUTTO, A.M.; SOOMRO, F.R.; BALOCH, J.H. et al. **Population genetis of Leishmania (Leishmania) major DNA isolated from cutaneous leishmaniasis patients in Pakistam based on multilocus microsatellite typing**. Parasites vectors, v.7, p.332, 2014.doi: 10.1186 / 1756-3305-7-332.
5. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence**. PLoS ONE. (2012); 7(5): e35671. pmid:22693548
6. Akhoundi, Mohammad; et al. **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies**. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2016.
7. AKHOUNDI, Mohammad; KUHLS, Katrin; CANNET, Arnaud; VOTYPKA, Jan; MARTY, Pierre; DELAUNAY, Pascal; SERENO, Denis. **Uma Visão Histórica da Classificação, Evolução e Dispersão de Leishmania Parasitas e flebotomíneos**. 2016.
8. Ambrosio A. R., Bavia L., Hiraiwa P. M., Tirado T. C., Figueiredo F. B., de Messias-Reason I. J. (2021). **The lectin pathway of complement and the initial recognition of leishmania infantum promastigotes** . Life Sci. 282, 119793. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119793
9. ANDRADE, M. S., et al. **Sandfly fauna in a military training área endemic for American tegumentary leishmaniasis in the Atlantic Rain Forest region of Pernambuco, Brazil**. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p. 1761-1767, Nov/Dez. 2005.

10. Andrade J. M., Gonçalves L. O., Liarte D. B., Lima D. A., Guimarães F. G., de Melo Resende D., et al. . (2020). **Comparative transcriptomic analysis of antimony resistant and susceptible leishmania infantum lines**. Parasit. Vectors 13 (1), 600. doi: 10.1186/s13071-020-04486-4
11. Aoun K, Bouratbine A, Harrat Z, Guizani I, Mokni M, et al. (2000). **Epidemiologic and parasitologic data concerning sporadic cutaneous leishmaniasis in northern Tunisia**. Bull Soc Pathol Exot. 93: 101–103
12. Aoun K, Bouratbine A, Harrat Z, Belkard M, Bel Hadj Ali S (2001). **Particular profile of the zymodemes of Leishmania infantum causing visceral leishmaniasis in Tunisia**. Bull Soc Pathol Exot. 94: 375–377
13. Aragão, Henrique. **Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo Phlebotomus intermedius**. O Brasil Médico, 36, p. 129. 1922.
14. A SCHRIEFER, *et al.* **Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis**. 2004.
15. Assis, T. S. M. D., Braga, A. S. D. C., Pedras, M. J., Barral, A. M. P., Siqueira, I. C. D., Costa, C. H. N & Rabello, A. (2008). **Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana**. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 17(2), 107-116.
16. BACHTROG, Doris. **Adaptation shapes patterns of genome evolution on sexual and asexual chromosomes in Drosophila**. 2003.
17. ALVARENGA, Janaína Sousa Campos *et al.* **KDNA Genetic Signatures Obtained by LSSP-PCR Analysis of Leishmania (Leishmania) infantum Isolated from the New and the Old World**. 2012.
18. AVISE, John C.. **Evolutionary perspectives on clonal reproduction in vertebrate animals**. 2015.
19. Badaró, R., & Duarte, M. I. S. **Leishmaniose visceral:(Calazar). Veronesi: tratado de Infectologia**. 2002.
20. BARRETO, Danielle Cristina dos Santos. **Uma trajetória familiar na ciência: Evandro Chagas (1905-1940) e o estudo das endemias rurais no Brasil**. 2012. Dissertação (Mestrado em História das Ciências e da Saúde) - Casa de Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2012.

21. BAÑULS, Anne-Laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck. **Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans**. 2007.
22. BENSOUSSAN, E., et al. **Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis**. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 44, n. 4, p. 1435– 1439, Apr. 2006.
23. BERGMANN, J.O. **Acurácia da qPCR associada ao cultivo no meio Novy-MacNealNicolle no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana**. 2019. 89f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Brasília. Brasília.2019.
24. BINNECK, Eliseu; NEDEL, Jorge Luiz; A DELLAGOSTIN, Odir. **Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil?** 2002.
25. BANULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. **Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans**. Adv. Parasitolm, v. 64, p.1–109, 2007.doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3.
26. BRANDÃO-FILHO, S P *et al.* **Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil**. 1999.
27. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso 43 eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 189 p.; 2017
28. BRITO, M. E. F., et al. **Identification of potentially diagnostic Leishmania braziliensis antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis**. Clinical and diagnostic laboratory immunology, Washington, v. 7, n. 2, p. 318-321, Mar. 2000.
29. BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. **The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion**. International Journal of Parasitology, Oxford, v.28, n.1, p.121-134, Jan. 1998.
30. BROOKER, Robert L. **Principles of Biology**. 2015.

31. BULLE, B. et al. **Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis**. Journal of Clinical Microbiology, 40: 3.391-3.397, 2002.
32. BUSSOTTI, Giovanni *et al.* ***Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification**. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.01399-18>.
33. LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OF PUBLIC HEALTH CONCERN (United States). Centers For Disease Control And Prevention. **Parasites - Leishmaniasis**. 2020.
34. CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; CASTRO, G. O.; FERREIRA, L. C.; ROMANA, C. **Leishmaniose visceral Americana. Nova entidade morbida do homem na América do Sul**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 32, n. 3, p. 321-480, 1937.
35. Chargui N, Amro A, Haouas N, Schoïnian G, Babba H, et al. (2009). **Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations**. Int J Parasitol 39: 801–811
36. Chicharro C, Morales M A, Serra T, Ares M, Salas A, et al. (2002). **Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic tools**. Trans R Soc Trop Med Hyg 96: 93–99
37. Christodoulou V, Antoniou M, Ntais P, Messaritakis I, Ivovic V, Dedet JP, Pratlong F, Dvorak V, Tselentis Y: **Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete**. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012, 12 (3): 214-222. 10.1089/vbz.2011.0004.
38. CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., **comps. *Leishmanioses do continente americano*** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, 511 p. ISBN 978-85-7541-568-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415689>.
39. COLER, R. N., REED, S. G. **Second-generation vaccines against leishmaniasis**. TRENDS in Parasitology, Oxford, v. 21, n. 5, p. 244-249, May. 2005.

40. COUTINHO, Carlos Eduardo Ribeiro. **Avaliação da variabilidade fenotípica de amostras de Leishmania (Leishmania) chagasi isoladas de cães oriundos de duas áreas endêmicas de leishmaniose visceral no Brasil.** 2010.
41. CUPOLILLO, E *et al.* **Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania.** 1995.
42. CUPOLILLO, E. *et al.* **A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*.** *Parasitology Today*, 16: 142-144, 2000.
43. CUPOLILLO, Elisa *et al.* **Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil.** 2003.
44. DA-CRUZ, A. M., *et al.* **T-cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Washington, v. 9, n. 2, p. 251-256, Apr. 2002.
45. Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. **Distribuição espacial da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil.** *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(Supl 1):411-2.
46. DÁVILA, A. M. R.; MOMEN, H.. **Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within Leishmania.** 2000.
47. DEANE, Maria Paumgarten; DEANE, Leônidas M. **Observações sobre a transmissão da leishmaniose visceral no Ceará.** *O Hospital*, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 347-362, set. 1955.
48. DEANE, Leônidas de Mello. **Epidemiologia e profilaxia do calazar americano.** *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 431-444, 1958.
49. DEDET, J.-P. (2002). FARRELL, J., **ed. Leishmania.** [S.l.]: Springer. 193 páginas. ISBN 9781402070365
50. DEDET, J.-P. ;PRATLONG, F. (2009). COOK, G.C.; ZUMLA, A.L., **ed. Manson's Tropical Diseases 22 ed.** [S.l.]: Saunders
51. Dengjel, B., M. Zahler, W. Hermanns, K. Heinritzi, T. Spillmann, A. Thomschke, T. Löscher, R. Gothe, and H. Rinder. 2001. **Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*.** *J. Clin. Microbiol.* 39:4495-4499.

52. Desjeux P. **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** Comparative Immunology, Microbiol. Infect. Dis. 2004; 27: 305-318.
53. Disch, J., Maciel, F. C., de Oliveira, M. C., Orsini, M., & Rabello, A. (2003). Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 97(4), 391-395.
54. DOWNING, T.; IMAMURA.; DECUYPERE, S. et al. **Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance.** Genome Res, v.21,n.12, p. 2143–2156, 2011. doi:10.1101/gr.123430.111.
55. ELFARI, M.; SCHNUR, L.F.; STRELKOV, A. M. et al. **Genetic and biological diversity among populations of *Leishmania major* from Central Asia, the Middle East and Africa.** Microbes Infect, v.7, n.1, p. 93-103, 2005.doi: 10.1016/j.micinf.2004.09.010.
56. FARASH, Bibi Razieh Hosseini *et al.* **Cloning of K26 Hydrophilic Antigen from Iranian Strain of *Leishmania infantum*.** 2017
57. FARASH, Bibi Razieh Hosseini *et al.* **Changes in the Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Northeastern Iran.** 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6137>.
58. Felsenstein. J, PHYLIP (Phylogeny inference package) v. 3.6 **Distributed by the author.** Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 2004
59. FERROGLIO, E. et al. **Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 100, p. 636–641, 2006.
60. FRAGA, Jorge *et al.* **Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene.** 2019.
61. FRANSSSEN, Susanne U.; TAKELE, Yegnasew; ADEM, Emebet; SANDERS, Mandy J.; MÜLLER, Ingrid; KROPF, Pascale; COTTON, James A.. **Diversity and Within-Host Evolution of *Leishmania donovani* from Visceral Leishmaniasis Patients with and without HIV Coinfection in Northern Ethiopia.** 2021.

62. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, v. 2, 5. ed., 16p., 2002.
63. GARCIA, A. L., et al. **American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism**. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 109-116, Mar. 2005.
64. Gelanew T, Kuhls K, Hurissa Z, Weldegebreal T, Hailu W, et al. (2010) **Inference of population structure of Leishmania donovani strains isolated from different Ethiopian visceral leishmaniasis endemic areas**. PLoS Negl Trop Dis 4: e889.
65. GOMES, R F *et al.* **Leishmania (Viannia) braziliensis: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD**. 1995.
66. Gontijo, C. M. F., & Melo, M. N. (2004). **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas**. Revista Brasileira de epidemiologia, 7, 338-349.
67. GRIMALDI JUNIOR, G; TESH, R B; MCMAHON-PRATT, D. **A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World**. 1989.
68. GOUZELOU, Evi *et al.* **Genetic diversity and structure in Leishmania infantum populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis**. 2013.
69. Guizani I, Dellagi K, Ben Ismail R (2002). **Random amplified polymorphic DNA technique for identification and differentiation of old world Leishmania species**. Am J Trop Med Hyg. 66: 152–156
70. HAMARSHEH, O.; PRESBER, W.; YAGHOobi-ERSHADI, M.R. *et al.* **Population structure and geographical subdivision of the main vector of Leishmania, Phlebotomus papatasi, revealed by microsatellite variation**. Med Vet Entomol, v. 23, n.1, p. 69–77, 2009.doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00784.x.
71. HAJJARAN, H. *et al.* **Direct diagnosis of Leishmania species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP**. Journal of clinical laboratory analysis, v. 25, p. 20–4, 2011.

72. Haralambous C, Antoniou M, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K: **Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani*/*Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2008, 60 (1): 33-42.  
10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.019.
73. Herrer A, Christensen HA. **Implication of Phlebotomus Sand Flies as Vectors of Bartonellosis and Leishmaniasis as Early as 1764.** Science 190 (4210): 154-155, 1975.
74. HERRERA, Giovanni *et al.* **Evaluation of a Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme for Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) panamensis in Colombia.** 2017..
75. HIDE, M *et al.* **Genetic heterogeneity and phylogenetic status of Leishmania (Leishmania) infantum zymodeme MON-1: epidemiological implications.** 2001.
76. HOLZMULLER, P., BRAS-GONÇALVES, R., LEMESRE, J. R. **Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in Leishmania.** Parasitology, London, v. 132, p. S19-S32, 2006.
77. IBIAPINA, Andressa Barros *et al.* **Evidence map of diagnosis, treatment, prognosis, prevention, and control in visceral leishmaniasis.**
78. IMAMURA, H.; DOWNING, T.; VAN DEN BROECK, F. *et al.* **Evolutionary genomics of epidemic visceral Leishmaniasis in the Indian subcontinent.** Elife, v. 5:e12613 2016, 2016. doi: 10.7554/eLife.12613
79. IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WHORTHEY, E.A. *et al.* **The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major.** Science, v.309,n.5733,p.436–442,2005 doi: 10.1126/science.1112680
80. J.A. Rioux, G. Lanotte, E. Serres, F. Pratlong, P. Bastien, J. Perieres, **Taxonomy of Leishmania, use of isozymes. Suggestions for a new classification,** Ann. Parasitol. Hum. Comp. 65 (1990) 111e125
81. KAR, K. **Serodiagnosis of leishmaniasis.** Critical Reviews in Microbiology, Boca Raton, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.
82. KATO, Hiroto *et al.* **Prevalence of Genetically Complex Leishmania Strains With Hybrid and Mito-Nuclear Discordance.** 2021.

83. KERR, S. F. **Palaeartic origin of Leishmania**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95: 75-80, 2000.
84. Kern, Sara. **Paleartic origin of leishmania**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95:1, pp. 75-80. 2000.
85. KHAN, Md Gulam Musawwir *et al.* **Comparison of PCR-based diagnoses for visceral leishmaniasis in Bangladesh**. 2014.
86. Krzeminski W, Krzeminska E. **Triassic Diptera: descrições, revisões e relações filogenéticas**. Acta Zool Cracóvia. 2003; 46: 153–184.
87. KUHLS, Katrin *et al.* **Differentiation and Gene Flow among European Populations of Leishmania infantum MON-1**. 2008.
88. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Maurício IL, *et al.* (2011). **Comparative microsatellite typing of New World Leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin**. Plos Negl Trop Dis 5: e1155.
89. Kumar R, Goto Y, Gidwani K, Cowgill KD, Sundar S, Reed SG. **Evaluation of Ex Vivo Human Immune Response Against Candidate Antigens for a Visceral Leishmaniasis Vaccine**. Am J Trop Med Hyg (2010) 82:808–13. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0341
90. K.W. Quispe Tintaya, X. Jing, J.-P. Dedet, S. Rijal, X. De Bolle, J.C. Dujardin. **Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the Leishmania donovani complex**. J. Infect. Dis. 189 (2004) 1035e1043.
91. Lainson R, Shaw jj. **New World leishmaniasis**,. In: COX FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topey & Wilson's Arnold. Microbiology and Microbial Infections, Parasitology, London, Sydney, Auckland;. P.313-349; 2005.
92. Lainson, R., Shaw, JJ (1987) **Evolução, classificação e distribuição geográfica**. In: W Peters, R Killick-Kendrick, editores. The Leishmaniasis in Biology and medicine, Academic Press, Londres, p. 1–120
93. LEITE CEA. **Leishmaniose Visceral Humana em Pernambuco: Epidemiologia e Gastos com Internações Hospitalares**. [dissertação]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

94. MAHNAZ, T.; AL-JAWBREHJ, A.; KUHLS, K.; SCHONIAN.; G. **Microsatellite typing in multiple focus shows three different *Leishmania major* genetic clusters in Iran**. *Microbes Infect*, v. 13, n.11, p. 937–942, 2011. doi: 10.1016/j.micinf.2011.05.005
95. MARFURT, J. *et al.* **Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46: 115-124, 2003
96. MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. **Leishmaniose visceral no Brasil**. 2013.
97. Marques, N., Cabral, S., Sá, R., Coelho, F., Oliveira, J., Saraiva da Cunha, J. G., & Melo-Silvestre, A. (2007). **Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana na era da terapia anti-retrovírica de alta eficácia**.
98. Marty, P. & Rosenthal, E. (2002). **Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices**. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 3(8), 1101-1108.
99. MÉDICOS SEM FRONTEIRAS (org.). **Leishmaniose Visceral (calazar)**. 2022.
100. MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marques; VITOR, Ricardo W. Almeida (comp.). **Parasitologia humana**. 2005. 11ª edição.
101. M.E. Ibrahim, D.C. Barker. **The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence**, *Inf. Gen. Evol.* 1 (2001) 61e68.
102. MICHALSKY, Érika Monteiro *et al.* **Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotomíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2011.
103. MILES, M. A. *et al.* **The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future**. *Parasitology*, 136: 1.509-1.528, 2009.
104. MONGE-MAILLO, Begoña *et al.* **Anfotericina B liposomal en el tratamiento de la leishmaniasis visceral**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2021.04.002>.

105. MONTALVO, A.M.; et al. **Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World.** Parasitology, v.137, p.1159-1168, 2010.
106. MORRIS J.C.; DREW, M.E.; KLINGBEIL, M.M.; MOTYKA, S.A. et al. **Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium.** Int. J. Parasitol, v.31, n.5-6, p. 453– 458, 2001.
107. MKADA–DRISS, Imen *et al.* **Screening and Characterization of RAPD Markers in Viscerotropic Leishmania Parasites.** 2014.
108. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Sinan/Svs/Ms (comp.). **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral.** 2021.
109. MIRAHMADI, Hadi *et al.* **Detection of species and molecular typing of Leishmania in suspected patients by targeting cytochrome b gene in Zahedan, southeast of Iran.** 2018.
110. Mohebbali M. (2013). **Visceral leishmaniasis in Iran: Review of the epidemiological and clinical features.** Iran J Parasitol, 8(3):348–58
111. MOMEN, H. Parasite characterization by zimodeme analysis. *In*: MOREL, C. (Ed.). **Genes and Antigens of Parasites: a laboratory manual.** Geneva: UNDP, World Bank, WHO, 1984. (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases / FINEP / CNPq / Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil).
112. MORITZ, Rebecca L.; WELCH, Rodney A.; ANALYSIS, Formal. **The Escherichia coli argW-dsdCXA Genetic Island Is Highly Variable, and E. coli K1 Strains Commonly Possess Two Copies of dsdCXA.** 2006.
113. NEVES, D.P. (2001). **Parasitologia Humana 11 ed.** [S.l.]: Atheneu. 518 páginas. ISBN 8573797371
114. Neves, D. P., Melo, A. L., Linardi, P. M., & Vitor, R. W. A. **Parasitologia Humana.** Atheneu. Organização Mundial da Saúde. (2011). Status de endemidade da leishmaniose visceral, em todo o mundo.
115. NETTO, Arlindo Ugulino. **Parasitologia: Leishmaniose.** 2016. Disponível em: [https://www.academia.edu/16304782/NETTO\\_Arlindo\\_Ugulino\\_PARASITOLOGIA](https://www.academia.edu/16304782/NETTO_Arlindo_Ugulino_PARASITOLOGIA).

116. Nimri, L. F., I. N. S. Moura, L. Huang, C. Del Rio, D. Rimland, J. S. Duchin, E. M. Dotson, and C. B. Beard. 2002. **Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* based on variation in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes.** *J. Clin. Microbiol.* 40:1146-1151.
117. ODDONE, Rolando *et al.* **Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of Leishmania (Viannia) species.** 2009.
118. OLIVEIRA, Janaina Michelle de *et al.* **Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais.** 2010.
119. OLIVEIRA, Fernanda Müller de. **SELEÇÃO IN SILICO DE SEQUÊNCIAS DE DNA ESPÉCIE-ESPECÍFICAS DE Leishmania.** 2015.
120. OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas.** 2020.
121. Organização Pan-Americana da Saúde. **Sistema de Informação Regional de Leishmanioses nas Américas (SisLeish).** Washington, DC: OPAS; 2022
122. OZIAS-AKINS, Peggy *et al.* **Clonal Reproduction through Seeds in Sight for Crops.** 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.12.006>.
123. Pastorino, A. C., Jacob, C., Oselka, G. W., & Carneiro-Sampaio, M. (2002). **Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais.** *Jornal de Pediatria*, 78, 120-127.
124. PEACOCK CS, SEEGER K, HARRIS D, M. *et al.* **Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease.** *Nat Genet*, v.39,n.7, p.839-47, 2007. doi: 10.1038/ng2053
125. PENA, S. D. *et al.* **Sequence-specific “gene signatures” can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 1.946-1.949, 1994.
126. PEREIRA E.F. A. *et al.* Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Paraná state of southern Brazil, **Experimental Dermatology**, v. 17, n.12, p 1024-1030, 2008.
127. Pessoa, Samuel Barnsley. **Parasitologia médica.** 1958 5a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. Disponível em: <https://koha.inpa.gov.br/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=12156..>

128. PRADHAN, S *et al.* **Treatment options for leishmaniasis.** 2022.
129. Prugnotte F, De Meeus T (2010) **Aparente alta taxa de recombinação em organismos parasitas clonais devido ao desenho de amostragem inadequado.** Hereditariade 104: 135–140
130. Reale S, Lupo T, Migliazzo A, Di Mauro C, Cipri V, et al. (2010). **Multilocus microsatellite polymorphism analysis to characterize Leishmania infantum strains isolated in Sicily.** Transbound Emerg Dis 57: 37–41
131. RODRIGUES, A. M., et al. **Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de melgumina.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-145, Mar/Apr. 2006.
132. RAMÍREZ, Juan David; LLEWELLYN, Martin s. **Reproductive clonality in protozoan pathogens--truth or artefact?** 2014.
133. REAL, F.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F. et al. **The genome sequence of Leishmania (Leishmania) amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models.** DNA Res, v.20, n.6, p.567-581, 2013. doi: 10.1093 / dnares / dst031
134. REIS, L. C., et al. **Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana.** Revista de Patologia Tropical, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 103-115, Maio/Ago. 2006.
135. REQUENA, J.M; CHICHARRO, C.; GARCÍA, L.; PARRADO, R.; PUERTA, C.J.; 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, v.5, p.87, 2012
136. REY, L. (1991). REY, L. (ed.), ed. **Parasitologia 2 ed.** Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan. pp. 182–192
137. ROGERS, K. A., et al. **Type 1 and type 2 responses to Leishmania major.** FEMS Microbiology Letters, Oxford, v. 209, n. 1, p. 1-7, Mar. 2002.

138. ROGERS, M. B.; HILLEY, J.D.; DICKENS, N.J. et al. **Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania***. *Genome Res*, v. 21, n. 12, p. 2129-2142, 2011. doi: 10.1101/gr. 122945.111.
139. ROUGERON, Virginie *et al.* **Multifaceted Population Structure and Reproductive Strategy in *Leishmania donovani* Complex in One Sudanese Village**. 2011.
140. ROUGERON, V *et al.* **Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic exchange**. 2016.
141. Rousset F (2004) **Estrutura Genética e Seleção em Populações Subdivididas**. Princeton: Princeton University Press.
142. SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. **PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.47, p.349-358, 2003.
143. SCHÖNIAN, Gabriele *et al.* ***Leishmaniases* in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology**. 2008. *Trends Parasitol* 24: 135–142
144. SCHÖNIAN, G; KUHLS, K; MAURICIO, I L. **Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania***. 2011.
145. SCHWENKENBECHER, J.M.; WIRTH, T.; SCHNUR, L.F. et al. **Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica***. *Intern J Parasitol*, v.36, n.2, p. 237-246, 2004.doi: 10.1016/j.ijpara.2005.09.010.E.
146. SCHWENKENBECHER, J. M. *et al.* **Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica***. *International Journal for Parasitology*, 36: 237-246, 2006.
147. SCHONIAN, G.; MAURICIO, I.; GRAMICCIA, M. et al. ***Leishmaniases* in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology**. *Trends Parasitol*, v.24, n. 3, p. 135-42, 2008. doi:10.1016/j. p. 2007.12.006.
148. SEGATTO, Marcela; LEMOS, Elenice Moreira. **Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil**. 2012. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 39–47.

149. Selvapandiyan A, Dey R, Gannavaram S, Lakhali-Naouar I, Duncan R, Salotra P, et al. . **Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites**. J Trop Med (2012) 2012:631460. doi: 10.1155/2012/631460
150. Silva DF, Vasconcelos SD. A ten year (1990-1999) **survey on leishmaniasis incidence in Pernambuco State, Northeastern Brazil**. *Rev Patol Trop*. 2003;32(1):53-61.
151. SILVA, Soraia de Oliveira *et al*. **Leishmania sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as Leishmania major-like**. 2009
152. SILVA, L.A.; DE SOUSA, C. D. S.; DA GRAÇA, G.C.; 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**. Infection, Genetics and Evolution, v. 10, p. 77-83, 2010.
153. SILVA, S. O. *et al*. **Leishmania sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as Leishmania major-like**. *Acta Tropica*, 112: 239-248, 2009.
154. SILVA, Karolyne Botelho Marques *et al*. **ANÁLISE ESPACIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE PALMAS, TOCANTINS, BRASIL**. 2017.
155. SMITH, D. F.; PEACOCK, C.S.; CRUZ, A.K. **Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniases**. Int J Parasitol, v.37, n.11, p. 1173–1186, 2007. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.05.015.
156. SREENIVAS, G. *et al*. **Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) as a tool for genetic diversity and epidemiological studies of Leishmania spp**. 2013.
157. Sun K, Guan W, Zhang JG, Wang YJ, Tian Y, et al. (2012). **Prevalence of canine leishmaniasis in Beichuan County, Sichuan, China and phylogenetic evidence for an undescribed Leishmania sp. in China based on 7SL RNA**. Parasit Vectors 5: 75
158. Sundar, S., & Rai, M. (2002). **Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis**. Clinical and vaccine immunology, 9(5), 951-958.

159. SUNTER, Jack; GULL, Keith. **Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding.** 2017.
160. TALMI-FRANK, D. et al. **Detection and identification of old world leishmania by high resolution melt analysis.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 4, p. 4–8, 2010.
161. GELANEW, Tesfaye *et al.* **Multilocus sequence and microsatellite identification of intra-specific hybrids and ancestor-like donors among natural Ethiopian isolates of Leishmania donovani.** 2014.
162. TIBAYRENÇ, Michel; AYALA, Francisco J. **Leishmaniae o Modelo de Evolução Clonal Predominante.** 2021.
163. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012). **Crescimento microbiano.** Microbiologia. 10a ed. Porto Alegre: Artmed, 156-83.
164. Van den Broeck, F., Maes, I., & De Meeûs, T. (2019). **How clonal is clonal evolution in Trypanosomatidae?** Trends in Parasitology, 35(6), 432-442.
165. VEASEY, John Verrinder *et al.* **Identification of Leishmania species by high-resolution DNA dissociation in cases of American cutaneous leishmaniasis.** 2020.
166. VOLPEDO, Greta *et al.* **Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development.** 2021.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.748325>
167. World Health Organization. **Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control. Geographical distribution.** 2005. WHO/CTD.
168. YARDLEY, V., et al. **American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility?** The Journal of Infectious Diseases, Chicago, v. 194, n. 8, p. 1168-1175, Oct. 2006.
169. Young DG, Duncan MA. **Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae).** Mem Amer Inst Entomol 54, Associate Publishers, Gainesville, 1994; 881 pp.
170. Zeibig, E. **Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínico-laboratorial.** Elsevier Brasil. 2014.

171. Zemanová E, Jirku° M, Mauricio IL, Miles MA, Lukes J (2004). **Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin.** Am J Trop Med Hyg. 70: 613–617