



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DA GENÉTICA POPULACIONAL DA *Leishmania (Viannia) braziliensis* ISOLADA DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM CORTE DE PEDRA.**

**Ana Isabelle Pinheiro da Mota Araújo**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2015**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.**

A663 Araújo, Ana Isabelle Pinheiro da Mota

Avaliação da genética populacional da *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolada de casos de leishmaniose tegumentar americana em Corte de Pedra/Ana Isabelle Pinheiro da Mota Araújo. – Salvador, 2015.

98 f.

Orientador: Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Faculdade de Medicina da Bahia, 2015.

1. Leishmania. 2. População da Genética 3. Leishmaniose.  
4. Escola Pública. I. Silva, Nicolaus Albert Borges. II.  
Universidade Federal da Bahia. III. Título

CDU 616.928.5



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**



---

**AVALIAÇÃO DA GENÉTICA POPULACIONAL DA *Leishmania (Viannia) braziliensis* ISOLADA DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM CORTE DE PEDRA.**

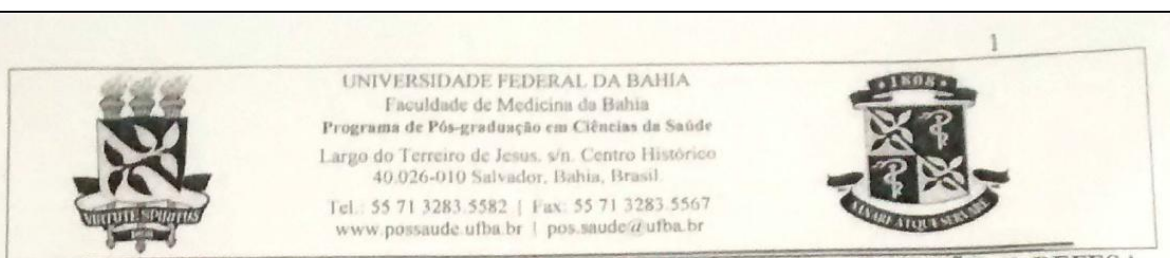
**Ana Isabelle Pinheiro da Mota Araújo**

**Professor-orientador: Nicolaus Albert B. Schriefer**

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Epidemiologia Molecular.

**Salvador (Bahia), 2015**

## COMISSÃO EXAMINADORA



**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.**

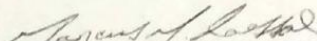
1 Aos 27 dias do mês de fevereiro de 2015, no horário das 09:00 horas, nas dependências do  
 2 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da  
 3 Universidade Federal da Bahia, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da  
 4 dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DA *Leishmania*  
 5 *braziliensis* ISOLADAS DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA  
 6 EM CORTE DE PEDRA" apresentada pela pós-graduanda **Ana Isabelle Pinheiro da Mota**  
 7 **Araújo**. A Comissão Examinadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em  
 8 Ciências da Saúde, conforme o que estabelecem o Regulamento Geral dos Cursos de Pós-  
 9 Graduação da Universidade Federal da Bahia e o Regimento do Programa de Pós-graduação em  
 10 Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por: Prof. Dr. Marcus  
 11 Miranda Lessa, Doutor em Otorrinolaringologia – UFBA (Presidente); Prof. Dr. Ricardo Riccio  
 12 Oliveira, Doutor em Imunologia – FIOCRUZ/BA; Prof. Dr. Milton Ozório Moraes, Doutor em  
 13 Biologia Celular e Molecular – FIOCRUZ/RJ e Prof. Dr. Nicolaus Albert Schriefer, Doutor em  
 14 Imunologia – UFBA (suplente). Após a apresentação da dissertação, a Comissão Examinadora  
 15 realizou a arguição que foi respondida SATISFATORIAMENTE (satisfatoriamente ou  
 16 insatisfatoriamente) pela mestrand. A dissertação apresentada foi considerada  
 17 APROVADA (aprovada ou reprovada). E, para constar do processo de conclusão de  
 18 curso e de colação de grau<sup>1</sup>, a Comissão Examinadora lavrou a presente Ata que é assinada por  
 19 todos os seus membros. A Comissão Examinadora aprova a dissertação:

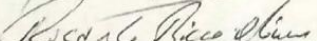
20  Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da dissertação.

21  Sem recomendações de modificações da versão final.

22 **Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser**  
 23 **concluído o processo de outorga do título de mestre.**

24 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

25  Marcus Miranda Lessa (Presidente)

26  Ricardo Riccio Oliveira

27  Milton Ozório Moraes

28  Nicolaus Albert Schriefer (Suplente)

29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34 Ata Aprovada na Sessão do dia 27/02/2015

35 <sup>1</sup> A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do  
 36 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, de quatro exemplares impressos da dissertação,  
 37 acompanhados de 2 versões completas em meio eletrônico (formato pdf) no **prazo máximo de 60 dias**.

“Vocês jovens, médicos e cientistas do futuro, não se deixem esmorecer pela barreira do ceticismo, nem desanimar pela tristeza de certos momentos que caem sobre uma nação”. Não se enraiveçam com seus oponentes, porque nenhuma teoria científica foi aceita sem oposição. Habitem a paz serena das bibliotecas e laboratórios. Digam para si mesmos, primeiro: ' - O que fiz por minha instrução? ' E à medida que avançarem: '- O que estou realizando? ' Até chegar o momento em que possam sentir a imensa felicidade de pensar que contribuíram de alguma forma, para o progresso e bem-estar da Humanidade.

(Louis Pasteur)

Dedico este trabalho aos meus pais, Bia e Renato, aos meus irmãos Renan Pinheiro e Hosana, aos meus tios Adélia e Druso, as minhas cunhadas Bruna Bomfim e Iukary Takenami, a minha sogra Nely e meu sogro Akiriro, aos meus afilhados Aulus, Alice e Karina Takenami, a Fulvia, aGúbio, a minha amiga Carine Almeida e por fim ao meu esposo Iugo Takenami.

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia.
- Complexo do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES), Serviço de Imunologia (SIM).

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. *National Institute of Health* NIH Grant AI-30639
2. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais
3. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia- FAPESB



## AGRADECIMENTOS

A Dr. Albert Schriefer, minha gratidão por ter dado uma excelente oportunidade e por ser um grande exemplo de pesquisador, líder, orientador e além do mais um grande amigo, sempre ajudando e passando o seu imenso conhecimento relacionado à genética.

Ao Dr. Edgar Carvalho, pela confiança e por ter-me aberto às portas do Serviço de Imunologia.

A equipe médica que dá suporte clínico na área endêmica. Gostaria de registrar o nome de Luiz Henrique Guimarães, pela amizade e proximidade.

A toda equipe do Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos, de maneira especial, a Maria Luiza Dourado pelos momentos de estudo, incentivo e hoje uma grande amiga, a Juliana Almeida, a Lilian Medina e Pollyana Primo por ter me ajudado na prática, Bruno e Viviane Magalhães.

Não poderei esquecer-me de Dr. Angela, Dr. Léa, Dr. Kátia pela paciência no momento de passar conhecimento.

Agradeço também a Cristiano, Orlando, Elisângela, Dorival, Luiza e Dilma pela amizade.

Não posso esquecer-me de Lucas Almeida que nunca negou uma ajuda. Obrigada. Também Aline Muniz, Tarcísio, Diego, Michael Macedo, Jamile, Cristiane, Joyce e Liliane e pela descontração e aprendizado.

A Adriano Queiroz que mesmo longe me ajudou a todo instante. Você foi muito importante nessa caminhada.

Aos funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra, por atenderem às solicitações do nosso grupo de maneira tão colaborativa.

Aos pacientes da área endêmica, por nos receberem em seus lares e colaborarem com a nossa pesquisa de forma tão generosa.

A todos, obrigada pela a oportunidade e pelos novos conhecimentos que foram adquiridos.

# ÍNDICE

Lista de Abreviaturas

Índice de tabelas

Índice de figuras

<b>I. Resumo</b>	15
<b>II. Objetivos</b>	17
<b>II. 1. Geral</b>	17
<b>II. 2. Específicos</b>	17
<b>III. Introdução</b>	18
<b>IV. Revisão da literatura</b>	22
<b>IV. 1. Epidemiologia e aspectos clínicos da leishmaniose</b>	22
<b>IV. 2. Classificação e ciclo biológico da <i>Leishmania</i></b>	24
<b>IV. 3. Genoma da <i>Leishmania</i></b>	26
<b>IV. 4. Genética de populações</b>	26
<b>IV. 4. 1. Heterozigosidade</b>	26
<b>IV. 4. 2. Equilíbrio de Hardy Weinberg</b>	27

<b>IV. 4. 3.</b> Índice de fixação populacional (FST)	27
<b>IV. 4. 4.</b> Polimorfismo	28
<b>IV. 5</b> Epidemiologia molecular e marcadores polimórficos da <i>L. (V.) braziliensis</i> de CP	29
<b>IV. 6.</b> Estado atual da compreensão sobre a genética e dinâmica populacional do gênero da <i>Leishmania</i>	30
<b>V Hipótese</b>	32
<b>VI Justificativa</b>	33
<b>VII. Casuística, material e métodos.</b>	34
<b>VII. 1.</b> Desenho do estudo	34
<b>VII. 2.</b> Área de estudo	35
<b>VII. 3.</b> População de estudo	35
<b>VII. 4.</b> Definição de casos ( <i>i.e</i> forma clínica de Ita recrutada)	36
<b>VII. 5.</b> Amostra	36
<b>VII. 6.</b> Obtenção e estoques dos isolados parasitários e estoque de DNA genômico de <i>L. (V.) braziliensis</i>	36
<b>VII. 6. 1.</b> Extração e estoque do DNA genômico da <i>L. (V.) braziliensis</i>	37
<b>VII. 6. 2.</b> Determinação da espécie de <i>leishmania</i> por PCR em tempo real	38
<b>VII. 6. 3.</b> Amplificação dos <i>loci</i> por PCR	38
<b>VII. 6. 4.</b> Clonagem dos <i>loci</i> parasitários amplificados por PCR	39
<b>VII. 6. 5.</b> Extração de DNA plasmidial das <i>Escherichia Coli</i> recombinantes	40

<b>VII. 6. 6.</b> Seleção de plasmídeos recombinantes por análise com endonuclease de restrição	41
<b>VII. 6.7.</b> Sequenciamento e alinhamento das sequências obtidas para cada <i>locus</i> e identificação dos sítios polimórficos	42
<b>VII. 7.</b> Definição de haplótipos e genótipos	42
<b>VIII. Resultados</b>	46
<b>IX. Discussão</b>	63
<b>X. Perspectivas de estudo</b>	67
<b>XI. Conclusões</b>	68
<b>XII. Referências Bibliográficas</b>	69

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CP-** Corte de Pedra

**CHR-** Cromossomo

**DMSO-** Dimetilsulfóxido

**ddNTP-** didesoxinucleotídeo trifosfato

**EDTA-** ácido etilenodiamino tetra-acético

**EHW-** Equilíbrio Hardy-Weinberg

**LTA-** Leishmaniose Tegumentar Americana

**LC-** Leishmaniose Cutânea

**LM-** Leishmaniose Mucosa

**LD-** Leishmaniose Disseminada

**LiCl-** cloreto de lítio

**mM -** milimol

**NaOH-** Hidróxido de sódio

**PCR-** Reação de Cadeia de polimerase

**RAPD-** Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

**SNP-** Sítio de Nucleotídeo Polimórfico

**TBE-**Tris/Borato/EDTA

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Alelos e genótipos encontrados no CHR 28/425451 das <i>L. (V.) braziliensis</i> da amostra B	46
<b>Tabela 2-</b> Frequências alélicas e genotípicas do CHR 28/425451 dos isolados das amostras A e B	49
<b>Tabela 3-</b> Frequências observadas e esperadas do CHR 28/425451 dos isolados das amostras A e B	50
<b>Tabela 4.</b> Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra A	50
<b>Tabela 5.</b> Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra B	50
<b>Tabela 6-</b> Heterozigosidade observada e esperada do CHR 28/425451 da amostra A e B.	51
<b>Tabela 7:</b> Valores do FST das amostras A e B e entre as formas clínicas	52
<b>Tabela 8-</b> Alelos e genótipos encontrados no CHR 24/3074 da amostra B	55
<b>Tabela 9-</b> - Frequências alélicas e genotípicas do CHR 24/3074 dos isolados das amostras A e B	58
<b>Tabela 10-</b> Frequências observadas e esperadas do CHR 24/3074 dos isolados das amostras A e B	59
<b>Tabela 11.</b> Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra A	59
<b>Tabela 12.</b> Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra B	59
<b>Tabela 13-</b> Heterozigosidade observada e esperada do CHR 24/3074 da amostra A e B	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-** A taxonomia do gênero da *Leishmania*. (Fonte: WHO, 1990; Rioux et al., 1990; Lainson & Shaw, 1998) 24
- Figura 2:** Fluxograma ilustrativo do estudo 34
- Figura 3.** Mapa da área endêmica de Corte de Pedra, apresentada em verde. 35
- Figura 4:** Contagem dos alelos do CHR28/425451 ao longo do período de transmissão de *L. (V.) braziliensis* de 2008-2011 em CP 53
- Figura 5:** Contagens dos alelos do CHR 24/3074 ao longo do período de transmissão de *L. (V.) braziliensis* 2008-2011 em CP 54
- Figura 6:** Classificação cladística dos alelos encontrados no *locus* CHR24/3074 da *L. (V.) braziliensis* em CP. Árvore Neighbor Joining g (NJ) baseada nas sequências completas de cada alelo. 61

## I. RESUMO

A leishmaniose é uma doença que acomete regiões tropicais e subtropicais do globo. A doença esta entre as seis doenças infecciosas parasitárias de maior importância em saúde pública, apresentando-se de maneira endêmica em pelo menos 98 países. Cerca de 15 espécies de *Leishmania* são capazes de infectar o homem e causar a Leishmaniose Tegumentar Americana (ATL), dentre elas a *Leishmania (V.) braziliensis*, que é responsável pelas formas clínicas na região de Corte de Pedra (CP). São encontradas três formas clínicas de LTA em CP: LC (leishmaniose cutânea), LM (leishmaniose mucosa) e LD (leishmaniose disseminada), sendo esta forma emergente. Dentro os nossos objetivos foram: (1) avaliar se os genótipos dos *loci* do CHR24/3074 e CHR 28/425451 da *L. (V.) braziliensis* se apresentam em equilíbrio (Lei HW); (2) analisar os índices de heterozigosidade nesses *loci* e se eles variam de acordo com a origem clínica do isolado parasitário; (3) analisar se os índices heterozigosidade das amostras do período de 2008-2012 em relação ao período de 1992-2001; (4) avaliar a diferenciação (Fst) entre as populações e entre as subpopulações isoladas de diferentes formas de LTA; (5) avaliar a incidência dos genótipos dos *loci* CHR 28/425451 e CHR 24/3074. Neste estudo de corte transversal, duas amostras de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes de LTA foram exploradas, uma obtida entre 1992 e 2001 (n= 35), outra entre 2008 e 2011 (n=108 do CHR 28/425451 e n=115 do CHR 24/3074). Os parasitas foram genotipados por sequenciamento do *locus* CHR 28/425451 e CHR 24/3074. Então as frequências alélicas foram determinadas, e a heterozigosidade e o EHW dos genótipos observados avaliados. As frequências dos alelos detectados no *locus* CHR28/425451 variaram de acordo com a estação de transmissão de LTA considerada no período 2008-2011. Os genótipos no *locus* CHR 28/425451 mostraram-se em EHW nas duas amostras analisadas ( $p > 0,05$  para  $\chi^2$  de genótipos observados versus de esperados). De forma geral, as heterozigosidades observadas para o *locus* entre os dois períodos estudados foi similar (1992-2001:49%; 2008-2011: 48,72%). Contudo, entre 2008 e 2011, a heterozigosidade em *L. (V.) braziliensis* isoladas de LD foi inferior (45%) às dos parasitas obtidos de LC (58,22%) e LM (66,67%). No CHR 24/3074 os valores da heterozigosidade observada foram próximas. Em relação as formas clínicas a LD apresentou heterozigosidade observada menor do que LM (33%) e LC (25%) em Conclusões: (1) o EHW encontrado para os genótipos sugere que troca de material genético deva ser frequente entre *L.(V.) braziliensis* de focos de transmissão de LTA; (2) os achados sobre heterozigosidade sugerem que os parasitas envolvidos na LD devem ter sido mais recentemente incorporados à população causadora de LTA na região. O nível de FST do CHR 28/425451 mostrou uma pequena diferenciação. Possivelmente isto deve ter acontecido pelas cepas já terem trocado material.

**Palavras-chave:** Leishmaniose; 2. Equilíbrio de Hardy Weinberg; 3. Heterozigosidade; 4.

Polimorfismo.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease that occurs in tropical and subtropical areas. The disease is among the six parasitic infectious diseases of major public health importance, presenting in endemic areas in at least 98 countries. About 15 *Leishmania* species are efficient to infect humans and cause American Cutaneous Leishmaniasis (ATL), among them the *Leishmania (V.) braziliensis* is responsible by clinical forms at Corte de Pedra (CP). Three distinct clinical forms of ATL can be founded in this region: cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML) and disseminated leishmaniasis (DL), witch represent an emerging form the disease. Our objectives were: (1) assess whether the genotypes of loci of CHR24 / 3074 and CHR 28/425451 of *L. (V.) braziliensis* are present in equilibrium (HW Law); (2) analyze the heterozygosity rates in these loci and their influence on clinical source of the parasite isolated; (3) assess whether the heterozygosity indices of the samples vary from periodo 2008-2012 to 1992-2001; 4) avaliar a diferenciação (Fst) entre as populações e entre as subpopulações isoladas de diferentes formas de LTA; (5) evaluate the incidence of genotypes of CHR CHR 28/425451 and 24/3074 *loci*. In this cross-sectional study, two samples of *L. (V.) braziliensis* isolated from ATL patients were collected, one obtained between 1992 and 2001 (n = 35), another between 2008 and 2011 (n = 108 CHR 28/425451 n = 115 CHR 24/3074). The parasites were genotyped by sequencing the CHR 28/425451 and CHR 24/3074 *locus*. Then allele frequencies were determined, and the heterozygosis and the HWE of the genotypes observed were evaluated. The frequencies of alleles detected in CHR28/425451 locus varied according to the LTA transmission station considered in the period 2008-2011. The genotypes in the CHR 28/425451 locus shown in HWE in the two samples analyzed ( $p > 0.05$  for  $\chi^2$  genotypes observed versus expected). In general, the observed heterozygosity for the locus between the two periods studied was similar (1992-2001: 49%; 2008 to 2001: 48.72%). However, between 2008 and 2011, the heterozygosity in *L. (V.) braziliensis* isolated from LD was lower (45%) of the parasites obtained from LC (58.22%) and LM (66.67%). In the CHR 24/3074 heterozygosity values observed were close. Regarding the clinical forms of LD had observed heterozygosity lower than LM (33%) and LC (25%). In conclusions: (1) the HWE found for genotypes suggests that exchange of genetic material should be common among *L. (V.) braziliensis* of LTA transmission foci; (2) the findings of heterozygosity suggest that the parasites are involved in the LD have been more recently incorporated into the population causing LTA in the are. The FST level CHR 28/425451 showed little differentiation. Perhaps this should have happened by strains have already exchanged material.

**Keywords:** Leishmaniasis; 2. Hardy Weinberg equilibrium; 3. Heterozygosity; 4. Polymorphism.

## II. OBJETIVOS

### GERAL

Avaliar a genética populacional da *Leishmania (Viannia) braziliensis* causadora de leishmaniose tegumentar americana nos moradores da região de Corte de Pedra, no sudeste do estado da Bahia.

### ESPECÍFICOS

1. Avaliar se os genótipos dos *loci* do CHR24/3074 e CHR 28/425451 da *L. (V.) braziliensis* se apresentam em equilíbrio (Lei Hardy-Weinberg);
2. Analisar os índices de heterozigosidade observadas nesses *loci* e se eles variam de acordo com a origem clínica do isolado parasitário;
3. Analisar se os índices de heterozigosidade observados para a amostra do período de 2008-2011 são diferentes dos observados para a amostra do período 1992-2001;
4. Avaliar a diferenciação ( $F_{st}$ ) entre as populações de *L. (V.) braziliensis* das amostras temporalmente distintas (1992-2001 e 2008-2011), e entre as subpopulações isloadas de diferentes formas de LTA;
5. Avaliar a incidência dos genótipos dos *loci* CHR 28/425451 e CHR 24/3074 da *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra ao longo do tempo.

### III. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um espectro de doenças que ocorrem, sobretudo, em regiões tropicais e subtropicais do globo (Desjeux *et al.*, 1992). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a Leishmaniose tegumentar encontra-se entre as seis doenças infecciosas parasitárias de maior importância em saúde pública, apresentando-se de maneira endêmica em pelo menos 98 países (WHO, 2010). Entre as doenças parasitárias, a morbidade e a mortalidade causadas pela leishmaniose são superadas apenas pela malária e filariose linfática (Mathers *et al.*, 2007; Bern *et al.*, 2008).

A importância da leishmaniose reside não somente na alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Gontijo, 2003). Mais de 350 milhões de pessoas vivem em área de risco e, a cada ano, 500 mil desenvolvem a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar da doença (Desjeux, 2004; WHO, 2010).

Infecções produtivas resultam em doenças viscerais ou tegumentares com desfechos potencialmente desfigurantes ou fatais (Desjeux, 1992). Dentre as 30 espécies de *Leishmania* conhecidas, pelo menos 21 são capazes de infectar o homem, e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos (Ashford, 2000). Cerca de 15 espécies de *Leishmania* são capazes de causar a Leishmaniose Tegumentar humana, dentre elas a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, foco de estudo do nosso projeto (Murray *et al.*, 2005).

A *L. (V.) braziliensis* causa ao menos três tipos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): leishmaniose cutânea (LC); leishmaniose mucosa (LM); e leishmaniose disseminada (LD) (Costa *et al.*, 1986, Carvalho *et al.*, 1994; Azulay *et al.*, 1995; Turetz *et al.*, 2002). Essas três variações clínicas podem ser encontradas na região endêmica para LTA de

Corte de Pedra (CP), área bem delimitada no sudeste do estado da Bahia. A região compreende vinte municípios e estende-se por aproximadamente 10.000 Km<sup>2</sup>, numa faixa coberta pela Mata Atlântica, com clima tropical.

A LC se exhibe limitada a uma ou poucas úlceras na pele, mais frequentes nas áreas descobertas do corpo. Até 4% dos pacientes de LTA apresentam LM (Marsden, 1986). A LM pode acometer a mucosa nasal, palato, faringe e laringe, além de causar lesões desfigurantes. A LD se caracteriza pela presença de grande número de lesões acneiformes, papulares e ulceradas, distribuídas por diversas áreas da superfície corpórea dos pacientes (Costa *et al.*, 1986, Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002).

A forma clínica da LTA é dependente de, ao menos, dois fatores: (1) as características pertencentes ao hospedeiro, incluindo os aspectos genéticos e a resposta imune (Bacellar *et al.*, 2011); e (2) os atributos inerentes ao parasito. Através de pesquisas recentes realizadas em CP, identificou-se que a população de *L. (V.) braziliensis* responsável pela LTA na região é multiclonal e que polimorfismos encontrados em fragmentos de DNA randomicamente amplificados dos isolados avaliados estão associados com a apresentação clínica da doença (Schriefer *et al.*, 2004).

A LD é uma forma clínica emergente em CP, na qual a cepa parasitária apresenta forte papel determinante (Queiroz *et al.*, 2012). Na década de 80, a LD era responsável por apenas 0,2% dos casos de LTA (Jones, 1987), posteriormente, 1,9% (Turetz *et al.*, 2002) e atualmente 2,6% (Jirmanus *et al.*, 2012). A distribuição geográfica dos pacientes de LD em CP apresentou aumento progressivo ao longo dos anos, com padrão que reforça a suspeita da região estar sujeita à entrada de novas cepas de *L. (V.) braziliensis*.

Entre 1993 e 2002, os casos de LD eram mais frequentes na região interna da área endêmica. No entanto, ao longo dos anos, essa forma de LTA foi se espalhando por toda a

região costeira de CP (Schriefer *et al.*, 2009). Em um estudo mais recente, foi demonstrada uma forte associação entre cepas de *L. (V.) braziliensis* de CP, caracterizadas de acordo com haplótipos em *loci* polimórficos do parasito, e a forma disseminada da doença (Queiroz *et al.*, 2012).

As evidências de uma constituição multiclonal (Schriefer *et al.*, 2004), da associação entre cepas parasitárias com forma e distribuição da LTA (Schriefer *et al.*, 2004, 2009; Queiroz *et al.*, 2012), e da introdução e emergência recente de novas cepas parasitárias com consequências clínicas e epidemiológicas (Schriefer *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2012) nos levam à hipótese de que a população da *L. (V.) braziliensis* causadora de LTA nos habitantes de CP é bastante dinâmica em sua constituição.

Os trabalhos recentes indicam que profunda compreensão da população desses parasitas poderá resultar no melhor manejo, tanto dos casos de doença humana quanto da própria endemia (Schriefer *et al.*, 2004, 2009; Queiroz *et al.*, 2012). Além do mais, a melhor caracterização da população da *L. (V.) braziliensis* de CP ajudará a preencher uma lacuna nos conhecimentos básicos sobre a dinâmica populacional desses parasitas nas áreas em que eles causam doenças nos seres humanos.

Para a caracterização da dinâmica populacional da *L. (V.) braziliensis* de CP, utilizamos ferramentas analíticas clássicas da avaliação genética das populações. Em particular, exploramos a lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), que pode indicar se uma população apresenta-se com frequências gênicas alteradas (em desequilíbrio) ou em equilíbrio estável ao longo de determinado tempo. Empregamos o EHW para avaliarmos a forma de reprodução da *L. (V.) braziliensis* em CP. A detecção de desequilíbrio indica uma forma assexuada de reprodução e/ou frequentes aquisições de novas cepas parasitárias na região. Para completar essa caracterização também avaliamos a heterozigosidade desses parasitas e o

grau de diferenciação genética entre amostras temporalmente distintas com base nas genotipagens de *loci* polimórficos identificados nessa população de *L. (V.) braziliensis* (Queiroz *et al.*, 2012).

## IV. REVISÃO DA LITERATURA

### IV. 1. Epidemiologia e aspectos clínicos da leishmaniose

As infecções com o protozoário *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911) são conhecidas por causarem doenças no ser humano em áreas da América tropical em pelo menos 15 países (Grimaldi *et al.*, 1989), sobretudo nas Américas Central e do Sul, exceto Chile e Uruguai, que não têm casos registrados (Tolezano, 1994).

Sua importância para a saúde pública se deve aos possíveis danos que causam aos tecidos epidérmicos, o impacto psicossocial sobre as pessoas afetadas e os anos de vida ajustados por incapacidade perdidos (DALYs) (OMS, 2002). A leishmaniose é responsável por 2.357 milhões de DALYs (WHO, 2010), sendo classificada como uma das doenças tropicais negligenciadas (DTN) (Yamey, 2002). A sua incidência poderia ser reduzida através de intervenções simples para o controle de vetores, tais como mosquiteiros tratados com inseticida e pulverização de interiores de habitações com inseticidas de efeito residual (Yangzom, *et al.*, 2012).

Os métodos atuais de avaliação da carga de doença não levam em conta a diversidade clínica e epidemiológica da leishmaniose, e o intenso impacto médico, social e econômico nos locais altamente afetados. Além disso, os dados de vigilância passiva existentes são insuficientes, sendo necessárias, avaliações rigorosas sobre a incidência verdadeira, morbidade, mortalidade, padrões de transmissão, e não apenas os efeitos na saúde por leishmaniose (Bern *et al.*, 2008).

Os números de casos de leishmaniose estão crescendo vertiginosamente. Isto decorre, em parte, do melhor diagnóstico e notificação. Esse crescimento é devido também a outros fatores, como controle inadequado do vetor e de reservatórios (Reithinger & Dujardin, 2007).

As principais formas clínicas de LTA são LC, LM ou leishmaniose mucocutânea, e LCD (Marzochi, 1992). No Brasil, a LTA é encontrada em todos os estados. Sua incidência varia de aproximadamente, 25000 a 35000 infecções diagnosticadas por ano no país (Ministério da Saúde, 2010).

A forma cutânea da doença é endêmica nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo mais de 70 países (Reithinger *et al.*, 2007). O Brasil apresenta o maior número de casos na América do Sul (Alvar *et al.*, 2012). No velho mundo, as principais espécies que causam leishmaniose cutânea são *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. No novo mundo, os principais agentes etiológicos da doença são *L. braziliensis*, *L. guyaniensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (Dowlati, 1996).

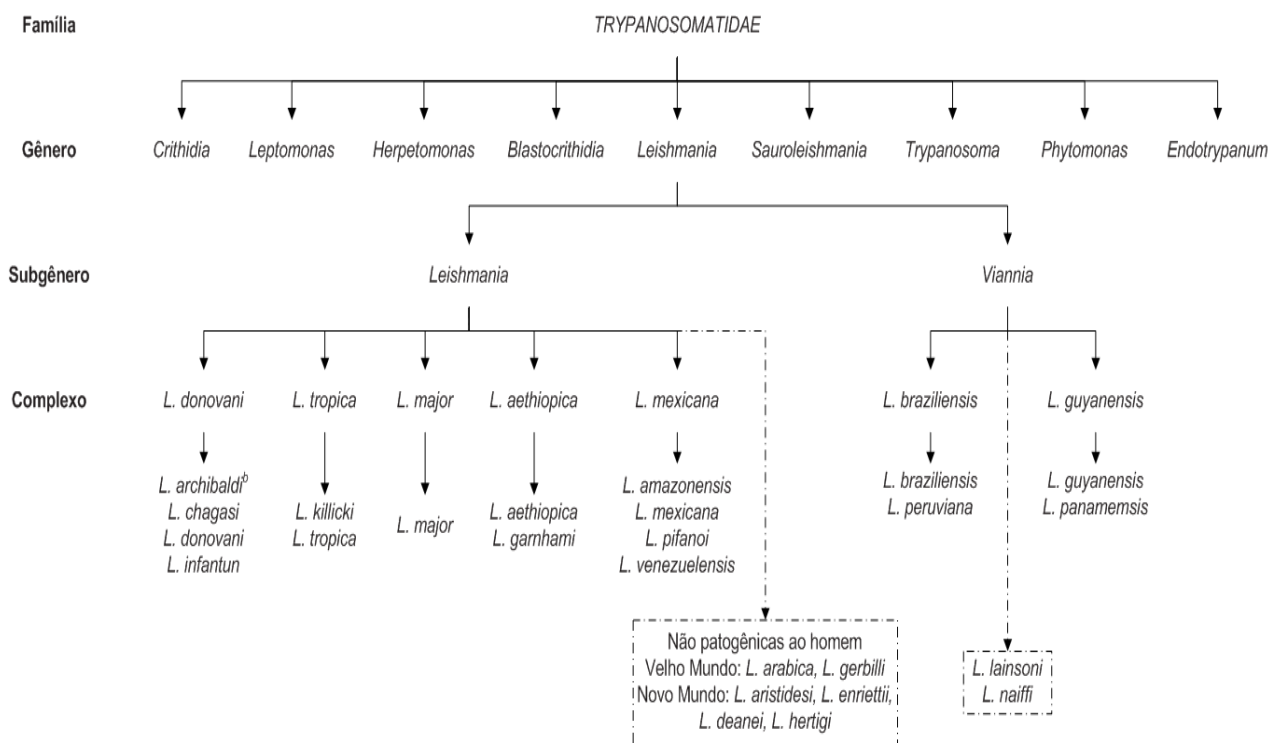
A manifestação mais frequente de LTA é uma única úlcera cutânea localizada em áreas descobertas do corpo, que apresenta uma forma circular, bordas elevadas, bem definidas e uma base granular (Oliveira-Neto *et al.*, 1988).

Embora a doença provocada pela *Leishmania (V.) braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia* apresentem normalmente uma forma cutânea, o parasita também pode migrar para os tecidos da nasofaringe de uma pequena proporção de casos, resultando na LM, que pode desfigurar a face. A *Leishmania (V.) braziliensis* também pode disseminar para outras áreas da pele, muitas vezes após o tratamento, dando origem à LD.



## IV. 2. Classificação e ciclo biológico da *Leishmania*

A leishmaniose é uma doença causada por protozoário da família *Trypanosomatidae*, que pertence ao gênero *Leishmania*. A classificação do subgênero foi proposta quanto a sua localização no tubo digestivo do inseto, algumas espécies que desenvolvem na região peripilárica, agrupou no subgênero *Viannia*. As que desenvolvem na região suprapilárica classificou do subgênero *Leishmania* (Lainson e Shaw, 1987) (figura 1).



**Figura 1-** A taxonomia do gênero da *Leishmania*. (Fonte: WHO, 1990; Rioux et al., 1990; Lainson & Shaw, 1998)

Mais recentemente, um terceiro subgênero tem sido incluído, o *Sauroleishmania*, que compreende espécies que parasitam exclusivamente lagartos (Bates, 2007).

*Leishmania* são parasitas digenéticos com duas formas evolutivas principais, a amastigota e a promastigota (Handman, 1999). A infecção de hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de uma fêmea de flebotomíneo com as promastigotas metacíclicas, formas infectantes, nas suas probóscidas (Besteiro *et al.*, 2007).

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, essas formas metacíclicas são transmitidas por regurgitação (Kendrick, 1990). Os parasitas são fagocitados por macrófagos e transformam-se em amastigotas aflageladas. As amastigotas se replicam até causar a ruptura da célula, em seguida invadem outros macrófagos. O ciclo se completa quando o vetor ao picar o hospedeiro vertebrado infectado ingere sangue contendo macrófagos com formas amastigotas e no trato digestivo as formas amastigotas se transformam em promastigotas pró-cíclicas (Coura, 2005).

Apesar das etapas de diferenciação e desenvolvimento de promastigotas serem bem caracterizadas morfológicamente, os sinais e os eventos moleculares que resultam nas etapas da diferenciação ainda não estão estabelecidos (Pan *et al.*, 1993 e Sereno *et al.*, 1998).

Há cada vez mais evidências de que cepas de *Leishmania* podem ser mantidas em ambientes silvestres e ciclos urbanos. Dentre os principais hospedeiros vertebrados do ciclo silvestre da *L. (V.) braziliensis* destacam-se roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres. Também é aceito que a transmissão possa ocorrer em habitats peridomésticos sendo os hospedeiros ou reservatórios mais prováveis cão, gato, equino e homem (Manual de leishmaniose, 2010).

### **IV. 3. Genoma da *Leishmania***

As espécies *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major* têm o seu genoma composto por 36 cromossomos, enquanto o genoma da *L. braziliensis* tem apenas 35 cromossomos. Isso se deve a fusão envolvendo os cromossomos 20 e 34 do parasita (Britto *et al.*, 1998). As sequências completas dos genomas da *Leishmania major*, *L. infantum*, *Leishmania braziliensis* (Ivens *et al.*, 2005), e agora *Leishmania amazonensis* (Real *et al.*, 2013), já foram determinadas e estão em domínio público.

### **IV. 4. Genética de populações**

A genética de populações é uma parte da genética que descreve em termos matemáticos as consequências da herança ao nível populacional (Gardner, 1977). Contribui para descrever os padrões de variação genética entre membros individuais de populações e estimar os processos de reprodução, mutação, recombinação e seleção natural envolvidos. Dentre os índices empregados na caracterização genética de uma população estão: equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigidade e diferenciação genética (FST). Todos se baseiam no polimorfismo entre os indivíduos ou grupos de indivíduo da população estudada.

#### **4. 1. Heterozigidade**

É a quantidade de heterozigose para um determinado gene em uma população. Esta pode ser heterozigidade total que é dada pela quantidade de heterozigoto do gene e calculada pelas frequências alélicas usando o EHW. A heterozigidade pode ser considerada uma medida de variabilidade genética (Menezes, 2005). É uma forma de averiguar se a população sofre autofecundação/endogamia e clonalidade. Nessa situação, possui o déficit de

heterozigotos, enquanto o excesso de heterozigotos é evidência de um recente evento sexual/hibridação.

#### **4. 2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg**

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) é marcador de genótipo fundamental para todos os estudos sobre os dados genéticos de populações (Schaid *et al.*, 2006). É um teste que compara o esperado e observado o número de heterozigotos e homozigotos (Zhou *et al.*, 2009). A suposição é que os membros da população se reproduzem aleatoriamente e que as frequências alélicas subjacentes, persistem de geração após geração. Os desvios do EHW ocorrem quando há seleção, deriva, mistura população, ou formas de acasalamento não aleatório.

Muitos estudos buscam descobrir SNPs e caracterizar as suas frequências e estrutura de correlação através do genoma, como bem entre diferentes populações, usando um número relativamente pequeno de indivíduos de diferentes grupos étnicos (Schaid *et al.*, 2006).

#### **4. 3. Índice de fixação populacional ( $F_{ST}$ )**

O índice de fixação ou endogamia tem sido utilizado na genética das populações. É uma medida de diferenciação genética e está diretamente relacionada com a variação na frequência do alelo entre as populações e, inversamente, com o grau de semelhança entre os indivíduos de uma mesma população. Se  $F_{ST}$  é pequena, isso significa que as frequências alélicas dentro de cada população são semelhantes; se for grande, isso significa que as frequências de alelos são diferentes (Holsinger e Weir, 2009). O índice de fixação ou endogamia tem sido utilizado na genética das populações. Este pode medir a extensão de

endogamia dentro das subpopulações (FIS), a diferenciação genética entre populações (FST) e a redução média em heterozigosidade de um indivíduo em relação a toda população (FIT).

#### **4. 4. Polimorfismo**

Existência de duas ou mais classes geneticamente diferentes na mesma população. Em um ambiente um alelo pode eliminar o outro, ou caso contrário, as frequências de ambos podem atingir um equilíbrio intermediário pelas pressões de seleção, fluxo gênico e pressão de mutação, porém pode não ocorrer um equilíbrio entre a população primária e contribuir para manter dois ou mais alelos numa mesma população panmítica por tempo indefinido (Gardner, 1977).

Entre os marcadores explorados em epidemiologia molecular de patógenos estão “STRs”, “VNTR” e “SNPs”. O primeiro polimorfismo é a sequência repetitiva em tandem e representada por repetições de sequências com dois a cinco nucleotídeos também conhecidas como microsátélites. Nos mini-satélites ou repetição em tandem de número variável (“VNTR”), pode-se verificar um número variável de repetições com sequências de nucleotídeos maiores. E por fim, Polimorfismos de Nucleotídeo Único (“SNPs”) mostram variação de apenas um único nucleotídeo, e contam na casa dos milhões, distribuídos por todo o genoma (Lewin, 2001). Estes podem ser considerados como marcadores genéticos. (Simmons & Snustad, 2006).

#### IV. 5. Epidemiologia molecular e marcadores polimórficos da *L. (V.) braziliensis* de CP

No nordeste do Brasil, a LTA é endêmica. Corte de Pedra é uma região endêmica acometida pela doença e fica situada no sudeste da Bahia a 280 km da capital. As espécies de *Leishmania* causadora da doença na Bahia são a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) braziliensis*, entretanto tem sido relatado que nos últimos 15 anos a LTA em CP é causada pela infecção desta última espécie. *Lu. (N.) whitmani* e *Lu. (N.) intermedia* são flebótomos transmissores de *L. (V.) braziliensis* nessa área endêmica (Schriefer *et al.*, 2009; Jirmanus *et al.*, 2012). Três formas clínicas da doença (LC, LM e LD) podem ser encontradas simultaneamente em CP, entretanto, recentemente formas atípicas da doença têm sido descritas nesta área, apresentando lesões verrugosas e múltiplas lesões nodulares em uma área específica do corpo dos indivíduos acometidos pela doença (Schriefer *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, 2009).

Nos últimos 25 anos, pacientes desta área endêmica têm sido atendidos no Centro de Referência em Leishmaniose Doutor Jackson Maurício Lopes Costa, Posto de Saúde de Corte de Pedra, que recebe cerca de 500 a 1.300 pacientes com essa doença anualmente (Jirmanus *et al.*, 2012). Ao longo das últimas duas décadas, tem sido reportado um aumento no número de casos mais grave da doença (LM e LD) e uma diminuição na eficácia do tratamento à base do antimônio, além de mudanças nos dados demográficos dos pacientes nesta população (Guimarães *et al.*, 2009; Turetz *et al.*, 2002; Jirmanus *et al.*, 2012). Schriefer *et al.* (2009) demonstraram que os casos de LD sofreram um aumento significativo em Corte de Pedra e que ocorreram por surtos, entre os anos de 1993 e 2003. Eles realizaram uma inspeção visual (mapeamento) por geoprocessamento que mostrou a dispersão e conseqüentemente o aumento dos casos de LD na área endêmica, e realizaram uma análise de correlação entre as distâncias dos casos, constatando que a maioria dos casos ocorreu próximos, sugerindo que ocorriam surtos da doença nessa área (Schriefer *et al.*, 2009).

Acredita-se que a manutenção da endemicidade nesta área seja mantida por surtos de infecções humanas nos focos da doença e que a maioria das infecções seja causada por uma única ou poucas cepas parasitárias, já que é possível que estas apresentem marcadores polimórficos responsáveis pela dinâmica da doença em áreas afetadas. Tais marcadores foram demonstrados por Schriefer e colaboradores (2004), no qual foi avaliada a estrutura populacional da *L. (V.) braziliensis* obtida de pacientes com LTA que vivem em Corte de Pedra – BA, sendo descritas subpopulações ou clados de parasitas identificados com base em genótipos definidos por perfis eletroforéticos de alvos genômicos amplificados por RAPD. Foram encontrados e caracterizados polimorfismos nas seis sequências genômicas amplificadas de *L. (V.) braziliensis* (Schriefer *et al.*, 2004). Queiroz e colaboradores (2012) demonstraram que dos seis *loci* polimórficos avaliados, dois deles possuem um grupo de alelos que estão associados a um elevado risco de desenvolvimento da LD.

#### **IV. 6. Estado atual da compreensão sobre a genética e dinâmica populacional do gênero da *Leishmania***

Por muito tempo a reprodução da *Leishmania* era predominantemente clonal (Tibayrenc, 1990). Com novas técnicas moleculares tem demonstrado que o parasita é capaz de realizar trocas genéticas. Atualmente o modo de reprodução da *Leishmania* ainda está em discussão entre clonal versus reprodução sexuada.

Há suspeita de recombinação sexual (Chargui *et al.*, 2009; Odiwuor *et al.*, 2011). Diversos estudos referentes a parasitas híbridos suportam a ideia de que a recombinação sexual pode desempenhar um papel importante na evolução do gênero, ajudando a conduzir a expansão de vetor, reservatório e a apresentação clínica da doença em novos focos (Rogers *et al.*, 2014).

Na *Leishmania*, co-infecções do flebótomo revelam uma capacidade existente para a troca de material genético (Akopyants *et al.*, 2009). É possível que a reprodução sexuada ocorra em populações naturais de *Leishmania*, a grande questão é sobre o papel exato deste processo na epidemiologia e evolução (Rogers *et al.*, 2014).

Estudos com *Trypanosomas brucei* demonstraram alternância nos tipos de reprodução, ocorrendo reprodução clonal no hospedeiro vertebrado e no inseto vetor, a endogamia (Gibson *et al.*, 2008). Os eventos estressantes que acontecem no intestino do inseto são propícios para induzir as trocas genéticas entre parasitas da *Leishmania*, sendo assim, há necessidade de analisar o modelo de reprodução em diversos ambientes e dentro de várias espécies (Volf *et al.*, 2009). O entendimento sobre o modo de reprodução é importante para o desenvolvimento de drogas e vacinas, e controle da endemicidade da *Leishmania*.



## V. HIPÓTESE

Nosso estudo se baseou nas hipóteses abaixo.

1. A endemia de LTA é mantida por surtos de cepas parasitárias ao longo do tempo;
2. A reprodução na *L. (V.) braziliensis* é predominantemente assexuada, resultando em falta de equilíbrio de Hardy-Weinberg nos genótipos encontrados em *loci* parasitários;
3. Cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de casos de LD apresentam menor heterozigosidade distinta daquelas provenientes de casos mais clássicos de LTA em CP (*i.e.* LC e LM), refletindo uma aquisição recente daqueles parasitas pela população endêmica em CP.

## VI. JUSTIFICATIVA

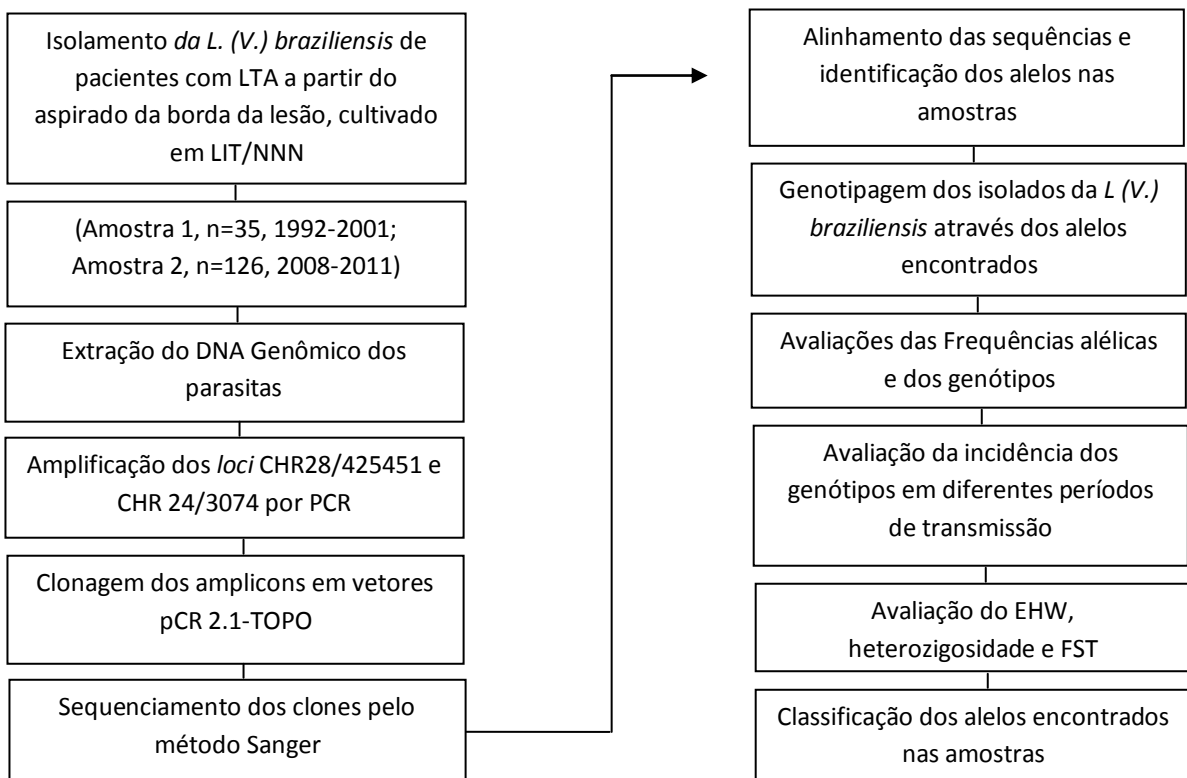
Dentre outros ganhos, esta proposta permitirá: (1) o melhor conhecimento sobre a dinâmica populacional da espécie *L. (V.) braziliensis* em áreas de transmissão natural do parasita aos seres humanos, empregando a população de CP como modelo; (2) reforçar que as populações da *L. (V.) braziliensis* são multiclonais; (3) confirmar que a cepa de *L. (V.) braziliensis* é um dos principais determinantes da LD que é a forma de LTA mais grave e menos responsiva ao tratamento convencional. (4) O EHW pode está relacionado à reprodução sexuada do parasita.

## VII. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

### VII. 1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal, no qual são exploradas duas amostras de isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis*: uma obtida entre 1992 e 2001 (amostra A, n= 35) 17 indivíduos com LC, 9 com LM e 9 com LD; e outra obtida entre 2008 e 2011 (amostra B, CHR = 126) 9 pacientes com LM, 26 com LD e 91 com LC. Os isolados parasitários foram genotipados com base no sequenciamento de dois *loci* polimórficos, CHR 24/3074 e CHR 28/425451, recentemente identificados nessa população de *L. (V.) braziliensis* (Queiroz *et al.*, 2012). Foram descritos alelos e genótipos, e analisadas o equilíbrio de Hardy-Weinberg, heteroziguidade, graus de diferenciação entre as amostras e subpopulações de cada amostra.

#### Fluxograma ilustrativo do estudo

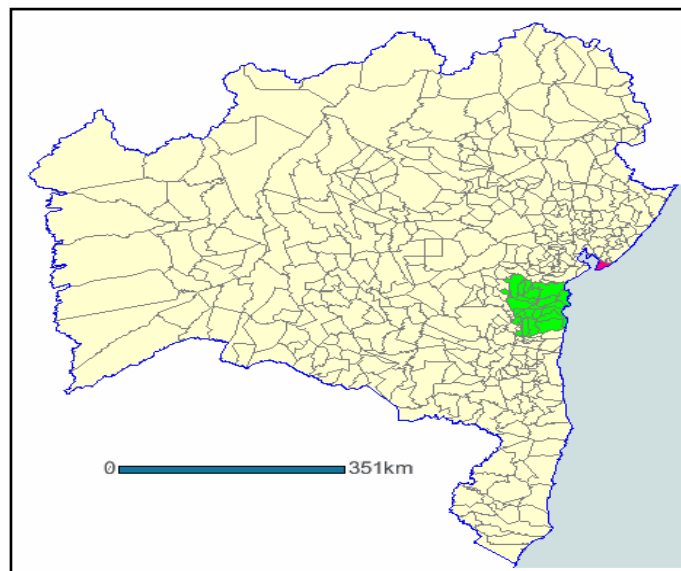


**Figura 2:** Fluxograma ilustrativo do estudo

## VII. 2. ÁREA DE ESTUDO

O estudo utilizou amostras provenientes de uma área endêmica para LTA, chamada Corte de Pedra (Figura 3). A região está localizada no sudeste do estado da Bahia, a 280 km de Salvador, sendo composta por 20 municípios, delimitados pelas coordenadas geográficas (latitude/longitude) 14°/39°, 13°/39°, 14°/40°, e 13°/40. Os isolados de parasitas empregados neste estudo foram obtidos de pacientes atendidos no “Centro de Referência em Leishmaniose Dr. Jackson M. L. Costa”.

CP consiste numa área rural, anteriormente dominada pela Mata Atlântica, mas parcialmente desmatada. Em CP, nota-se a presença de *Lu. (N.) whitmany* e *Lu. (N.) intermédia*, que são flebotomíneos transmissores da *L. (V.) braziliensis* (Miranda *et al*, 2009)



**Figura 3.** Mapa da área endêmica de Corte de Pedra, apresentada em verde.

## VII. 3. População de estudo

Os parasitas empregados no estudo foram provenientes de pacientes com LTA atendidos no posto de saúde Corte de Pedra. Os sujeitos dos quais foram isoladas as *L. (V.)*

*braziliensis* do estudo foram recrutados entre 1992 e 2001, e entre 2008 e 2011. Todos os casos de LTA foram vistos e diagnosticados no posto de saúde Dr. Jackson M. L. Costa de que trata aproximadamente 50% dos pacientes com leishmaniose na região. Os isolados parasitários foram classificados em três grupos de acordo com as definições da doença dos pacientes de que foram isolados: LM, LD ou LC.

#### **VII. 4. Definição de casos (i.e Forma clínica de LTA recrutada)**

LC foi definida como presença de uma ou poucas (menos que 10) lesões cutâneas ulcerativas, sem evidência de envolvimento da mucosa. LM foi definida como presença de lesão metastática em nariz, boca, faringe, laringe não contígua com lesões cutâneas primárias em pacientes não definíveis como LD. LD foi definida como uma doença com mais de dez lesões cutâneas ulcerativas, nodulares ou acneiformes espalhados em duas ou mais áreas do corpo. Pacientes que apresentaram simultaneamente as definições para LM e LD foram classificados como pacientes com LD.

#### **VII. 5. Amostra**

O estudo empregou duas amostras. Amostra “A” com 35 isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos no período entre 1992 e 2001. Esses isolados foram provenientes de 16 indivíduos com LC, 9 com LM e 9 com LD. A amostra “B” se constitui em 126 isolados obtidos entre 2008 e 2011 de 9 pacientes com LM, 26 com LD e 91 com LC.

#### **VII. 6. Obtenção e estoque dos isolados parasitários de *L. (V.) braziliensis***

Os isolados de *L. (V.) braziliensis* utilizados no presente estudo foram cultivados a partir de material aspirado das bordas das lesões de pele ou mucosas de pacientes com LTA. O material aspirado foi imediatamente incubado em meio bifásico LIT (Liver Infusion Triptose) e NNN (Neal, Novy e Nicolle) em tubos de polipropileno estéreis (tubos falcon) com 14 ml de

capacidade. Em seguida, a suspensão foi incubada a 26°C durante uma a duas semanas, e transferida para o frasco de cultura (frasco de poliestireno, livre de DNase, RNase e toxinas, estéril, com área de crescimento de 25 cm<sup>2</sup>), contendo meio de Schneider (SCHNEIDER INSECT EXTRACT MEDIUM< SIGMA) complementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor, e com 2 mM de L-glutamina. Então a suspensão foi incubada a 26°C durante um período máximo de duas semanas. Os parasitas das suspensões acima foram congelados em DMSO a 10%, meio de crescimento a 90%, e estocado em nitrogênio líquido.

### **6. 1. Extração e estoque do DNA genômico da *L. (V.) braziliensis***

Para a obtenção do DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis*, estes foram descongelados e cultivados em meio de cultura Schneider até as promastigotas atingirem a fase estacionária de crescimento. Aproximadamente, 1,7 mL da suspensão de promastigotas foram centrifugados a 200 RCF por 10 minutos e o pellet foi ressuspenso em 150 µL de TELT (tampão de lise; 50 mM Tris-HCL pH 8.0; 62,5 mM, EDTA pH 9.0; 2,5 M LiCl e 4% v/v Triton 100x).

Após esta etapa, as amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas à temperatura ambiente por cinco minutos. Então foram adicionados ao lisado celular 150 µL de uma solução de Fenol e Clorofórmio (1:1 v/v). Em seguida, a mistura foi homogeneizada lentamente por cinco minutos, no vortex, e centrifugada 10.000 RCF por cinco minutos. O sobrenadante contendo o DNA genômico foi colhido e transferido para outro tubo contendo 300 µL de etanol absoluto, após esta etapa foi realizada uma homogeneização por cinco minutos, seguida de centrifugação a 10.000 RCF por 10 minutos. O novo sobrenadante foi descartado, e o DNA genômico precipitado foi lavado mais uma vez com 1 ml de etanol absoluto e centrifugado a 10.000 RCF por cinco minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi

descartado e o precipitado seco foi ressuspensão em 100 µL de tampão TE (TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenado a -20°C.

## 6. 2. Determinação da espécie de *leishmania* por PCR em tempo real

A determinação das espécies e *Leishmania* isoladas foi realizada por qPCR em tempo real com ensaios SYBER Green. Foram utilizados primers baseados nas sequências de KDNA1, KDNA3 e MAG1 como descrito em (Weirather *et al*, 2011). A identificação da espécie de *Leishmania* do isolado se baseou nas curvas de dissociação do DNA na mistura (“melting curves”) para as duas espécies descritas na região.

## 6. 3. Amplificação dos *loci* por PCR

Para a amplificação do *locus* CHR 24/3074 foram utilizados os primers (oligonucleotídeos iniciadores) GGACTGGAGTGATCGAA e TGGCTCAAGTGTCGCA. Para a amplificação do *locus* CHR 28/425451, foram utilizados os primers TAAGGTGAACAAGAAGAATC e CTGCTCGCTTGCTTTC (*i.e* Queiroz *et al.*, 2012). As reações de PCR convencional empregaram volume final de 50µL como segue: 1 µL de DNA alvo em concentração de 16 ng/ µL; 5µL de tampão 10x (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 1µL de cada oligonucleotídeo iniciador em concentração de 0,05 mM (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 4µL de dNTP em concentração de 2,5 Mm cada - dATP, dCTP, dGTP, dTTP - (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 1,0 – 2,5µL de MgCl<sub>2</sub> em concentração de 50 mM (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 0,2 µL de Taq DNA Polymerase Platinum em concentração de 5 U (INVITROGEN Life Technologies, Inc); e água destilada, completando o conteúdo para o volume final de 50µL .

As reações foram realizadas no Termociclador Veriti® de 96 poços da Applied Biosystems, segundo a seguinte programação: 94°C na fase de desnaturação da fita por cinco minutos; seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 48°C ou 56°C na fase de anelamento

da fita durante um minuto, e 72°C na fase de extensão da fita por um minuto; dez minutos a 72°C na fase de extensão final. Dez microlitros de cada produto da reação de amplificação dos genes, misturados com 2µl de tampão de corrida contendo Azul de Bromofenol (0,25% de bromophenol e 30% de glicerol em água), foram aplicados e fracionados por eletroforese em gel de agarose a 1,3% por uma hora a 120 volts, em tampão TBE 0,5X (0,04M Tris-HCL-Borato e 1mM EDTA). Os géis foram visualizados através de transluminador de UV conectado a um sistema de captura eletrônica de imagens (UVP Labworks Laboratory Imaging and Analysis System Inc.CA, EUA), após terem sido corados com Brometo de Etídio a 0,5 µg/mL, para confirmação da amplificação dos fragmentos alvo.

#### **6. 4. Clonagem dos *loci* parasitários amplificados por PCR**

Após a amplificação dos *loci*, foram realizadas as clonagens utilizando-se o Topo TA Cloning Kit (INVITROGEN Life Technologies, Inc), tendo os amplicons sido inseridos por ligação no plasmídeo PCR 2.1 da Invitrogen. Em resumo, em um volume final de 10 µl, para cada reação foram adicionados 2µL do fragmento amplificado, 1µl de tampão de ligação10x, 1µl de T4 DNA ligase, 2µl do vetor PCR® 2.1 (25 ng/µl) e 4µl de água destilada. A reação foi homogeneizada gentilmente e incubada durante a noite por um período de 12-16 horas, a 14°C.

Seguida a essa incubação, iniciou-se a etapa da transformação de células *Escherichia coli* DH5 *a* competentes com os plasmídeos recombinantes. Alíquotas contendo 100µl de células competentes foram retiradas do estoque (armazenamento a -70°C) e colocadas em gelo. Adicionou-se a essas alíquotas 2µl do produto da reação de ligação, gentilmente, sendo incubadas por 30 minutos em gelo. Após esse tempo, essas células passaram por um choque térmico, em que foram incubadas por três minutos a 42°C em banho-maria e, rapidamente, transferidas para o gelo por dois minutos. Então, foram adicionados 200µl de meio LB líquido



em temperatura ambiente, e a suspensão foi incubada por aproximadamente duas horas a 37°C, em banho-maria.

Após esse período de incubação, o conteúdo foi espalhado cuidadosamente em placas de petri contendo meio LB Agar com 40µl de X-gal a 20 mg/mL (INVITROGEN Life Technologies, Inc) e 4µl de IPTG a 200 mg/mL (INVITROGEN Life Technologies, Inc), com o auxílio de um espalhador de células (alça de Drigalski) e de um disco rotatório. Essas placas foram incubadas durante um período de aproximadamente 24 horas a 37°C em estufa. Posteriormente, foram selecionadas seis colônias brancas de cada amostra (colônias que provavelmente apresentam o vetor PCR 2.1 contendo o inserto alvo), que acabaram por ser isoladas e transferidas separadamente para tubos falcon contendo 5 ml de meio LB líquido com ampicilina a 10 mg/ml. Essa suspensão foi incubada sob agitação em incubadora rotatória a 175 rpm por 16 horas a 37°C.

#### **6. 5. Extração de DNA plasmidial das *Escherichia Coli* recombinantes**

Para a extração do DNA plasmidial dessas suspensões, colocou-se 1,5 mL de cada suspensão bacteriana em tubo Eppendorf, seguido de centrifugação a 12.000g por um minuto. Foi feita a remoção do sobrenadante por aspiração e o sedimento bacteriano foi ressuspensão em vórtex com 100µl da solução de minipreparação de DNA I gelada (Glicose a 1 mM; EDTA a 0,5M ; Tris-Cl a 1M pH 8,0 e água destilada autoclavada). Na sequência, a suspensão foi deixada em temperatura ambiente, incubando por cinco minutos.

Logo após, foram adicionados 200µl da solução II (1 mL de SDS 10%, 2 mL de NaOH 1N e 7 mL de água destilada) recém-preparada e o conteúdo foi homogeneizado duas a três vezes por inversão rápida e incubado em gelo por cinco minutos. Posteriormente, foram acrescentados 150µl da solução III gelada (Acetato de Potássio 5M pH 4,8; Acido Acético e água destilada – solução autoclavada) e o conteúdo foi homogeneizado, gentilmente, por 10

segundos em vortex com tubo em posição invertida, e incubado em gelo por cinco minutos. Então o tubo contendo a mistura foi centrifugado a 12.000g por cinco minutos a 4°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 450µl de fenol: clorofórmio 1:1 (v/v), previamente resfriado, e homogeneizado em vortex. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 12.000g por dois minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 1 mL de etanol absoluto, então a mistura foi incubada por cinco minutos em temperatura ambiente e vinte minutos a -70°C. Após esse período, foi realizada uma centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1mL de etanol a 70% ao sedimento.

Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e logo em seguida o sobrenadante foi descartado, ficando o precipitado de DNA do fragmento no tubo, que foi deixado invertido à temperatura ambiente por 10 minutos até a secagem do mesmo. Finalmente, o DNA acabou por ser ressuspensão em 50µl de tampão TE pH 8,0 (Tris-EDTA) com RNase (Gibco BRL, division of INVITROGEN GAITHERSBURG, EUA).

#### **6.6. Seleção de plasmídeos recombinantes por análise com endonuclease de restrição**

A confirmação das clonagens dos *loci* nos plasmídeos PCR 2.1 foi feita por análise de restrição. Cada reação, constituída por 3,5µl do produto da minipreparação de DNA, 1µl de tampão de digestão 10x, 0,5µl da enzima de restrição EcoRI (INVITROGEN Life Technologies, Inc) e 5µl de água destilada, foi incubada a 37°C em banho-maria por uma hora. Os 10µl do produto da digestão com endonuclease de restrição foram adicionados a 2µl de tampão de corrida, contendo Azul de Bromofenol e a mistura foi fracionada em gel de agarose a 1,3%, por 50 minutos, a 120 volts, em tampão TBE 0,5X (0,04M Tris-HCL-Borato e 1 mM EDTA).

Após coloração com Brometo de Etídio a 0,5 µg/mL por 10 minutos, e descoloração por cinco minutos em água autoclavada, o gel foi visualizado através do transluminador de UV conectado a um sistema de captura eletrônica de imagens (UVP Labworks Laboratory Imaging and Analysis System Inc., CA, EUA). Foram considerados clones verdadeiros aqueles produtos que apresentaram uma banda com aproximadamente 627pb para os fragmentos do *locus* do CHR 28/425451 e 721 pb para os fragmentos do *locus* do CHR 24/3074.

### **6.7. Sequenciamento e alinhamento das sequências obtidas para cada *locus* e identificação dos sítios polimórficos**

Seis clones por isolado de *L.(V.) braziliensis* foram enviados para serem sequenciados pelo método Sanger na Advancing Through Genomics MACROGEN® (Coreia). Os insertos nos plasmídeos foram sequenciados com primers complementares para as sequências de bacteriófago M13 existentes no vetor. Para identificação dos sítios polimórficos, fragmentos clonados e alinhamento das sequências dos *loci* CHR24/3074 e CHR28/425451 foi utilizado o programa MEGA 5.05®, usando como base para a avaliação sequências genômicas de *L.(V.) braziliensis* depositadas no Centro Nacional de Informação Biotecnológica– NCBI (GenBank), os diferentes alelos encontrados nas amostras do estudo foram identificados com base nos polimorfismos detectados nos alinhamentos dos fragmentos clonados. Primeiro determinou-se a sequência consenso em todos os *loci*, comparando-se os *loci* homólogos nos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Então, as sequências de cada um dos seis *loci* foram analisadas para a identificação da ocorrência de SNPs e / ou indels entre os vários segmentos homólogos de DNA genômico parasitário comparados.

### **VII. 7. Definição de haplótipos e genótipos**

Na literatura, alelo é diferentes formas do gene. Em nosso estudo, consideramos alelo, todos os polimorfismos encontrados em mais de um clone por isolado, e necessariamente, o mesmo polimorfismo em mais de um isolado de *L. (V.) braziliensis*, e o conjunto destes alelos

encontrados formam os haplótipos, que se referem a todos os SNP's e Indel's juntos que foram observados em cada um dos alelos dos isolados. Definimos como heterozigoto aqueles isolados que apresentaram diferentes alelos e homozigoto os isolados que apresentaram os mesmos alelos entre os clones avaliados. Então, os genótipos (homozigotos e heterozigotos) foram constituídos a partir do agrupamento dos haplótipos, nos quais foram utilizados para avaliação do equilíbrio de HW.

## **VII. 8. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA**

Os procedimentos adotados nesse estudo foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, e da Universidade de Iowa. O projeto e seus protocolos clínicos foram também aprovados pelo NIH, nos EUA, e pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP- 128/2008, 17.03.2008) no Brasil. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos que participaram do estudo.

## **VII. 9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A verificação do equilíbrio dos genótipos de *L. (V.) braziliensis* em CP foi feita de acordo com a Lei de Hardy-Weinberg. Este método compara contagens esperadas de genótipos numa determinada população com as contagens efetivamente observadas. Com os dados dos genótipos esperados e observados disponíveis, é realizado o teste de "Goodness-of-fit" (Teste do  $X^2$ ). As frequências dos genótipos observados estarão em equilíbrio se  $p > 0,05$ .

Na avaliação acima descrita, as contagens observadas dos genótipos na amostra consistem nos números de homozigotos AA e aa, e de heterozigotos Aa. Para a determinação das contagens esperadas de homozigotos e heterozigotos, caso a amostra apresente seus genótipos em equilíbrio, são necessários três passos: (1) determinação das frequências dos alelos A e a na amostra; (2) determinação das frequências esperadas de genótipos AA, aa e Aa

na amostra; e finalmente (3) determinação das contagens esperadas de AA, aa e Aa na amostra. O que é comparado pelo  $\chi^2$  são as contagens observadas e esperadas de AA, Aa e aa.

Nos passos intermediários (1) acima dos números totais de alelos A e de alelos a são divididas pelo “n” da amostra, resultando nas frequências alélicas observadas de A e de a para o cálculo das frequências esperadas dos genótipos AA, aa e Aa em (2), segue-se a lei de HW em que as somas das frequências dos genótipos (AA + Aa + aa) é igual a 1, ou 100%. Esta lei é ditada pela equação  $(p+q)^2=1$ , em que p é a frequência do alelo A e q a do alelo a. Assim,  $p^2+2pq+q^2=1$ . Portanto pela lei de HW, a frequência esperada do genótipo AA é dada por (frequência observada de A)<sup>2</sup>, ao passo que para o genótipo aa é dada por a<sup>2</sup> e para o heterozigoto Aa é dada pelo 2Aa.

O grau de polimorfismo nos *loci* testados foi avaliado de acordo com o índice de heterozigosidade derivado da mesma lei de HW. A heterozigosidade observada é dada pela razão entre a quantidade de heterozigotos e o número total de indivíduos da amostra. A heterozigosidade esperada corresponde à frequência de heterozigotos na fórmula de HW (*i.e.* 2pq).

Para a análise do grau de diferenciação genética entre as populações e subpopulações da *L. (V.) braziliensis* nas amostras foi empregado o índice FST (índice de fixação). Para o

cálculo do FST nós empregamos a fórmula  $F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$ , que se baseia nos índices de heterozigosidade. Valores de FST entre 0,00 e 0,05 indicam pouca diferenciação genética; FST ente 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada; entre 0,15 e 0,25 indicam um alto nível de diferenciação genética; maiores que 0,25 indicam nível muito alto de diferenciação genética.

O grau de proximidade genética entre os alelos encontrados para cada um dos dois *loci* estudados (*i.e.* CHR 24/3074 e CHR 28/425451), nas amostras A e B, foi avaliado por meio de classificação cladística. Foi empregado o algoritmo Neighbour Joining para a agregação das sequências em um dendograma.

## VIII. RESULTADOS

### A) CHR 28/425451

#### 1. Análise descritiva dos alelos identificados no locus CHR 28/425451 e suas frequências nas amostras A e B

Na amostra A foram encontrados três alelos (*i.e* haplótipos de nucleotídeos nas posições polimórficas): “TT-”, “CCT” e “CC-” nas posições 30, 286 e 545, respectivamente. O alelo “CC-” foi excluído de nossas análises, devido a sua baixa frequência (Queiroz *et al.*, 2012). Na amostra B foram encontrados os mesmos alelos. As frequências desses alelos encontrados na amostra B podem ser observadas na tabela 1 e 2.

**Tabela 1-** Alelos e genótipos encontrados no CHR 28/425451 das *L. (V.) braziliensis* da amostra B

Isolados	Data	Formas clínicas	Genótipos	Alelos	
				TT-	CCT
18221	25/4/2008	LD	AA		X
18472	5/8/2008	LC	AA		X
18483	5/8/2008	LC	Aa	X	X
18487	5/8/2008	LC	Aa	X	X
18495	5/8/2008	LC	aa	X	
18513	15/8/2008	LC	Aa	X	X
18621	19/9/2008	LM	AA		X
18627	19/9/2008	LM	Aa	X	X
18643	19/9/2008	LC	aa	X	
18682	10/10/2008	LD	Aa	X	X
18809	28/11/2008	LC	Aa	X	X
18824	28/11/2008	LC	Aa	X	X
18839	28/11/2008	LC	Aa	X	X
18931	19/12/2008	LC	Aa	X	X
18978	9/1/2009	LC	Aa	X	X
19035	23/1/2009	LD	Aa	X	X
19039	23/1/2009	LC	AA		X
19077	23/1/2009	LC	Aa	X	X
19156	13/2/2009	LC	Aa	X	X
19164	13/2/2009	LC	Aa	X	X
19179	13/2/2009	LC	Aa	X	X
19243	6/3/2009	LC	Aa	X	X
19253	6/3/2009	LC	Aa	X	X

19257	6/3/2009	LC	Aa	X	X
19258	6/3/2009	LC	Aa	X	X
19281	6/3/2009	LD	AA		X
19319	20/3/2009	LD	AA		X
19323	20/3/2009	LC	AA		X
19336	20/3/2009	LC	AA		X
19353	3/4/2009	LC	aa	X	
19367	3/4/2009	LC	Aa	X	X
19432	17/4/2009	LC	Aa	X	X
19446	8/5/2009	LC	Aa	X	X
19548	29/5/2009	LC	Aa	X	X
19565	29/5/2009	LC	aa	X	
19635	10/7/2009	LC	Aa	X	X
19683	10/7/2009	LC	Aa	X	X
19689	10/7/2009	LD	AA		X
19692	10/7/2009	LD	Aa	X	X
19735	7/8/2009	LC	aa	X	
19737	7/8/2009	LC	Aa	X	X
19748	7/8/2009	LM	Aa	X	X
19758	7/8/2009	LC	AA		X
19805	21/8/2009	LC	AA		X
19837	11/9/2009	LC	Aa	X	X
19848	11/9/2009	LC	Aa	X	X
19882	2/10/2009	LC	AA		X
19897	2/10/2009	LC	Aa	X	X
19898	2/10/2009	LD	Aa	X	X
19903	2/10/2009	LC	aa	X	
19247	23/10/2009	LM	Aa	X	X
19913	23/10/2009	LM	Aa	X	X
19933	23/10/2009	LC	Aa	X	X
19940	23/10/2009	LC	Aa	X	X
19944	23/10/2009	LC	Aa	X	X
19949	23/10/2009	LC	AA		X
19976	5/11/2009	LC	Aa	X	X
20134	18/12/2009	LC	Aa	X	X
20164	8/1/2010	LC	AA		X
20183	8/1/2010	LD	aa	X	
20190	8/1/2010	LC	aa	X	
20195	8/1/2010	LM	Aa	X	X
20206	8/1/2010	LC	AA		X
20213	8/1/2010	LC	Aa	X	X
20221	8/1/2010	LC	AA		X
20497	5/3/2010	LC	AA		X
20509	5/3/2010	LD	Aa	X	X
20562	5/3/2010	LC	AA		X
20569	5/3/2010	LC	Aa	X	X



20385	26/3/2010	LD	AA		X
20638	26/3/2010	LC	AA		X
20768	9/4/2010	LC	Aa	X	X
21009	14/5/2010	LD	aa	X	
20993	28/5/2010	LD	AA		X
21043	28/5/2010	LD	AA		X
21105	18/6/2010	LD	Aa	X	X
21147	9/7/2010	LC	AA		X
21156	9/7/2010	LC	Aa	X	X
21159	9/7/2010	LC	AA		X
21163	9/7/2010	LD	AA		X
21177	9/7/2010	LC	AA		X
21316	27/8/2010	LD	Aa	X	X
21340	27/8/2010	LC	AA		X
21386	17/9/2010	LD	AA		X
21431	17/9/2010	LC	AA		X
21487	17/9/2010	LM	aa	X	
21504	1/10/2010	LC	aa	X	
21514	1/10/2010	LC	aa	X	
21592	5/11/2010	LC	AA		X
21686	17/12/2010	LD	Aa	X	X
21714	17/12/2010	LM	Aa	X	X
21787	21/1/2011	LC	Aa	X	X
21803	21/1/2011	LC	Aa	X	X
21820	21/1/2011	LC	AA		X
21822	21/1/2011	LC	Aa	X	X
21860	1/2/2011	LC	Aa	X	X
21720	11/2/2011	LM	aa	X	
21849	11/2/2011	LC	Aa	X	X
21857	11/2/2011	LC	Aa	X	X
21858	11/2/2011	LC	aa	X	
21983	18/3/2011	LC	aa	X	
22006	18/3/2011	LC	Aa	X	X
22037	18/3/2011	LC	AA		X
22039	18/3/2011	LC	Aa	X	X
22069	8/4/2011	LC	Aa	X	X
22148	29/4/2011	LD	Aa	X	X
22247	13/5/2011	LC	Aa	X	X
22265	13/5/2011	LC	Aa	X	X

LC = Leishmaniose cutânea; LM = Leishmaniose mucosa; LD = Leishmaniose disseminada.

**Tabela 2-** Frequências alélicas e genotípicas do CHR 28/425451 dos isolados das amostras A e B

Amostras	Frequências alélicas		Frequências genotípicas		
	Alelos		Genótipos Observados		
	A = p	a = q	AA	Aa	aa
<b>Amostra A</b> N=35	p=10x2+18/70 p=0,54	q=7x2+18/70 q=0,46	10/35= 0,29 29%	18/35=0,51 51%	7/35=0,2 20%
<b>Amostra B</b> N=108	p=32x2+61/216 p=0.58	q=15x2+61/216 q=0.42	32/108=0,3 30%	61/108=0,56 56%	15/108=0,14 14%

## 2. Avaliação das frequências e contagens genotípicas e seus estados de equilíbrio nas amostras A e B

A tabela 3 mostra as frequências observadas para os genótipos formados pelos dois alelos mais frequentes no *locus* do CHR 28/425451 nas amostras A e B. Nessa tabela também podem ser encontradas as frequências esperadas para os três genótipos (*i.e* homozigotos e heterozigoto), que foram calculadas segundo a lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nesta lei as frequências dos homozigotos correspondem aos quadrados das frequências dos seus específicos alelos, ao passo que as frequências dos heterozigotos correspondem ao produto da multiplicação  $2pq$ , onde p e q são os alelos em questão. Os resultados das frequências genotípicas esperadas refletem o que ocorreria se esses genótipos se encontrassem em equilíbrio na população avaliada. Assim, esses valores são estatisticamente comparados pelo  $\chi^2$  com os valores observados. Se as frequências não forem significativamente distintas entre si (*i.e.*  $p > 0,05$ ), então podemos concluir que os genótipos observados estão em equilíbrio na população estudada.

As tabelas 4 e 5 mostram os passos nos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos nas amostras A (tabela 4) e B (tabela 5). Para ambas as amostras, as comparações das contagens observadas e esperadas dos genótipos resultaram não significantes pelo teste do  $\chi^2$  (amostra A,  $p = 0,76$ ; amostra B,  $p = 0,09$ ). Portanto concluímos que os

genótipos baseados nos dois alelos mais frequentes (*i.e* “CCT” e “TT-”) estão em equilíbrio na população avaliada, em ambos os períodos analisados: 1992-2001 e 2008-2011.

**Tabela 3-** Frequências observadas e esperadas do CHR 28/425451 dos isolados das amostras A e B

Genótipo	Frequências Observadas % (n)		Frequências Esperadas % (n)	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
AA	31,42 (11)	30 (32)	32,66 (11,43)	33,64 (36,33)
Aa	51,43 (18)	56 (61)	48,97 (17,14)	48,69 (52,59)
aa	17,14 (6)	14 (15)	18,37 (6,43)	17,64 (19,05)
<b>Total</b>	100 (35)	100 (108)	100 (35)	100 (108)

**Tabela 4.** Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra A.

<b>1. Cálculo das frequências alélicas</b>	$p=10 \times 2 + 18 / 70$ $p=0,54$ $q=7 \times 2 + 18 / 70$ $q=0,46$
<b>2. Cálculo das frequências genotípicas, usando o modelo HW</b>	$p^2=(0,54)^2= 0,2916$ $2pq= 2. (0,54). (0,46) = 0,4968$ $q^2=(0,46)^2= 0,2116$
<b>3. Cálculo do número esperado de indivíduos de cada genótipo</b>	Esperado de indivíduos AA = $0,2916 \times 35 = 10,206$ Esperado de indivíduos Aa = $0,4968 \times 35 = 17,388$ Esperado de indivíduos aa = $0,2116 \times 35 = 7,406$
<b>4. Teste <math>\chi^2</math> para avaliação da hipótese nula</b>	$AA, \chi^2 = (10 - 10,206)^2 / 10,206 = 0,004$ $Aa, \chi^2 = (18 - 17,388)^2 / 17,388 = 0,02$ $aa, \chi^2 = (7 - 7,4)^2 / 7,4 = 0,02$ $\Sigma \chi^2 = 0,04; p = 0,12$

**Tabela 5.** Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra B.

<b>1. Cálculo das frequências alélicas</b>	$p=32 \times 2 + 61 / 216$ $p=0,58$ $q=15 \times 2 + 61 / 216$ $q=0,42$
<b>2. Cálculo das frequências genotípicas, usando o modelo HW</b>	$p^2=(0,58)^2= 0,3364$ $2pq= 2. (0,48). (0,42) = 0,487$ $q^2=(0,42)^2=0,1764$
<b>3. Cálculo do número esperado de indivíduos de cada genótipo</b>	Esperado de indivíduos AA = $0,3364 \times 108 = 36,33$ Esperado de indivíduos Aa = $0,487 \times 108 = 52,59$ Esperado de indivíduos aa = $0,1764 \times 108 = 19,05$

---

<b>4. Teste <math>\chi^2</math> para avaliação da hipótese nula</b>	AA: $\chi^2 = (32 - 36,33)^2/36,33 = 0,516$
	Aa: $\chi^2 = (61 - 52,59)^2/ 52,59 = 1,345$
	aa: $\chi^2 = (15 - 19,05)^2/19,05 = 0,861$
	$\Sigma x^2 = 2,722$ ; p = 0,0998

---

### 3. Avaliação da heterozigosidade global e estratificada por forma de LTA no *locus* CHR 28/425451

Na tabela 6 estão os valores da heterozigosidade observada e esperada para o *locus* do CHR 28/425451. Nessa tabela temos os valores de heterozigosidade globais e estratificada por forma clínica tanto para a amostra A quanto para a B. Em 1992-2001 a heterozigosidade observada global foi de 0,51, enquanto no período 2008-2011 foi de 0,56. Em ambas as amostras a heterozigosidade observada em parasitas oriundos de casos de LD foi marcadamente distinta daquelas das *L.(V.) braziliensis* de provenientes LC e LM. Isso nos sugere que os parasitas associados à LD correspondam a uma subpopulação distinta daquela que classicamente tem causado LC e LM em CP.

**Tabela 6-** Heterozigosidade observada e esperada do CHR 28/425451 da amostra A e B.

	<b>HO</b> <b>Amostra A</b>	<b>HO</b> <b>Amostra B</b>	<b>HE</b> <b>Amostra A</b>	<b>HE</b> <b>Amostra B</b>
<b>LC</b>	41%	58,22%	49%	49%
<b>LM</b>	33%	66,67%	49%	49,28%
<b>LD</b>	78%	45%	45%	44,22%
<b>Global</b>	51%	56,48%	49%	48,72%

HO = heterozigosidade observada; HE = Heterosigosidade esperada; LC = Leishmaniose cutânea; LM = Leishmaniose mucosa; LD = Leishmaniose disseminada.

### 4. Avaliação do grau de diferenciação genética (FST) entre a *L. (V.) braziliensis* das amostras A e B, e de diferentes formas de LTA

Observa-se que a fixação de alelos dentro de populações para o *locus* estudado variou de 0,0036 a 0,0325 para a amostra A e de 0,0011 a 0,036 para a amostra B. Sendo assim, demonstra-se pouca diferenciação genética quando comparadas as formas clínicas entre si,

dentro das amostras A e B, respectivamente; bem como quando comparadas as totalidades das amostras A e B, somando-se todas as suas formas LTA. Os valores do FST podem ser observados na tabela 7.

**Tabela 7:** Valores do FST das amostras A e B e entre as formas clínicas

Formas clínicas	Valor de FST
<b>Amostra A</b>	
LD x (LC+LM)	0,022
LC x (LD+LM)	0,0226
LM x (LC+LD)	0,0036
LD x LC	0,0325
LM x LC	0,0146
LC x LM x LD	0,0224
<b>Amostra B</b>	
LD x (LC+LM)	0,012
LC x (LD+LM)	0,0011
LM x (LC+LD)	0,020
LD x LC	0,01
LM x LC	0,017
LC x LM x LD	0,036
<b>Amostra A x B (valores totais)</b>	
(LC + LM + LD) x (LC + LM + LD)	0,0018

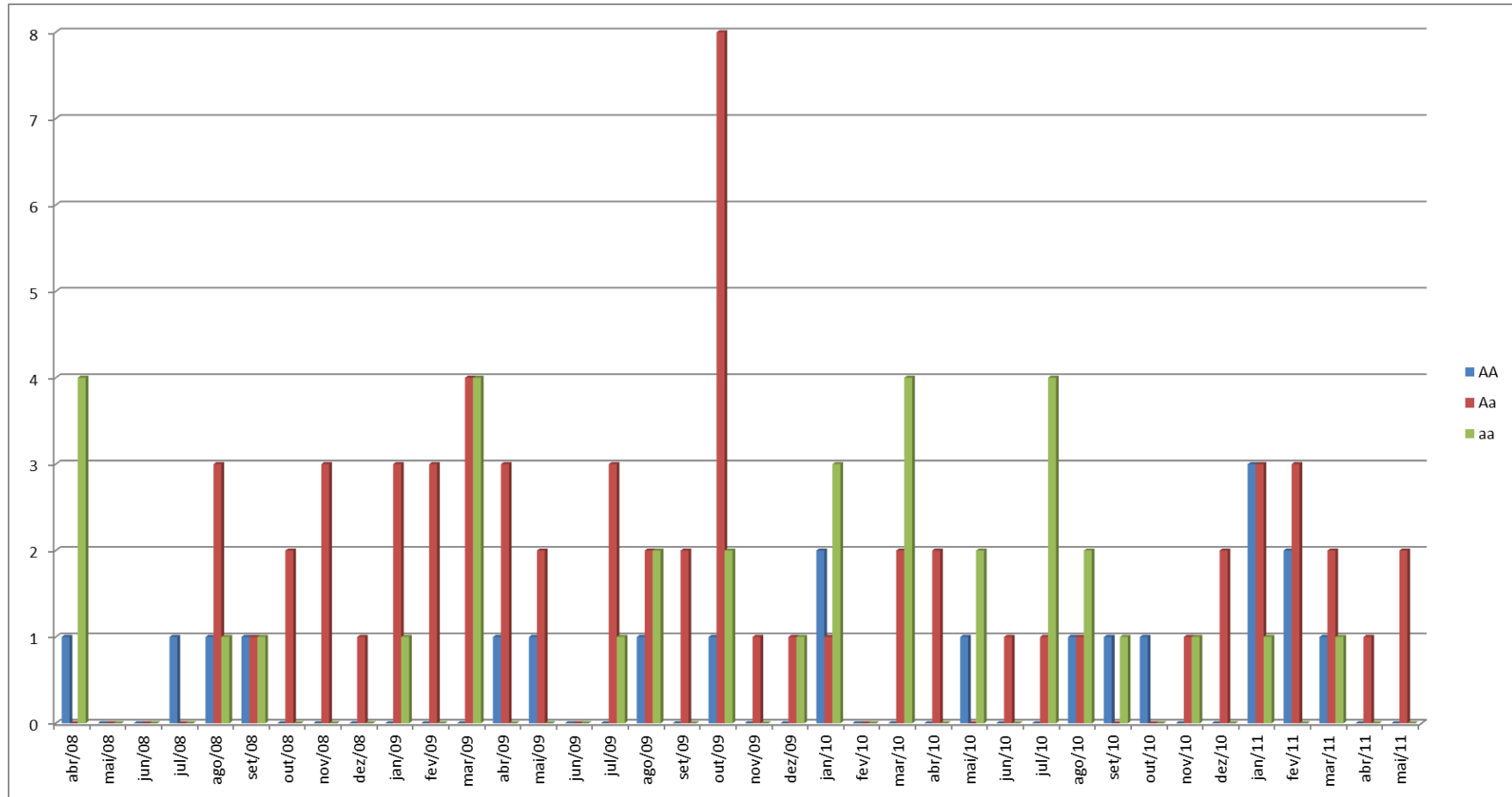
LC = Leishmaniose cutânea; LM = Leishmaniose mucosa; LD = Leishmaniose disseminada.

## 5. Avaliação da frequência dos genótipos do *locus* CHR 28/425451 entre 2008 e 2011 em CP

O gráfico na figura 4 representa a frequência dos genótipos encontrados no período de 2008-2011. O rendimento de isolamento da *L. (V.) braziliensis* de CP é de aproximadamente 50%, o que resulta em 4 a 10 cultivos positivos por viagem à área endêmica. Portanto, o panorama que podemos traçar nesta avaliação da referência de genótipos ao longo do tempo é limitado e pode sofrer com os efeitos do acaso. De qualquer forma, observamos que há uma presença constante de isolamento de um ou dois exemplares de genótipos parasitários (i. e. AA, Aa e aa) por amostragem mensal. Contudo, é perceptível que em vários dos meses há um predomínio de um dos genótipos, refletido em um isolamento de 3 na 8 exemplares daquele genótipo em particular. Isso sugere que surtos de casos de LTA por determinadas

cepas de *L. (V.) braziliensis* devam se sobrepor à ocorrência do padrão endêmico de transmissão em uma área afetada como CP.

**Figura 4:** Contagem dos alelos do CHR28/425451 ao longo do período de transmissão de *L. (V.) braziliensis* de 2008-2011 em CP.



## B) CHR 24/3074

### 1. Análise descritiva dos alelos identificados e nos *locus* CHR 24/3074 suas frequências nas amostras A e B

Na amostra A foram encontrados sete sítios polimórficos (176 (C/T), 311(T/C), 641 (A/-), 651 (G/A), 712 (A/T), 728 (A/G) e 749 (G/A)), enquanto na amostra B surgiram mais três sítios (22 (C/G), 25 (G/-) e 211(T/C)), resultando assim em dez sítios polimórficos. A partir dessas posições foram encontrados trinta haplótipos. Os mais frequentes na amostra A foram AGTAACT e GAAG-TC. Em relação à amostra B os alelos mais frequentes foram CGTTCCTGA e CGCTTGCAAA (tabela 8 e 9).

**Tabela 8-** Alelos e genótipos encontrados no CHR 24/3074 da amostra B

Isolados	Data	Formas clínicas	Alelos		Genótipos
			CGTTCCTGA	CGCTTGCAAA	
18205	abr/08	LC	X	X	Aa
18472	ago/08	LC	X	X	Aa
18483	ago/08	LC		X	AA
18485	ago/08	LC	X	X	Aa
18487	ago/08	LC	X	X	Aa
18495	ago/08	LC	X	X	Aa
18513	ago/08	LC		X	AA
18643	set/08	LC		X	AA
18809	nov/08	LC		X	AA
18824	nov/08	LC		X	AA
18839	nov/08	LC		X	AA
18978	jan/09	LC		X	AA
19039	jan/09	LC	X	X	Aa
19077	jan/09	LC		X	AA
19156	fev/09	LC		X	AA
19164	fev/09	LC		X	AA
19228	mar/09	LC		X	AA
19258	mar/09	LC	X	X	Aa
19323	mar/09	LC	X	X	Aa
19367	abr/09	LC		X	AA
19432	abr/09	LC		X	AA
19446	mai/09	LC		X	AA
19456	mai/09	LC		X	AA



19565	mai/09	LC		X	AA
19635	jul/09	LC	X	X	Aa
19683	jul/09	LC	X	X	Aa
19734	ago/09	LC	X	X	Aa
19735	ago/09	LC	X	X	Aa
19737	ago/09	LC		X	AA
19758	ago/09	LC	X	X	Aa
19805	ago/09	LC	X	X	Aa
19837	set/09	LC	X	X	Aa
19848	set/09	LC		X	AA
19879	out/09	LC	X	X	Aa
19882	out/09	LC		X	AA
19897	out/09	LC	X	X	Aa
19903	out/09	LC	X	X	Aa
19933	out/09	LC	X	X	Aa
19940	out/09	LC	X	X	Aa
19944	out/09	LC		X	AA
19949	out/09	LC		X	AA
19976	nov/09	LC		X	AA
20134	dez/09	LC		X	AA
20142	dez/09	LC	X	X	Aa
20164	jan/10	LC		X	AA
20190	jan/10	LC	X	X	Aa
20206	jan/10	LC	X	X	Aa
20213	jan/10	LC		X	AA
20221	jan/10	LC		X	AA
20497	mar/10	LC		X	AA
20562	mar/10	LC	X	X	Aa
20569	mar/10	LC		X	AA
20768	abr/10	LC	X	X	Aa
21147	jul/10	LC	X	X	Aa
21156	jul/10	LC		X	AA
21159	jul/10	LC	X		aa
21177	jul/10	LC	X		aa
21340	ago/10	LC	X	X	Aa
21431	set/10	LC	X	X	Aa
21504	out/10	LC	X	X	Aa
21514	out/10	LC		X	AA
21526	nov/10	LC	X	X	Aa
21592	nov/10	LC		X	AA
21683	dez/10	LC		X	AA
21696	dez/10	LC		X	AA
21787	jan/11	LC	X		aa
21803	jan/11	LC	X	X	Aa
21820	jan/11	LC		X	AA
21822	jan/11	LC		X	AA

21849	fev/11	LC		X	AA
21857	fev/11	LC		X	AA
21858	fev/11	LC		X	AA
21858	fev/11	LC		X	AA
21860	fev/11	LC		X	AA
21983	mar/11	LC		X	AA
21990	mar/11	LC		X	AA
22006	mar/11	LC		X	AA
22006	mar/11	LC		X	AA
22039	mar/11	LC		X	AA
22247	mai/11	LC		X	AA
18211	abr/08	LD	X	X	Aa
18221	abr/08	LD	X	X	Aa
18260	jul/08	LD	X	X	Aa
18682	out/08	LD		X	AA
19035	jan/09	LD		X	AA
19281	mar/09	LD		X	AA
19319	mar/09	LD	X	X	Aa
19561	mai/09	LD		X	AA
19644	jul/09	LD		X	AA
19689	jul/09	LD		X	AA
19692	jul/09	LD	X	X	Aa
19898	out/09	LD	X	X	Aa
20155	dez/09	LD	X	X	Aa
20183	jan/10	LD		X	AA
20385	mar/10	LD		X	AA
20509	mar/10	LD		X	AA
20993	mai/10	LD		X	AA
21009	mai/10	LD		X	AA
21043	mai/10	LD	X	X	Aa
21105	jun/10	LD		X	AA
21163	jul/10	LD	X	X	Aa
21316	ago/10	LD		X	AA
21386	set/10	LD		X	AA
21686	dez/10	LD	X	X	Aa
18621	set/08	LM		X	AA
18627	set/08	LM		X	AA
19247	out/09	LM		X	AA
19748	ago/09	LM	X	X	Aa
19913	out/09	LM	X	X	Aa
20195	jan/10	LM		X	AA
21487	set/10	LM		X	AA
21714	dez/10	LM		X	AA
21720	fev/11	LM		X	AA

LC = Leishmaniose cutânea; LM = Leishmaniose mucosa; LD = Leishmaniose disseminada.

**Tabela 9-** Frequências alélicas e genotípicas do CHR 24/3074 dos isolados das amostras A e B

Amostras	Frequências alélicas		Frequências genotípicas		
	Alelos		Genótipos		
	A=p	a=q	AA	Aa	aa
<b>Amostra A</b> <b>N=35</b>	$p = \frac{27 \times 2 + 7}{70}$ p=0,87	$q = \frac{1 \times 2 + 7}{70}$ q=0,13	$\frac{27}{35} = 0,77$ 77%	$\frac{7}{35} = 0,2$ 20%	$\frac{1}{35} = 0,02$ 2%
<b>Amostra B</b> <b>N=115</b>	$p = \frac{67 \times 2 + 43}{230}$ p=0,77	$q = \frac{5 \times 2 + 43}{230}$ q=0,23	$\frac{67}{115} = 0,58$ 58%	$\frac{43}{115} = 0,37$ 37%	$\frac{5}{115} = 0,04$ 4%

## 2. Avaliação das frequências e contagens genotípicas e seus estados de equilíbrio nas amostras A e B

O excessivo número de haplótipos encontrados no *locus* CHR 24/3074, aliado a observação que 41 isolados de *L. (V.) brazileinsis* apresentaram 3 ou 4 haplótipos distintos indicam uma maior plasticidade acometa esse *locus* ou todo cromossomo 24, uma vez que o genoma da leishmania frequentemente é acometido por aneuploidia. De qualquer forma, buscamos validar os achados relativos às avaliações no *locus* CHR 28/425451. Para isso empregamos os genótipos formados pelos dois alelos mais frequentes no CHR 24/3074.

A tabela 10 mostra as frequências observadas para os genótipos formados pelos dois alelos mais frequentes no *locus* do CHR 24/3074 nas amostras A e B. Nessa tabela também foram calculadas as frequências esperadas para os três genótipos (*i.e* homocigotos e heterocigoto), segundo a lei do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A tabela 11 e 12 mostram os passos nos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos nas amostras A (tabela 11) e B (tabela 12). Para ambas as amostras, as comparações das contagens observadas e esperadas dos genótipos resultaram em não significante pelo teste do  $\chi^2$  (amostra A,  $p = 0,52$ ; amostra B,  $p = 0,56$ ). Portanto, concluímos que os genótipos baseados nos dois alelos mais frequentes (*i.e* “AGTAACT” e “GAAG-TC” na amostra A e

“CGTTCACTGA” e “CGCTTGCAAA” na amostra B”) estão em equilíbrio na população avaliada, em ambos os períodos analisados: 1992-2001 e 2008-2011.

**Tabela 10-** Frequências observadas e esperadas do CHR 24/3074 dos isolados das amostras A e B

Genótipo	Frequências Observadas % (n)		Frequências Esperadas % (n)	
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
AA	77,14 (27)	58,26 (67)	76 (26,6)	58,29 (68,18)
Aa	20 (7)	37,39 (43)	22,28 (43)	35,42 (40,73)
aa	2,85 (1)	4,35 (5)	1,71 (5)	5,29 (6,08)
<b>Total</b>	<b>100 (35)</b>	<b>100 (115)</b>	<b>100 (35)</b>	<b>100 (115)</b>

**Tabela 11.** Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra A

<b>1. Cálculo das frequências alélicas</b>	$p=27 \times 2 + 7 / 70$ $p=0,87$ $q=1 \times 2 + 7 / 70$ $q=0,13$
<b>2. Cálculo das frequências genotípicas, usando o modelo HW</b>	$p^2=(0,87)^2=0,7569$ $2pq=2 \cdot (0,87) \cdot (0,13)=0,2262$ $q^2=(0,13)^2=0,0169$
<b>3. Cálculo do número esperado de indivíduos de cada genótipo</b>	Esperado de indivíduos $pp=0,7569 \times 35=26,6$ Esperado de indivíduos $Aa=0,2262 \times 35=7,8$ Esperado de indivíduos $aa=0,0169 \times 35=0,6$
<b>4. Teste <math>\chi^2</math> para avaliação da hipótese nula</b>	Para AA, $\chi^2=(27-26,6)^2/26,6=0,007$ For Aa, $\chi^2=(7-7,8)^2/7,8=0,09$ For aa, $\chi^2=(1-0,6)^2/0,6=0,27$ $\Sigma \chi^2=0,3, p=0,52$

**Tabela 12.** Passos dos cálculos das frequências e contagens esperadas para os três genótipos na amostra B

<b>1. Cálculo das frequências alélicas</b>	$p=67 \times 2 + 43 / 230$ $p=0,77$ $q=5 \times 2 + 43 / 230$ $q=0,23$
<b>2. Cálculo das frequências genotípicas, usando o modelo HW</b>	$p^2=(0,77)^2=0,5926$ $2pq=2 \cdot (0,77) \cdot (0,23)=0,35$ $q^2=(0,23)^2=0,05$
<b>3. Cálculo do número esperado de indivíduos de cada genótipo</b>	Esperado de indivíduos $pp=0,5926 \times 115=68,18$ Esperado de indivíduos $Aa=0,35 \times 115=40,73$ Esperado de indivíduos $aa=0,05 \times 115=5,73$

6,08

---

<b>4. Teste <math>\chi^2</math> para avaliação da hipótese nula</b>	Para AA, $\chi = (67-68,18)^2/68,18=0,03$ For Aa, $\chi^2 = (43-40,73)^2/40,73=0,12$ For aa, $\chi^2 = (5-6,08)^2/6,08=0,19$ $\Sigma^2=0,34$ , p= 0,56
---	---

---

HW: Hardy-Weinberg

### 3. Avaliação da heterozigosidade global e estratificada por forma de LTA no *locus* CHR 24/3074

Na tabela 12 estão os valores da heterozigosidade observada (HO) e esperada (HE) para o *locus* do CHR 24/3074, calculadas em bases nos dois alelos mais frequentes nesse *locus* já mencionada nas seções precedentes. Nessa tabela temos os valores de heterozigosidade globais e estratificada por forma clínica tanto para a amostra A quanto para a B. Em 1992-2001 a heterozigosidade global observada foi de 0,20, enquanto que no período de 2008-2011 foi de 0,37. Em ambas as amostras, a heterozigosidade observada em parasitas oriundos de casos de LD foi marcadamente distinta daquelas observadas nas *L. (V.) braziliensis* provenientes LC e LM.

**Tabela 13-** Heterozigosidade observada e esperada do CHR 24/3074 da amostra A e B

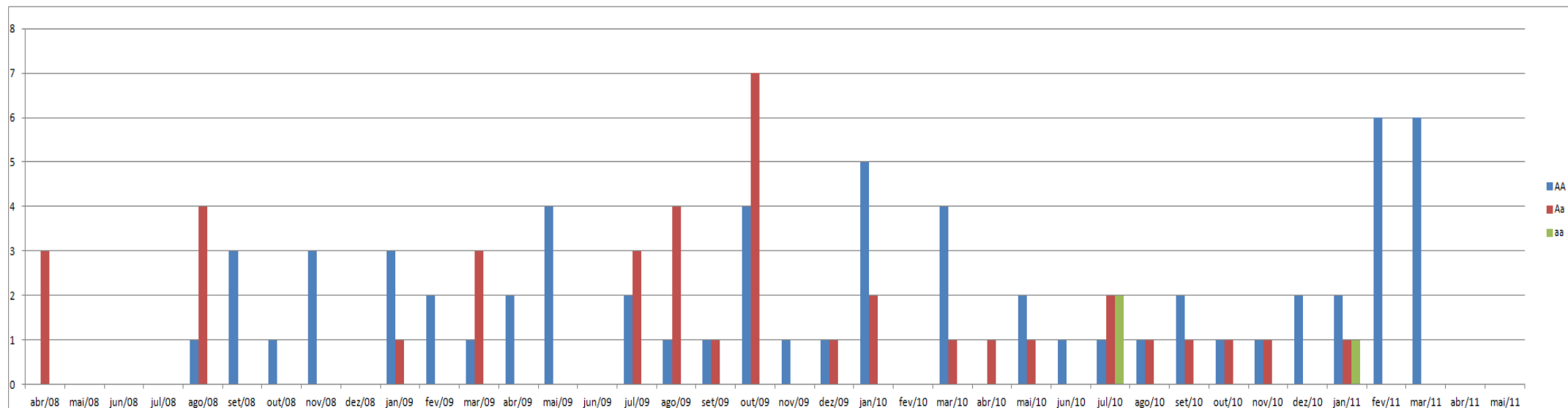
Formas clínicas	HO	HO	HE	HE
	Amostra A	Amostra B	Amostra A	Amostra B
LC	25%	38%	22%	37%
LM	33%	22%	28%	49%
LD	11%	42%	28%	37%
<b>Global</b>	20%	37%	22%	35%

HO = heterozigosidade observada; HE = Heterosigosidade esperada; LC = Leishmaniose cutânea; LM = Leishmaniose mucosa; LD = Leishmaniose disseminada.

### 4. Avaliação da frequência a dos genótipos do *locus* CHR 24/3074 entre 2008 e 2011 em CP

Como observado para o *locus* CHR 24/3074, a figura 5 mostra que há uma presença constante de isolamento de um ou dois exemplares de genótipos parasitários (*i.e.* AA, Aa e aa) por amostragem mensal. Contudo, é perceptível que em vários meses há um predomínio de um dos genótipos, refletido em um isolamento de 3 a 7 exemplares daquele (s) genótipo (s) particulares.

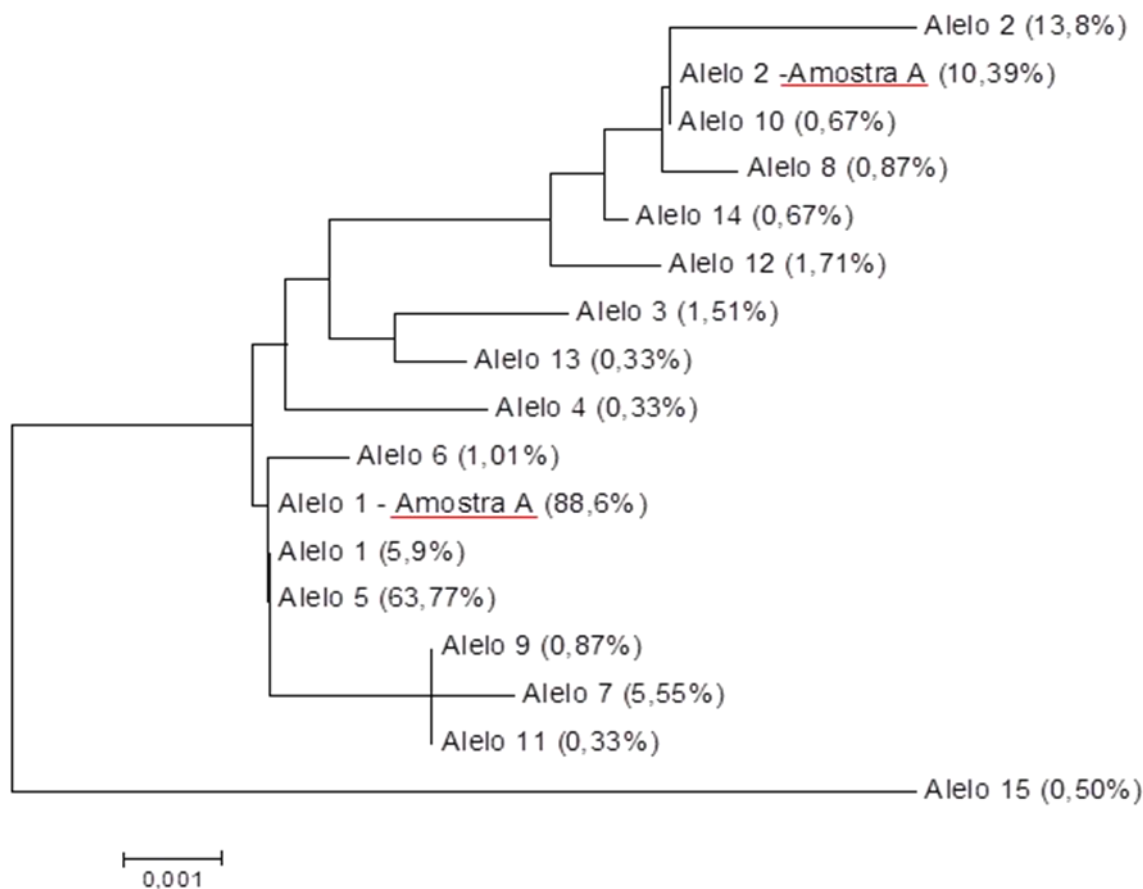
**Figura 5:** Contagens dos alelos do CHR 24/3074 ao longo do período de transmissão de *L. (V.) braziliensis* 2008-2011 em CP



## 5. Classificação dos alelos observados para o locus CHR 24/3074 nas amostras A e B

Na árvore gerada por Neighbor Joining NJ (Figura 6) foi possível verificar três unidades taxonômicas operacionais (OTUS). A primeira dicotomia separa os alelos referentes às amostras provenientes da região de CP, a primeira encontramos o alelo 2 referentes aos dois períodos, além dos alelos 3, 4, 8, 10,13 e 14. Na segunda dicotomia encontramos o alelo1 referente aos dos dois períodos e também os alelos 5, 6, 7, 9 e 11. O alelo 15 foi ficou distante em relação às outras duas.

**Figura 6:** Classificação cladística dos alelos encontrados no locus CHR24/3074 da *L. (V.) braziliensis* em CP. Árvore Neighbour Joinning (NJ) baseada nas sequências completas de cada alelo.



## IX. DISCUSSÃO

A genética da população tem sido empregada em trabalhos relacionados com parasitas do gênero da *Leishmania*, principalmente para a compreensão da reprodução. A incerteza sobre como ocorre este processo compromete o conhecimento aprofundado da epidemiologia e da evolução destes parasitas. Diversos trabalhos têm analisado a forma com o qual ocorre a reprodução da *Leishmania*: se é clonal ou sexuada. Esse estudo aborda de forma pioneira a genética de população em uma região com transmissão natural do parasito da leishmaniasis.

Estudos prévios apontam para possível existência de clonalidade e de recombinação entre diferentes isolados. Análises prévias realizadas pela técnica de AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) com *L. panamensis* sugere um modo predominante de reprodução clonal (Restrepo *et al*, 2013). No entanto estudos prévios realizados com a *L. major* encontraram um número alto de híbridos gerados entre várias estirpes, confirmando que a reprodução sexuada é um aspecto normal da estratégia reprodutiva desses parasitos (Inbar *et al*, 2013). Outros trabalhos também mostram a existência de híbridos interespecíficos entre *Leishmania*, sendo estes presentes no Novo Mundo: *L. braziliensis* e *L. peruviana*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, *L. braziliensis* e *L. panamensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Belli, 1994, Dujardin, 1995; Bañuls, 1997; Nolder *et al.*, 2007; Cortes, 2012), e no Velho Mundo: *L. major* e *L. arabica*, *L. infantum* e *L. donovani*, *L. donovani* e *L. major*, *L. infantum* e *L. major* (Kelly *et al*, 1991; Ravel *et al.*, 2006; Lukes *et al*, 2007; Volf *et al.*, 2007; Chargui *et al*, 2009; Odiwuor *et al*, 2011).

Estudos realizados por Akopyants *et al* (2009) conseguiram produzir descendentes híbridos com o uso de cepas de *Leishmania* resistentes a diferentes drogas seletivas, o que evidencia a existência de troca de material genético entre cepas de *Leishmania major* no



intestino de vetores. Um estudo recente realizado na província da Turquia com 12 estirpes de *L. Infantum* demonstrou o ciclo da leishmania no intestino do flebótomo. Utilizou-se para tanto, o sequenciamento do genoma inteiro, confirmando a existência de descendentes de uma cepa híbrida de *Leishmania*, produzidos a partir de um único cruzamento entre um dos pais relacionados (Rogers *et al.*, 2014).

Nas análises realizadas com alelos de *L. (V.) braziliensis* no Peru e na Bolívia foi encontrada uma média de  $12,4 \pm 4,4$  alelos por *locus* avaliado em 12 *loci* microsatélites (Rougeron *et al.*, 2009). No Brasil, com o subgênero *Viannia*, o número de alelos variou entre 7 a 29 com base em 15 marcadores microsatélites (Kuhls *et al.*, 2013). Em estudos realizados com base nos resultados de doze estados brasileiros, a partir da MLSA, cepas de *L. (V.) braziliensis* em uma das populações apresentaram o maior número médio de alelos por *locus* (23,3), enquanto as duas outras foram semelhantes em número médio de alelos, em torno de cinco alelos por *locus* (Marlow *et al.*, 2014). Ao analisarmos os dois cromossomos, o CHR 24/3074 (15 alelos) obteve uma quantidade de alelos maior do que o CHR 28/425451 (5 alelos).

No estudo presente, houve uma permanência dos genótipos encontrados no CHR 28/425451 em ambas as amostras estudadas. No entanto, os resultados para o CHR 24/3074 demonstraram a manutenção de alguns genótipos e surgimento de novos; e isso se deve à presença de novos SNP'S, o que sugere que esse aparecimento se deve a entrada de nova cepa na região. No caso do CHR 28/425451, trabalhos realizados em algumas áreas geográficas no Brasil demonstraram que a maioria dos genótipos se mantém em um determinado período de tempo (Cupollilo *et al.*, 2003). No entanto, a presença de genótipos mistos foi encontrada entre as duas sub-populações do Marrocos, o que sugere a ocorrência de fluxo gênico entre elas (Amro *et al.*, 2013).

Neste trabalho, apesar de terem sido encontrados mais de 5 alelos por cromossomo, os cálculos de heterozigosidade foram baseados na suposição de diploidia (mantiveram-se os alelos mais frequentes). O estudo sugere também uma intensa relação entre heterozigosidade e a forma clínica, visível diante da comparação da heterozigosidade encontrada para LD às outras formas clínicas (LC e LM), sendo a LD menor que as demais. Recentemente foram encontrados no genoma da população de *Leishmania* no velho mundo baixos níveis de heterozigosidade, no qual a *L. major* e *L. infantum* em comparação com *L. mexicana* e *L. braziliensis* obteve menor heterozigosidade, podendo estes ser resultados de endogamia (Rogers *et al.*, 2011).

Estudos trazem os baixos níveis de heterozigosidade observada em populações de *Leishmania*, possivelmente devido à reprodução sexual frequente por autofecundação, o que também se mostra teoricamente incompatíveis com o modelo de reprodução estritamente clonal proposto (Rougeron *et al.*, 2009; Kuhls *et al.*, 2007). A heterozigosidade observada no total do subgênero *L. (Viannia)*, por marcador analisado foi menor do que o esperado (Kuhls *et al.*, 2013). A estrutura da população de *L. infantum* na Europa também apresentou níveis baixos de heterozigosidades observados em relação aos esperados. Nesse resultado há indicação de fluxo gênico, recombinação e nenhuma diferenciação entre as zimodemas (Gouzelou *et al.*, 2013). Estudo realizado por Baleela *et al.* (2014) detectou um nível de heterozigosidade reduzida nas populações de *Leishmania donovani* estudadas no Sudão. Da mesma forma em que as linhagens indianas da *L. tropica* em heterozigosidade observada foram menores do que a heterozigosidade esperada para todos os *loci* (Krayter *et al.*, 2014).

Nos resultados referentes aos *loci* do CHR 28/425451 e do CHR 24/3074 não ocorreram desvios das premissas do equilíbrio de HWE, o que suporta a ideia de ausência de seleção, deriva, mistura populacional ou formas de acasalamento não aleatórias. Nenhum organismo real é perfeitamente panmítico, o que levanta a questão de como distinguir ausência de reprodução sexual a partir dos efeitos da subdivisão da população, ou seja, desvios de acasalamento ao acaso

entre as populações com diferentes frequências alélicas. Os dados demonstraram que as duas amostras estudadas não alteraram as frequências, sugerindo tratar-se de uma troca de material genético. O surgimento recente de *L. (V.) braziliensis*, em Santa Catarina, mostrou a homogeneidade entre as cepas analisadas. De acordo com EHW, não houve mutações ou migrações que possam ter alterado essas frequências (Marlow *et al*, 2014).

No estudo de Rougeron *et al* (2009) referente à diferenciação genética houve uma pequena diferenciação temporal entre os períodos de 1993 e 1994 (Peru), e uma aparentemente maior entre os períodos de 1994 e 1998 (Bolívia); considerando esses resultados como consequência de reprodução sexual. O FST na Ásia/Índia variou entre 0,30 e 0,65; confirmando que estes dois grupos estão claramente separados (Krayter *et al*, 2014). No Brasil, analisando doze estados, a POP1 (composta pelos seguintes estados: AC, AM, BA, CE, ES, MG, PA, PB, PE, RJ, RO e SC), e POP3 (BA, PA, PE e RJ) mostraram diferenciação genética moderada, enquanto POP2 (BA, MG, PE, SC) mostrou grande diferenciação genética (Marlow *et al.*, 2013). O nível de FST das nossas análises referentes ao CHR 28/425451 mostrou uma pequena diferenciação. Podemos observar que ao compararmos as duas amostras, o FST da amostra A variou de 0,0036 e 0,022, enquanto na amostra B o FST variou de 0,0011 e 0,036 e entre as amostras obteve um valor reduzido. Isso indica que a população da *L. (V.) braziliensis* tem se mantido constante por um longo período de tempo em CP.

O conhecimento da estrutura da população e estratégia reprodutiva de *Leishmania* proporcionaria uma melhor compreensão dos seus padrões de transmissão, bem como informações úteis para fins de diagnóstico, estudos epidemiológicos e de drogas e desenvolvimento de vacinas (Rougeron *et al*, 2009). Até então se sabe que fatores de risco para leishmaniose clínica ainda são pouco conhecidos e, provavelmente, são influenciados por características do hospedeiro e do parasita (Cupolillo *et al.*, 2003).

## **X. PERSPECTIVAS DE ESTUDO**

- Analisar o EHW no genoma total da *Leishmania (Viannia) braziliensis* da região de Corte de Pedra.

## XI. CONCLUSÕES

1. Os alelos da *L. (V.) braziliensis* locus CHR28/425451 e CHR 24/3074, observada entre 2008-2011 na CP, sugere que as endemias LTA são mantidas por surtos de genótipos do parasita (ou seja, amostras), que podem diferir de uma estação de transmissão para outra.
2. O HWE detectado para os genótipos no local CHR28/425451 e CHR 24/3074 sugere que a troca de material genético entre *L. (V.) braziliensis* em populações naturais é frequente, provavelmente através de reprodução sexual.
3. Os parasitas envolvidos no LD podem ter sido recentemente incorporados à população *L. (V.) braziliensis* causando LTA na CP, refletindo a menor heterozigosidade encontrada em seu locus CHR28/425451 em comparação a dos parasitas isolados de LC e LM.
4. Os achados indicam que marcadores de cepas associadas a desfechos clínicos e terapêuticos precisam ser renovados periodicamente, ou devem ser identificados marcadores em ligação com os genes envolvidos nesses desfechos.

## XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amro A, Hamdi S, Lemrani M, Mouna I, Mohammed H, Mostafa S, Rhajaoui M, Hamarsheh O, Schönian G. Moroccan *Leishmania infantum*: genetic diversity and population structure as revealed by multi-locus microsatellite typing. *PLoS One*. 2013 Oct 17;8(10):e77778. doi: 10.1371/journal.pone.0077778. eCollection 2013.

Akopyants NS(1), Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. 2009 Apr 10; 324(5924):265-8. doi: 10.1126/science.1169464..

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7(5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671. Epub 2012 May 31.

Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v.30, p.1269-1281, 2000.

Azulay RD; Azulay RDJr. 1995. Immune clinical pathologic espectrum of leishmaniasis. *Int. J. Dermatol*. 34: 303-307.

Bacellar O, Machado P, Carvalho E. Resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Humana. *Leishmaniose Tegumentar nas Américas*, Barral A, Costa Jackson, Capítulo 11, pag. 114-122, 2011,248 f.

Baleela R, Llewellyn MS, Fitzpatrick S, Kuhls K, Schönian G, Miles MA, Mauricio IL. *Leishmania donovani* populations in Eastern Sudan: temporal structuring and a link between human and canine transmission. *Parasit Vectors*. 2014 Nov 20; 7(1):496.

Bañuls AL, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, Guderian R, Echeverria R, Tibayrenc M. Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *J Eukaryot Microbiol*. 1997 Sep-Oct;44(5):408-11.

Bates P.A. Transmission of *Leishmania metacyclic* promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol*. 2007; 37:1097–106.

Belli AA, Miles MA, Kelly JM. A putative *Leishmania panamensis*/*Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*. 1994 Nov;109 ( Pt 4):435-42.

Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007 Aug; 37(10):1063-75. Epub 2007 Mar 31.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(10):e313. doi: 10.1371/journal.pntd.0000313. Epub 2008 Oct 29.

Britto, C., C. Ravel, et al. (1998). "Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes." *Gene* 222(1): 107-117.

Carvalho, E. M, A Barral, J.M Costa, A Bittencourt, P Marsden. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta. Trop.* 56: 315-325.

Chargui N, Amro A, Haouas N, Schönian G, Babba H, Schmidt S, Ravel C, Lefebvre M, Bastien P, Chaker E, Aoun K, Zribi M, Kuhls K. Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *Int J Parasitol*. 2009 Jun; 39(7): 801-11. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.11.016. Epub 2009 Jan 12.

Cortes S, Esteves C, Maurício I, Maia C, Cristovão JM, Miles M, Campino L. In vitro and in vivo behaviour of sympatric *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*V.*) *peruviana* and their hybrids. *Parasitology*. 2012 Feb;139(2):191-9. doi: 10.1017/S0031182011001909. Epub 2011 Nov 7.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg*. 1986 Dec;89(6):319-23.

Coura, J.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Dinâmica das doenças infecciosas*, Ed. Guanabara Koogan, 1ª Edição, p. 706-7, 2005).

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of

Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul;41(7):3126-32.

Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q.* 1992;45(2-3):267-75.

Desjeux P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Sep; 2(9):692.

Dowlati, Y. (1996). "Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect." *Clin Dermatol* 14(5): 425-431.

Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, DeDoncker S, Jacquet D, Le Ray D, Arevalo J, Tibayrenc M. Putative Leishmania hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Trop.* 1995 Aug; 59(4):293-307.

Gardner C. O, Quantitative genetic studies and population improvement in maize and sorghum. In? Pollak, E.; Kempton, O.; Barley, T.B. Jr. (Ed.). *Breeding*. Ames: The Iowa State University press, 1977. P. 475-489.

Gontijo B, de Carvalho Mde L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003 Jan-Feb; 36(1):71-80. Epub 2003 Apr 22. Review. Portuguese.

Gibson W (1), Peacock L, Ferris V, Williams K, Bailey M. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in Trypanosoma brucei. *Parasit Vectors.* 2008 Feb 25;1(1):4. doi: 10.1186/1756-3305-1-4.

Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, Christodoulou V, Martinković F, Živičnjak T, Smirlis D, Pratlong F, Dedet JP, Özbel Y, Toz SÖ, Presber W, Schönian G, Soteriadou K. Genetic diversity and structure in Leishmania infantum populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasit Vectors.* 2013 Dec 5;6:342.

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

Guimarães L.H., Machado P.R.L., Lago E.L., Morgan D.J., Schriefer A., Bacellar O., Carvalho E.M. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of Leishmania braziliensis in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* 103(7): 712–715. 2009



Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol*. 1999;44:1-39. Review.

Holsinger KE, Weir BS. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . *Nat Rev Genet*. 2009 Sep; 10(9):639-50. doi: 10.1038/nrg2611. Review.

Inbar E, Akopyants NS, Charmoy M, Romano A, Lawyer P, Elnaiem DE, Kauffmann F, Barhoumi M, Grigg M, Owens K, Fay M, Dobson DE, Shaik J, Beverley SM, Sacks D. The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. *PLoS Genet*. 2013; 9(7):e1003672. doi: 10.1371/journal.pgen.1003672. Epub 2013 Jul 25.

Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." *Science* 309(5733): 436-442.

Jirmanus L, Glesby MJ, et al., (2012). "Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period". *Am J Trop Med Hyg* 86 (3):426-433.

Jones TC, et al. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. (1987).

Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJ, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Jun; 46(2): 253-63.

Kendrick killick-R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Med Vet Entomol*. 1990 Jan; 4(1):1-24.

Krayter L, Alam MZ, Rhajaoui M, Schnur LF, Schönián G. Multilocus Microsatellite Typing reveals intra-focal genetic diversity among strains of *Leishmania tropica* in Chichaoua Province, Morocco. *Infect Genet Evol*. 2014 Dec

Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schönián G. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect*. 2007 Mar;9(3):334-43. Epub 2007 Jan 9.

Kuhls K, Cupolillo E, Silva SO, Schweynoch C, Boité MC, Mello MN, Mauricio I, Miles M, Wirth T, Schönián G. Population structure and evidence for both clonality and recombination

among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania* (Viannia). *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Oct 31;7(10):e2490. doi: 10.1371/journal.pntd.0002490. eCollection 2013.

Lainson R., Shaw J.J. 1987. *The leishmaniases in biology and medicine. Evolution, classification and geographical distribution* Em W. Peters e R. Killick-Kendrick (ed.), *As leishmanioses em biologia e epidemiologia*, vol. 1. Academic Press, Ltd., Londres, Inglaterra.

Lewin B (2001) De genes a genoma. In: ARTMED (ed) *Genes VII*, VII edn, São Paulo, pp 39-42.

Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 29; 104(22): 9375-80. Epub 2007 May 21.

Marlow MA, da Silva Mattos M, Makowiecky ME, Eger I, Rossetto AL, Grisard EC, Steindel M. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. *PLoS One*. 2013;8(2):e56177. doi: 10.1371/journal.pone.0056177. Epub 2013 Feb 14.

Marlow MA, Boité MC, Ferreira GE, Steindel M, Cupolillo E. Multilocus sequence analysis for *Leishmania braziliensis* outbreak investigation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Feb 13;8(2):e2695. doi: 10.1371/journal.pntd.0002695. eCollection 2014 Feb. Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 May;8(5):e2962.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (Espúndia/Escomel, 1911). *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80:859-76, 1986.

Marzochi MC. *As Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares*. *Journal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104, 1992.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Medir o peso das doenças tropicais negligenciadas: a carga global de doença quadro. *PLoS negl Trop Dis*. 2007; 1 :. E114. doi: 10.1371 / journal.pntd.0000114.

Menezes, M. P. C. Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, ibéricas e canárias. 2005. 110f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade

Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal do Ceará, Areia.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (Segunda ed.) Editora do Ministério da Saúde, Brasília (2010).

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561-1577.

Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania (viannia)* in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Mar;76(3):573-8.

Odiwuor S, S De Doncker , Maes I , Dujardin JC , Van der Auwera G. Natural *Leishmania donovani/Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia. *Infect Genet Evol.* 2011 Dec;11(8):2113-8. doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.026. Epub 2011 Apr 30.

Oliveira-Neto MP (1), Pirmez C, Rangel E, Schubach A, Grimaldi Júnior G. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988 Oct-Dec; 83(4): 427-35.

Pan, A. A., S. M. Duboise, et al. (1993). "Developmental life cycle of *Leishmania*--cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes." *J Eukaryot Microbiol* 40(2): 213-223.

Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PRL, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association Between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strain Polymorphisms. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Program for the surveillance and control of leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, 2002.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.

Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol*. 2006 Nov;36(13):1383-8. Epub 2006 Aug 4.

Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JM, Costa GG, Herai RH, Würtele M, de Carvalho LM, Carmona e Ferreira R, Mortara RA, Barbiéri CL, Mieczkowski P, da Silveira JF, Briones MR, Pereira GA, Bahia D. The genome sequence of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res*. 2013 Dec;20(6):567-81. doi: 10.1093/dnares/dst031. Epub 2013 Jul 15

Reithinger, R. and J. C. Dujardin (2007). "Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications." *J Clin Microbiol* 45(1): 21-25.

Restrepo CM, De La Guardia C, Sousa OE, Calzada JE, Fernández PL, Lleonart R. AFLP polymorphisms allow high resolution genetic analysis of American Tegumentary Leishmaniasis agents circulating in Panama and other members of the *Leishmania* genus. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73177. doi: 10.1371/journal.pone.0073177.eCollection 2013.

Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res*. 2011 Dec;21(12):2129-42. doi: 10.1101/gr.122945.111. Epub 2011 Oct 28.

Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, Volf P, Berriman M, Cotton JA, Smith DF. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. *PLoS Genet*. 2014 Jan; 10(1):e1004092. doi: 10.1371/journal.pgen.1004092. Epub 2014 Jan 16.

Rougeron V, De Meeûs T, Hide M, Waleckx E, Bermudez H, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, De Doncker S, Le Ray D, Ayala FJ, Bañuls AL. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 23;106(25):10224-9. doi: 10.1073/pnas.0904420106. Epub 2009 Jun 4.

Schaid DJ, Batzler AJ, Jenkins GD, Hildebrandt MA. Exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium and homogeneity of disequilibrium across strata. *Am J Hum Genet*. 2006 Dec;79(6):1071-80. Epub 2006 Nov 3.

Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun*. 2004 Jan; 72(1): 508-14.

Schriefer A, Guimarães LH, Machado PR, Lessa HA, Lessa M, Lago E, Ritt G, Góes-Neto A, Schriefer ALF, Riley LW, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Emerging Infections Diseases*. Vol. 15. Nº 6, 871-876. June 2009.

Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Dec;42(12):3097-102.

Simmons MJ, Snustad P (2006) *Genética Evolutiva*. In: Koogan G (ed) *Fundamentos de genética*. 4 ed., vol 1, Rio de Janeiro, pp 802-805.

Tibayrenc, M., F. Kjellberg, et al. (1990). "A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7): 2414-2418.

Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994 Jul-Sep;89(3):427-34.Review.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida PR, Mobashry N, Johnson WD, Jr Carvalho EM. 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* 186:1829-1834.

Viannia, G. (1911): Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. *Brazil Medico*. 25:411-112.

Volf P(1), Sadlova J. *Sex in Leishmania*. *Science*. 2009 Jun 26;324(5935):1644. doi: 10.1126/science.324\_1644b.

Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *Int J Parasitol*. 2007 May;37(6):589-93. Epub 2007 Feb 15.

Yamey, G. Public sector must develop drugs for neglected diseases. *BMJ*, v. 324, 2002.

Yangzom T, Cruz I, Bern C, D Argaw, den Boer M, Vélez ID, Bhattacharya SK, R Molina, Alvar J. Endemic transmission of visceral leishmaniasis in Bhutan. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 /Dec; 87(6):1028-37. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0211. Epub 2012 Oct 22.

Zhou JJ, Lange K, Papp JC, Sinsheimer JS. A heterozygote-homozygote test of Hardy-Weinberg equilibrium. *Eur J Hum Genet.* 2009 Nov; 17(11):1495-500. doi: 10.1038/ejhg.2009.57. Epub 2009 Apr 15. P