

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL MG

VANESSA ALEXANDRE ARAÚJO

DETECÇÃO DE MODIFICAÇÕES GÊNICAS EM AMOSTRAS DE *Leishmania (L.) infantum chagasi* PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIÕES DE MINAS GERAIS

ALFENAS-MG

2018

VANESSA ALEXANDRE ARAÚJO

DETECÇÃO DE MODIFICAÇÕES GÊNICAS EM AMOSTRAS DE *Leishmania (L.) infantum chagasi* PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIÕES DE MINAS GERAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Fabio Antonio Colombo

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

ALFENAS-MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Araújo, Vanessa Alexandre
A663d Detecção de modificações genicas em amostras de *Leishmania (L.) infantum chagasi* proveniente de diferentes regiões de Minas Gerais / Vanessa Alexandre Araújo. -- Alfenas/MG, 2018.
64 f. : il. --

Orientador: Fabio Antonio Colombo.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

I. leishmania. 2. Expressão Gênica. 3. Análise de Sequência de DNA. I. Colombo, Fabio Antonio. II. Título.

CDD- 616.96



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, MG
CEP: 37130-001



VANESSA ALEXANDRE ARAÚJO

“DETECÇÃO DE MODIFICAÇÕES GÊNICAS EM AMOSTRAS DE *Leishmania (L.) infantum*
chagasi PROVENIENTE DE DIFERENTES REGIÕES DE MINAS GERAIS”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovado em: 18 de julho de 2018.

Prof. Dr. Fábio Antônio Colombo
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti
Instituição: USP

Assinatura:

Prof. Dr. Eduardo de Figueiredo Peloso
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus, por me permitir concluir mais um ciclo da minha vida acadêmica. Aos meus pais, principalmente minha mãe e irmã por me apoiarem diante de tantos dias de estresse, e por todos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador **Dr. Fabio Antonio Colombo** e co-orientador **Dr. Marcos José Marques**, pelos ensinamentos, companheirismo e por confiar no meu trabalho, apesar diversas limitações para realização dos mesmos.

A todos do laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos, pelo auxílio durante a execução dos experimentos, pelas altas risadas e momentos de descontração em meio a tanta tensão em busca de resultados. Em especial à doutoranda **Juliana Barbosa Nunes** pelo incentivo nos momentos de fracasso e apoio que foi de grande importância para continuar a caminhada estudantil.

À todas as instituições de ensino e pesquisa que nos disponibilizaram amostras para a execução desse projeto de pesquisa.

Aos companheiros de caminhada de todo o mestrado, os mais próximos, **Daniel, Ícaro, Alexandre, Yara, Joana**, e principalmente à grande responsável pelo meu início na pós-graduação, minha companheira de graduação e amiga **Paloma da Silva Gomes Lopes**, só nós sabemos o que já passamos para chegar até aqui. Muito obrigada.

A todos os amigos e colegas de trabalho, por me auxiliarem durante essa etapa, compreendendo as dificuldades e limitações, na tentativa de conciliar os estudos ao trabalho.

Aos amigos pela compreensão e respeito ao me ausentar de momentos importantes, obrigada pela compreensão e ajuda, quando pensava tudo estar perdido.

A todos os pesquisadores científicos, auxiliares e técnicos da Universidade Federal de Alfenas que contribuíram direta e indiretamente em minha formação acadêmica, pela ajuda, amizade e compreensão.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania*, sendo esses parasitos intracelulares obrigatórios e transmitidos pela picada de fêmeas dos flebotomíneos. A doença tem sido considerada como reemergente e a segunda maior causa de mortes entre as principais infecções parasitárias. No Brasil e na América Latina, a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania (L.) infantum chagasi*, podendo apresentar manifestações clínicas ou se manter assintomática, onde os pacientes podem ter seu sistema fagocitário fortemente infectados, atingindo tanto humanos e outros hospedeiros susceptíveis, como é o caso de cães, que são os principais reservatórios. O tratamento das leishmanioses no Brasil é realizado principalmente com drogas conhecidas como antimoniais pentavalentes (SbV), no entanto, nas últimas décadas a resistência de *Leishmania* sp. às drogas antimoniais vem aumentando, pois, essas espécies apresentam uma organização genômica única dentre os eucariotos e mecanismos altamente eficientes como mecanismo de escape. Com esse intuito, foram investigadas amostras de DNA de cães positivos para leishmaniose visceral canina, encaminhados das cidades de Alfenas, Divinópolis, Guapé, Governador Valadares, Juiz de Fora, Ouro Preto, Poços de Caldas, Sete Lagoas e Três Pontas; delimitando uma área de estudo abrangente do Estado de Minas Gerais. As amostras foram amplificadas pela PCR em tempo real, PCR convencional, sequenciadas e comparadas em busca de ampliações gênicas relacionadas a possíveis modificações. Com isso, detectou-se por meio de análise molecular, regiões com modificações gênicas em cepas circulantes de algumas regiões do Estado de Minas Gerais quando comparadas com cepas padrão.

Palavras-chave: *Leishmania infantum chagasi*. Modificação gênica . Sequenciamento.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by several species of the genus *Leishmania* and these obligatory intracellular parasites are transmitted by the bite of female's sand flies. The disease has been considered as reemerging and the second leading cause of death among major parasitic infections. In Brazil and Latin America, visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi*, and may present clinical manifestations or remain asymptomatic, where patients may have their phagocytic system strongly infected, affecting both humans and other susceptible hosts, and is the case of dogs, which are the main reservoirs. The treatment of Leishmaniasis in Brazil is mainly performed with drugs known as pentavalent antimonials (SbV), however, in the last decades the resistance of *Leishmania sp.* to antimonial drugs has been increasing since these species present a unique genomic organization among eukaryotes and highly efficient mechanisms as an escape mechanism. For this purpose, DNA samples from dogs positive for canine visceral leishmaniasis, sent from the cities of Alfenas, Divinópolis, Guapé, Governador Valadares, Juiz de Fora, Ouro Preto, Poços de Caldas, Sete Lagoas and Três Pontas were investigated; delimiting a comprehensive study area of the State of Minas Gerais. Samples were amplified by real-time PCR, conventional PCR, sequenced and compared for gene amplifications related to possible modifications. Thus, genetically modified regions were detected in circulating strains of some regions of the State of Minas Gerais when compared to standard strains.

Key words: *Leishmania infantum chagasi*. Gene modification. Sequencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A** - Base nitrogenada adenina
- BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool*
- C** - Base nitrogenada citosina
- CEUA** - Cômite de ética no uso de animais
- Ct** - Ciclo threshold
- CRO8** - Cromossomo 8
- CRO81** - Cromossomo 8/ fragmento 1
- CRO82** - Cromossomo 8/ fragmento 2
- CRO83** - Cromossomo 8/ fragmento 3
- CRO84** - Cromossomo 8/ fragmento 4
- DAT** - Ensaio de aglutinação direta
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- dATP** - Desoxinucleotídeos trifosfatados de adenina
- dGTP** - Desoxinucleotídeos trifosfatados de guanina
- dTTP** - Desoxinucleotídeos trifosfatados de timina
- dCTP** - Desoxinucleotídeos trifosfatados de citosina
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA** - Ensaio imunoenzimático
- FAM** - Fluoróforo 6 carboxy-fluorescein
- G** - Base nitrogenada guanina
- HIV** - Vírus da imunodeficiência adquirida
- LC** - Leishmaniose cutânea
- LCD** - Leishmaniose cutânea- difusa
- LM** - Leishmaniose mucocutânea

- LV** - Leishmaniose visceral
- NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*
- NFQ** - *Non-fluorescent quencher*
- Pb** - Pares de bases
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase
- qPCR** - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
- RNA** - Ácido ribonucleico
- SbV** - Antimonial pentavalente
- SYBR** - Sistema de detecção, ligante de DNA
- T** - Base nitrogenada timina
- TBE** - Tris-borato EDTA
- WHO** - *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | - Figura ilustrativa das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp. | 17 |
| Figura 2 | - Flebótomo gênero <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 18 |
| Figura 3 | - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> | 19 |
| Figura 4 | - Paciente com Leishmaniose Visceral | 20 |
| Figura 5 | - Lesões ulceradas única e múltiplas..... | 21 |
| Figura 6 | - Nódulos cutâneos nas mãos de um paciente com Leishmaniose Cutânea Difusa | 22 |
| Figura 7 | - Lesão mucocutânea nos lábios..... | 23 |
| Figura 8 | - Lesão oronasal (septo) | 23 |
| Figura 9 | - Endemicidade da Leishmaniose Visceral mundial, 2013 | 24 |
| Figura 10 | - Endemicidade da Leshmaniose Visceral mundial, 2015..... | 24 |
| Figura 11 | - Casos de LV por UF de infecção, Brasil, 2015..... | 25 |
| Figura 12 | - Macrófagos infectados com amastigotas..... | 26 |
| Figura 13 | - Fluxograma das atividades desenvolvidas..... | 34 |
| Figura 14 | - Esquema de localização dos pares de iniciadores, desenhados no cromossomo 8 com número indicativo de base de início e término dos pares de bases..... | 39 |
| Figura 16 | - Teste dos iniciadores. Eletroforese em gel de agarose 2% corados com Brometo de Etídio. Controle negativo e cepas padrões de <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) donovani</i> (MHOM/IN/1980/DD8) | 40 |
| Figura 17 | - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. Amostras 53 e 54 (Divinópolis), 186 e 6351 (Governador Valadares) | 41 |
| Figura 18 | - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. Amostras 580 e 595 (Ouro Preto) | 42 |
| Figura 19 | - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. Amostras 110 (Três Pontas) e 128 (Lavras) | 43 |
| Figura 20 | - Consenso final CRO81. Análise comparativa entre os fragmentos amplificados com os iniciadores CRO81, obtendo uma amplificação de 143pb, com total identidade entre as amostras..... | 44 |
| Figura 21 | - Consenso final CRO82. Análise comparativa entre os fragmentos amplificados com os iniciadores CRO82, obtendo uma amplificação de 279pb, com total identidade entre as amostras..... | 45 |

- Figura 22 - Consenso final CRO83. Análise comparativa entre os fragmentos amplificados com os iniciadores CRO83, obtendo uma amplificação de 492 pb, com modificações pontuais levando à trocas de bases, nas amostras 53 (Divinópolis), 128 (Lavras), cepa padrão *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46)....46
- Figura 23 - Consenso final CRO84. Análise comparativa entre os fragmentos amplificados com os iniciadores CRO84, obtendo uma amplificação de 190 pb, com total identidade entre as amostras48

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Desenho dos iniciadores..... | 39 |
| Tabela 2 - Seleção das amostras | 40 |
| Tabela 3 - Modificação gênica observada na cepa padrão de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> (MHOM/BR/72/BH46), quando comparada com a sequência de <i>L. (L.) infantum</i> JPCM5 genome chromosome 8 depositada no Genebank..... | 47 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|--------------------------------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 | MORFOLOGIA DOS PARASITOS..... | 17 |
| 2.2 | CICLO BIOLÓGICO DAS LEISHMANIOSES VISCERAIS..... | 18 |
| 2.3 | FORMAS CLÍNICAS | 19 |
| 2.3.1 | Leishmaniose Visceral (LV) | 19 |
| 2.3.2 | Leishmaniose Cutânea (LC) | 21 |
| 2.3.3 | Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) | 21 |
| 2.3.4 | Leishmaniose Mucocutânea (LM) | 22 |
| 2.4 | EPIDEMIOLOGIA..... | 23 |
| 2.5 | DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES | 26 |
| 2.6 | MEDICAMENTOS EM USO E RESISTÊNCIA..... | 27 |
| 2.7 | GENOMA DAS <i>LEISHMANIAS</i> sp..... | 29 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 31 |
| 4 | OBJETIVOS | 32 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 32 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 32 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 5.1 | AMOSTRAGEM..... | 33 |
| 5.2 | CONFIRMAÇÃO E SELEÇÃO DAS ESPÉCIES (qPCR)..... | 34 |
| 5.3 | ESCOLHA DOS INICIADORES..... | 35 |
| 5.4 | PCR CONVENCIONAL PARA O SEQUENCIAMENTO..... | 35 |
| 5.5 | ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2%..... | 36 |
| 5.6 | SEQUENCIAMENTO | 36 |
| 5.7 | ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS | 36 |
| 6 | RESULTADOS | 38 |
| 6.1 | CONFIRMAÇÃO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 38 |
| 6.2 | DESENHO E TESTE DOS INICIADORES | 38 |
| 6.3 | ANÁLISE DAS AMOSTRAS SELECIONADAS..... | 41 |
| 6.4 | SEQUENCIAMENTO GÊNICO | 43 |
| 7 | DISCUSSÃO | Erro! Indicador não definido. |

| | | |
|----------|--------------------------|-----------|
| 8 | CONCLUSÃO..... | 54 |
| 9 | PERSPECTIVAS..... | 55 |
| | REFERÊNCIAS | 56 |
| | APÊNDICES..... | 61 |

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* sendo esses parasitos intracelulares obrigatórios e transmitidos pela picada de fêmeas dos flebotomíneos, e existem aproximadamente 30 espécies desses vetores (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; DAVIES et al., 2000; READY, 2010). De acordo com a WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A doença tem sido considerada como reemergente e a segunda maior causa de mortes entre as principais infecções parasitárias. Segundo SHAW et al., (2009), a infecção causada pela *Leishmania (L.) infantum chagasi* pode ser uma doença fatal e causar sérias complicações não só aos indivíduos infectados como a outros hospedeiros susceptíveis, como é o caso de cães, que são os principais reservatórios, desempenhando um importante papel na epidemiologia da infecção humana, e levando ao desenvolvimento da doença humana.

As espécies infectantes de mamíferos do gênero *Leishmania* são divididas em dois subgêneros, *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*, porém com o mesmo poder de infecção, induzindo na maioria das vezes, respostas imuno-inflamatórias e infecções no tecido. Todavia, esses parasitos podem instalar em um local preferencialmente e proliferar, determinando assim a forma clínica da doença, que pode variar desde uma infecção cutânea ou mucocutânea até uma doença visceral difusa (DAVID; CRAFT, 2009; DE ALMEIDA et al., 2011). Porém, há outros fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença tais como o estado imunológico do hospedeiro, além das espécies do parasito infectante, incluindo também o papel do cão como reservatório (DUJARDIN et al., 1995; HENDRICKX et al., 2014; PEACOCK et al., 2008).

As diversas espécies de *Leishmania*, levam ao aparecimento de quatro principais formas clínicas que são caracterizadas de acordo com a localização do parasito nos tecidos do hospedeiro infectado, dentre elas estão: a Leishmaniose Visceral (LV); Leishmaniose Cutânea (LC); Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD); Mucocutânea (LM). A LC a forma mais comum em cerca de 90% dos casos distribuídos por regiões endêmicas como: Arábia Saudita, Irã, Brasil, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Índia

(ALVAR et al., 2012; HANDLER et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

As leishmanioses caninas são mais prevalentes e uma grande quantidade de animais infectados apresentam manifestações cutâneas, atuando como fonte de infecção para os insetos vetores (SHAW et al., 2009; SUNDAR et al., 2007). A eutanásia é a recomendação para os casos de cães infectados como parte das medidas de estratégias de controle (BRASIL, 2003), uma vez que as recaídas são frequentes e os cães podem se infectar novamente semanas após o tratamento (ALVAR et al., 1994; CHAPPUIS et al., 2007).

A definição de caso confirmado de leishmaniose canina inclui a presença de um ou mais sinais clínicos ou clínico-patológicos: linfadenopatia, doença de pele esfoliativa ou ulcerativa, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, proteinúria, perda de peso ou anorexia, doença inflamatória ocular. Contando também com a confirmação por meio de exames laboratoriais para a identificação das amastigotas no sangue, medula óssea e aspirados de linfonodos ou biópsias de pele (SHAW et al., 2009).

Como a leishmaniose visceral é uma doença de caráter endêmico pode afetar grandes áreas em todo o mundo, incluindo as urbanas, peri-urbanas e rurais, cujas áreas vão desde florestas tropicais e subtropicais, passando pelos desertos em regiões da África, Américas, Ásia e também o sul europeu (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; DAVIES et al., 2000; READY, 2010). Atualmente, estima-se que existam 350 milhões de pessoas com o risco de serem infectadas, no entanto, a ocorrência de casos vem aumentando anualmente e cerca de 200 mil novos casos de leishmaniose visceral e 700 mil/ 1,2 milhões novos casos de leishmaniose cutânea são registrados em todo o mundo (CROFT et al., 2006; WHO,2014).

Relatos frequentes de novos casos de leishmaniose, veem se espalhando ao longo de todo o mundo, em especial no norte da Europa, onde já se tem a presença da infecção em regiões consideradas não endêmicas, e em cães que nunca visitaram áreas endêmicas (SHAW; LANGTON; HILLMAN, 2009). Na América Latina, se tem descrito a presença da doença em pelo menos 12 países, sendo os mais prevalentes: Colômbia, Peru e o Brasil, com aproximadamente 90% dos casos (BRASIL, 2003; HANDLER et al., 2015).

As constantes mudanças e diferenças genômicas expressas nas espécies de *Leishmania*, também vem gerando grande preocupação, visto que, alguns estudos relacionados à variação entre espécies, relataram modificações da espécie de *Leishmania major* (a espécie que possui maior conservação genômica), o que leva a uma busca ainda maior por investigações e aplicação de novos estudos de marcadores moleculares (SUNDAR et al., 2000; GHOBAKHLOO et al., 2016). Inúmeros genes podem estar envolvidos nessas modificações do parasito, modificações essas que podem contribuir para a ineficácia dos medicamentos atualmente em uso. Com isso, um estudo voltado para a pesquisa de mecanismos de resistência e em busca dessas modificações, foi capaz de relatar o envolvimento de regiões do cromossomo 8, com possíveis genes de resistência após o tratamento com antimoniais (CHOUDHURY et al., 2008, ROGERS et al., 2011).

Uma vez relatado o envolvimento dos genes, com o mecanismo de resistência do parasito, a tentativa de controle e tratamento dos cães (não permitido), com o uso veterinário de drogas para tratamento das leishmanioses, podem ajudar ainda mais ao aparecimento da resistência de *Leishmania* sp. às drogas antimoniais, como já descrito, por alguns autores (MARY et al., 2010; MONDELAERS et al., 2016). Resistência essa, também descrita pelo tratamento com a Miltefosina, uma droga desenvolvida para tratamento de certos tipos de câncer (MONDELAERS et al., 2016). Atualmente o arsenal terapêutico utilizado no Brasil está restrito à anfotericina lipossomal (anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B) e principalmente ao Glucantime® (antimoniato de meglumina) (BRASIL, 2014).

Logo, com a propagação da leishmaniose visceral humana e canina, este trabalho tem como objetivo a busca por regiões onde possam estar ocorrendo modificações gênicas, podendo direcionar a produção de novos compostos que apresentem ações em regiões modificadas e já resistentes ao tratamento usual dos antimoniais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A seguir será descrito a morfologia dos parasitos causadores da Leishmaniose, ciclo biológico da doença, formas clínicas, epidemiologia, diagnóstico, tratamento e sobre o genoma das *Leishmania* sp.

2.1 MORFOLOGIA DOS PARASITOS

Os protozoários causadores das leishmanioses humanas são pertencentes à família Trypanossomatidae e do gênero *Leishmania*, e apresentam duas formas evolutivas (figura 1), a amastigota, forma intracelular imóvel que parasita hospedeiros vertebrados; e a promastigota, móvel (flagelada), extracelular, que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados (insetos vetores pertencentes a família Psychodidae, subfamília Phlebotominae) (REY, 2010). Os insetos vetores da leishmaniose são pequenos dípteros, também conhecidos como “mosquito palha”, possuem a característica de ao pousarem permanecerem com as asas entreabertas e levantadas. Existem mais de 300 espécies já descritas nas Américas, porém apenas dois gêneros são de importância relevante, *Lutzomyia* que engloba a maior parte das espécies presentes nas Américas (Figura 2); e *Phlebotomus*, que são os transmissores das leishmanioses na Ásia, Europa e África, sendo sempre as fêmeas as transmissoras do parasito (REY, 2010).

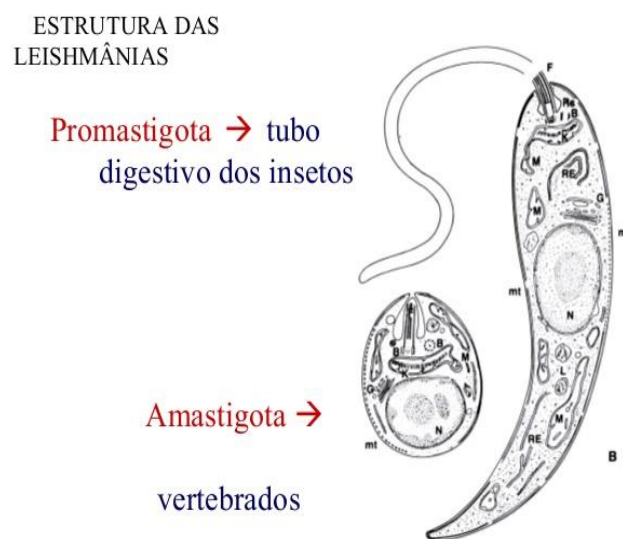


Figura 1 - Figura ilustrativa das formas evolutivas de *Leishmania* sp.

Fonte: REY, 2010



Figura 2 - Inseto fêmea do gênero *Lutzomyia longipalpis*
Fonte: www.raywilsonbirdphotography.co.uk

2.2 CICLO BIOLÓGICO

A *Leishmania* apresenta um ciclo de vida heteroxeno, sendo, uma fase ocorrida no hospedeiro vertebrado e outra no hospedeiro invertebrado (vetor). Sua reprodução ocorre por divisão binária simples, onde o cinetoplasto (mitocôndria modificada contendo uma grande quantidade de DNA) se divide primeiramente, dando início a produção de um novo flagelo. O núcleo se divide então por endomitose. A forma estrutural é definida de acordo com a fase do ciclo, variando entre a forma intracelular amastigota e forma extracelular promastigota (HANDLER et al., 2015).

Seu ciclo no vertebrado, conforme a figura 3, classicamente ocorre quando um vetor infectado, regurgita parte do conteúdo de seu tubo digestivo durante o repasto sanguíneo, assim transmitindo por inoculação, as promastigotas infectantes, que são fagocitadas pelas células de defesa e dentro de um vacúolo denominado fagossomo, as mesmas se transformam em amastigotas. Essa forma é capaz de se multiplicar rapidamente e infectar outros macrófagos. Logo há uma disseminação do parasito que tem como principais alvos o baço, fígado e medula óssea. Então ao picar um hospedeiro vertebrado infectado, o vetor ingere o sangue contendo as amastigotas no interior dos macrófagos, onde no tubo digestivo do vetor elas se transformam em promastigotas e por fim aderem ao epitélio intestinal se diferenciando em promastigotas metacíclicas, fechando o ciclo (HANDLER et al., 2015).

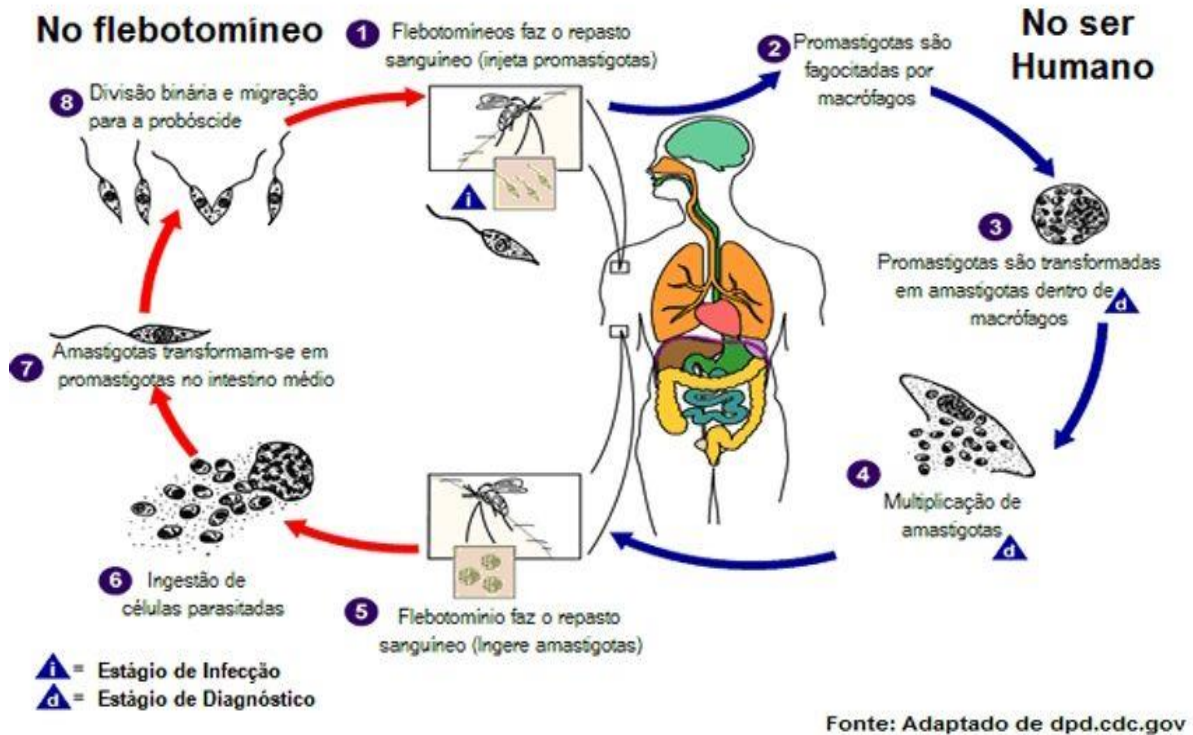


Figura 3 - Ciclo biológico da *Leishmania*

Fonte: Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças.

2.3 FORMAS CLÍNICAS

Leishmanioses consistem em quatro principais formas clínicas que são caracterizadas de acordo com a localização do parasito nos tecidos do hospedeiro infectado, dentre elas estão: a Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Mucocutânea (LM), sendo a LC a forma mais comum em cerca de 90% dos casos distribuídos por regiões endêmicas (CHAPPUIS et al., 2007; COLOMBO, 2015; WHO, 2017).

2.3.1 Leishmaniose Visceral (LV)

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar, como também é chamada, tem como espécie considerada responsável pela doença no Brasil e na América Latina, a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (BRASIL, 2010; LAINSON, 1983).

As manifestações clínicas da infecção LV em muitos casos pode se manter assintomática ou cursar um quadro agudo, subagudo ou crônico, onde os pacientes podem ter seu sistema fagocitário fortemente infectado, podendo levar a morte em 90% dos casos sintomáticos, se não tratados (HERWALDT, 1999). De acordo com a WHO (2015), em áreas endêmicas para a LV, há predomínio da forma crônica afetando principalmente crianças e jovens, devido à má nutrição, imunossupressão.

Atualmente a LV vem sendo muito associada com a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), pois o paciente HIV positivo que se infecta com o parasito, e possivelmente desenvolverá o quadro clínico da doença, visto que, a evolução clínica da LV depende da resposta imunológica do paciente, onde o mesmo já se encontra imunossuprimido, acelerando assim a evolução dos sintomas (LINDOSO et al., 2014).

A maior concentração do número de casos por co-infecção LV-HIV, vem sendo relatada tanto em países da América do Norte, como em áreas endêmicas no Brasil, onde a região Nordeste, é a região mais prevalente. Esse aumento na prevalência de co-infecção de LV-HIV, se deve ao estado imunossuprimido do paciente HIV positivo, tornando assim, a infecção por *Leishmania*, uma doença oportunista (ALVAR et al., 1997; RABELLO et al., 2003).

Clinicamente a LV, após um período de incubação de semanas a meses, pode ser caracterizada pelos seguintes sintomas: febre, hepatomegalia, esplenomegalia (Figura 4), hipergamaglobulinemia, pancitopenia e infecção nas vísceras, como fígado, baço, medula óssea (HERWALDT, 1999; RASHID et al., 1986; WERNECK et al., 2003).



Figura 4 - Paciente com Leishmaniose Visceral apresentando hepatomegalia e esplenomegalia, na fase final da doença.

Fonte: BRASIL, 2003

2.3.2 Leishmaniose Cutânea (LC)

A Leishmaniose Cutânea é a forma mais frequente desta patologia, podendo ser causada por qualquer tipo de espécie de *Leishmania*, embora algumas manifestações possam ser associadas à algumas espécies ou subgênero (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Dentre as manifestações clínicas geralmente se encontram nódulos, e uma ou várias úlceras na pele, sendo que, as lesões podem acontecer em qualquer local do corpo, mas geralmente acontecem no local da picada. As lesões se desenvolvem de semanas a meses ou até mesmo anos após a infecção, podendo ser únicas ou múltiplas e apresentarem variações clínicas diferentes, de acordo com diferentes espécies de *Leishmania* que infectem os macrófagos da pele (AREVALO et al., 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

A úlcera cutânea típica é indolor e apresenta formato ovalado ou arredondado, com eritemas, tamanho variável e bordas bem delimitadas e elevadas (Figura 5), se não tratadas as lesões tendem à cura espontânea, levando de meses a alguns anos e deixando cicatrizes geralmente lisas, finas e mantendo sua dimensão idêntica à úlcera (BRASIL, 2010a).



Figura 5 - Lesões ulceradas única e múltiplas

Fonte: HANDLER et al., 2015

2.3.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

A Leishmaniose Cutânea Difusa é uma manifestação clínica rara causada pela *L. (L.) amazonensis* no Brasil, que ocorre em pacientes com deficiência específica na

resposta imune celular contra antígenos de *Leishmania*. As lesões se iniciam com lesões únicas, evoluem de forma lenta podendo chegar a múltiplos nódulos sem ulcerações, como apresentados na Figura 6, onde se encontra uma grande quantidade de parasitos na lesão (BRASIL, 2010a).



Figura 6 - Nódulos cutâneos nas mãos de um paciente com AIDS e LCD da América Central.
Fonte: HANDLER et al., 2015

2.3.4 Leishmaniose Mucocutânea (LM)

A maior parte dos casos de LM conhecidos podem ser causados pela espécie de *Leishmania* spp. do subgênero Viannia, comumente encontrado nas Américas, sendo a principal a *L. (V.) braziliensis* e alguns relatos de outras espécies como a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2010a; CABRERA et al., 1995; DAVID; CRAFT, 2009; HERWALDT, 1999).

Geralmente a leishmaniose mucocutânea ocorre após uma infecção cutânea já tratada aparentemente, e suas lesões levam de 2 anos até 30 anos para se manifestarem (HANDLER et al., 2015). As lesões acometem mucosas da naso-orofarínge (Figura 8), trato respiratório, úlceras ao redor dos lábios e narinas (Figura 7), a evolução da doença pode levar a destruição do septo nasal, afetar o palato e partes moles da face, podendo causar mutilações graves (DANESHBOD et al., 2011; DAVID; CRAFT, 2009; HANDLER et al., 2015; HERWALDT, 1999).

A cura das lesões mucocutâneas geralmente é tardia, pois os parasitos estão em pequena quantidade nas lesões e são mais resistentes ao tratamento com antimoniais e não evoluem para cura espontânea.



Figura 7 - Lesão mucocutânea nos lábios

Fonte: HANDLER et al., 2015

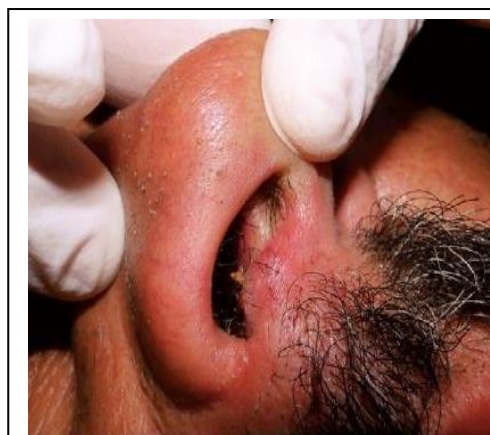


Figura 8 - Lesão oronasal (septo)

Fonte: HANDLER et al., 2015

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A ocorrência da doença já foi descrita como doença endêmica em 97 países (destes 65 países endêmicos tanto para LV, quanto para LC (Figuras 9 e 10)), acontecendo principalmente em áreas peri-urbanas e rurais de regiões da Ásia, América e África (PALUMBO, 2009; WHO, 2018). Na América Latina, a mesma fora descrita em pelo menos 12 países, visto que, o país com maior prevalência é o Brasil, com cerca de 90% dos casos, principalmente na região Nordeste (Figura 11), e a região sudeste, prevalecendo nos estados de Minas Gerais e São Paulo (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2015).

De acordo com dados da WHO (2015), o número de casos vem aumentando a cada ano, onde países que apresentavam baixos números de casos, cerca de 100 a 500 casos, (Figura 9), agora registram o dobro (> 1000 casos, como demonstrado na Figura 10). Esse aumento aconteceu principalmente nas regiões da Ásia e África.

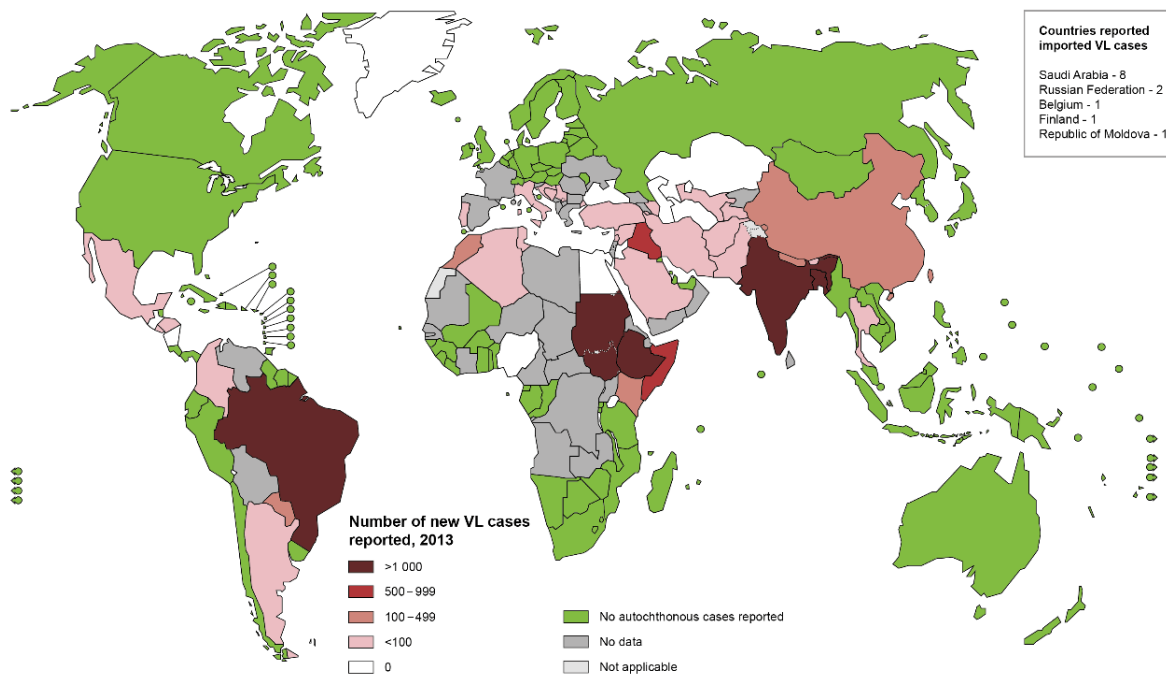


Figura 9 - Endemicidade da Leishmaniose Visceral, 2013

Fonte: WHO, 2013

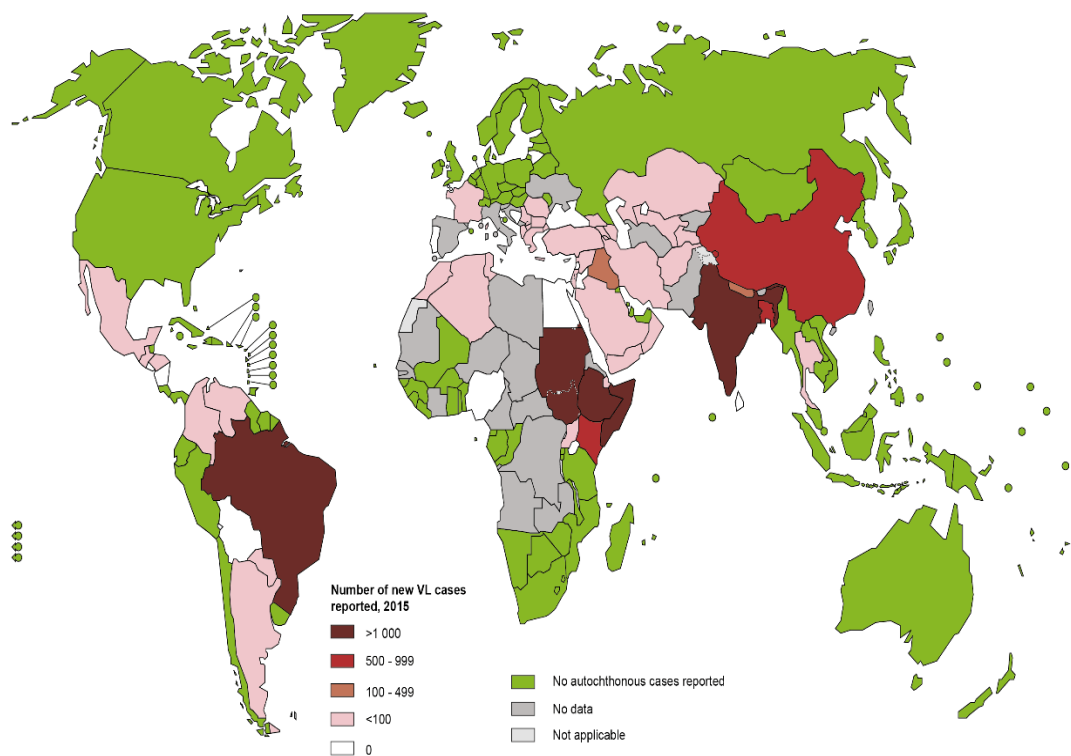


Figura 10 - Endemicidade da Leishmaniose Visceral, 2015

Fonte: WHO, 2015

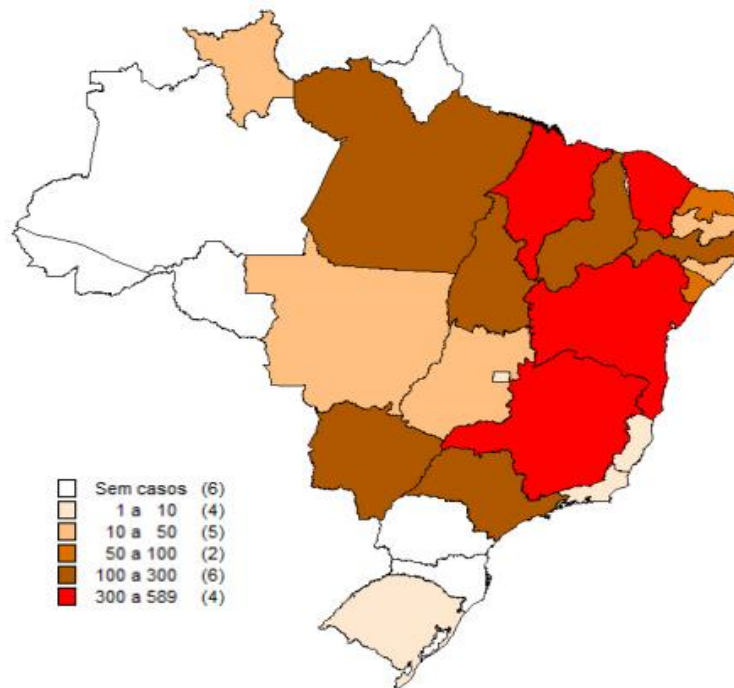


Figura 11 - Casos de LV por UF de infecção, Brasil, 2015

Fonte: BRASIL, 2015.

Durante muitos anos a endemicidade da Leishmaniose se manteve equilibrada, entretanto com o aumento de migrações para grandes cidades, o crescente número de casos de co-infecções pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), o ressurgimento da Leishmaniose como doença oportunista se tornou uma realidade (DESJEUX, 2001).

O primeiro caso da doença ocorrido no Brasil, foi descrito em 1913, por Migone, quando o material de necropsia de um paciente do estado do Mato Grosso fora analisado e formas amastigotas foram encontradas (BRASIL, 2003). Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul, onde há poucos casos descritos (Figura 11), principalmente devido ao clima frio da região. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominado pelas características de ambientes rurais e peri-urbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros (BRASIL, 2003).

2.5 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O diagnóstico da LV apresenta várias características clínicas em comum com uma série de doenças que ocorrem comumente como: a malária, tuberculose, febre tifoide, dentre outras; onde células de órgãos linfoides (baço, linfonodos e medula óssea) na tentativa de defesa contra esses parasitos, acabam favorecendo seu desenvolvimento e proliferação, pois são fagocitados e esse processo de interiorização pode dificultar os mecanismos de detecção e diagnóstico, representado na Figura 12 (CHAPPUIS et al., 2007; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). No entanto, se faz de grande importância o diagnóstico sensível e diferencial frente a outras doenças.

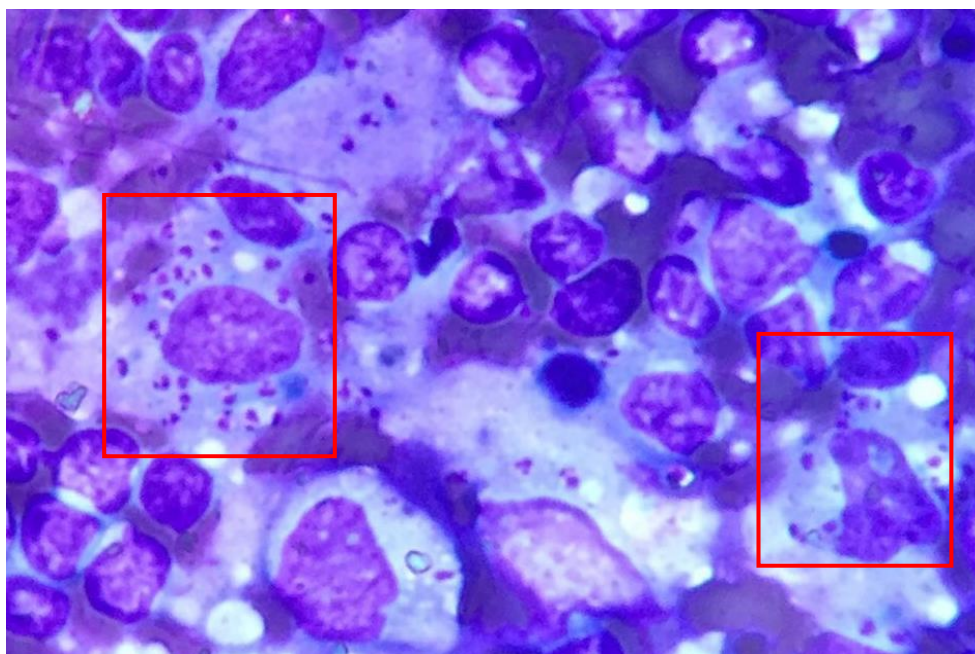


Figura 12 - Macrófagos infectados com amastigotas

Fonte: SILVA, 2018.

Nas últimas décadas inúmeros métodos de detecção surgiram e se aperfeiçoaram para auxiliar no diagnóstico de parasitoses. O diagnóstico parasitológico realizado pela investigação microscópica, é considerado uma técnica “padrão ouro”, sendo um método de diagnóstico definitivo e confirmatório quando formas parasitarias são evidenciadas em pacientes com leishmanioses. No entanto a coleta de amostras de pele através de aspirados ou biópsias, é desconfortável ao paciente e o isolamento das formas em meios

de cultura é um método demorado e susceptível a negatização por contaminação bacteriana ou fúngica. Outros métodos, como os imunológicos também são utilizados, sendo os mais comuns o ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI), ensaios de aglutinação direta (DAT), porém não se tornaram testes padrões devido as dificuldades de padronização em diversos laboratórios (DESJEUX; ALVAR, 2003).

A detecção de DNA a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR), na década de 1990, permitiu que houvesse uma grande sensibilidade na detecção de diferentes espécies em amostras de sangue ou aspirados de medula óssea e em amostras teciduais (DAVIES et al., 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), entretanto, seus resultados dependem de variáveis como: área endêmica, o tipo de amostra, a correta extração e amplificação, dentre outras (BRASIL, 2003).

A técnica de PCR utilizada para a amplificação de DNA, possui uma detecção e sensibilidade muito maior que os métodos convencionais (PIRMEZ et al., 1999). A amplificação dessas sequências de DNA, são de grande importância para a caracterização fenotípica, visto que, essa identificação de espécies distintas é capaz de auxiliar na avaliação clínica, até mesmo no tratamento e na busca por novas drogas que substituam as atuais que apresentam resistência (CASTILHO et al., 2003; CUPOLILLO et al., 1995).

2.6 MEDICAMENTOS EM USO E RESISTÊNCIA

Desde a década de 40, drogas conhecidas como antimoniais pentavalentes (SbV) são usados para o tratamento da leishmaniose, dentre eles o mais utilizado é o Glucantime® (antimoniato de meglumina). Outro fármaco muito utilizado nas últimas décadas para o tratamento das leishmanioses foi o estibogluconato de sódio (Pentostam) (FERREIRA et al., 2014), inicialmente utilizado para o tratamento da esquistossomose, foi utilizado para o tratamento de leishmaniose humana pela primeira vez em 1946. No entanto, nas últimas décadas a resistência de *Leishmania* sp. às drogas antimoniais vem aumentando constantemente (MARY et al., 2010; MONDELAERS et al., 2016). Depois surgiram outros medicamentos auxiliares: antifúngicos como a Anfotericina B (apresentando uma forma lipossomal), antibióticos como a Paromomicina, e atualmente a Miltefosina, sendo a primeira droga de uso oral, em todo o mundo (CROFT et al.,

2006; MONDELAERS et al., 2016; OBONAGA et al., 2014; SUNDAR et al. 2000). Na prática clínica, existem poucas drogas disponíveis para o tratamento, além disso, elas apresentam diversos efeitos tóxicos, os tratamentos são de longa duração e por muitas vezes, o paciente não consegue completar todo o tratamento, criando uma situação em que pode predispor o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (AHLUWALIA et al., 2004; SHARMA et al., 2006).

A existência de uma vacina efetiva contra *Leishmania*, ainda não se tornou realidade. Enquanto isso, o controle da leishmaniose depende dos quimioterápicos e de algumas moléculas registradas e ainda em testes, significando um número bem pequeno frente a resistência expressiva aos antimoniais, que continuam sendo a principal linha de tratamento em muitas regiões endêmicas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; GHOBAKHLOO, NAFISEH; MOTZADIAN, MOHAMMED HOSSEIN; FARDAEI, 2016; LEPROHON et al., 2015; SUNDAR et al., 2000).

Nos últimos anos, passou a ser então observada uma resistência significativa aos antimoniais, principalmente em países como a Índia e Arábia Saudita (Croft et al., 2006; Sundar et al., 2000), sendo em maior número particularmente na Índia, onde mais de 60% dos pacientes diagnosticados com a doença não responderam à terapia antimonial tradicional (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). O uso generalizado de antimoniais sem associação com outras drogas, a super dosagem e o tratamento inacabado, vem caracterizando este rápido aparecimento da resistência. O mesmo foi demonstrado em estudos *in vitro*, em que houve uma diminuição da sensibilidade nos parasitos isolados em cultura (BRYCESON, 2001), além da meia-vida longa do medicamento que pode contribuir também para esse aumento.

Seifert et al. (2003) e Sundar et al (2000), relataram casos de recaídas (cerca de 20%) até 12 meses após o término do tratamento, além de falhas clínicas durante o tratamento com antimoniais, enfatizando ainda mais a necessidade de um cuidadoso monitoramento durante e pós tratamento (LEPROHON et al., 2015).

Um outro composto que vem sendo muito utilizado nos últimos anos, é uma droga oral que foi desenvolvida para o tratamento de câncer (principalmente linfomas cutâneos e câncer de mama) chamada Miltefosina. No Brasil, a Miltefosina é utilizada para o tratamento da LV, causada pela *L. (L.) infantum*, e apresenta apenas 43% de cura dos casos tratados. Outros relatos de uma diminuição da ação do tratamento (ensaios *in*

vitro) com a Miltefosina, já foi relatado na Índia (estudos com isolados de *L. (L.) donovani*) e no Brasil (estudos com isolados de *L. (L.) infantum*) (MONDELAERS, et al., 2016).

A anfotericina lipossomal B, um antifúngico, é uma outra droga que se tornou um tratamento padrão em alguns países, no entanto, esse tipo de tratamento ainda é considerado um tratamento caro, porque mesmo sendo em única dose, requer administração por via intravenosa (BRYCESON, 2001; LEPROHON et al., 2015).

Contudo, devido a esses fatores relacionados a resistência, já descritos anteriormente como: a necessidade de novos fármacos, o abandono ao tratamento, os efeitos tóxicos dos medicamentos, dentre outros, o conhecimento e entendimento das modificações gênicas se faz necessário.

2.7 GENOMA DAS *LEISHMANIAS sp.*

As espécies de *Leishmania* apresentam uma organização genômica única dentre os eucariotos. O material genético é organizado tanto no núcleo, contendo DNA cromossomal e episomal, quanto no cinetoplasto, que contém moléculas de DNA extranuclear. O genoma de mais de 32Mb está contido em 36 cromossomos em espécies do velho mundo (como a *L. major*, *L. ethiopica*) e em 34 ou 35 cromossomos quando se trata de espécies do novo mundo (*L. infantum*, *L. donovani*). Os genes estão organizados em uma ou em ambas as fitas de DNA, não possuem íntrons, e são transcritos simultaneamente (transcrição policistrônica), como ocorre em procariotos. A análise de padrão eletroforético de cromossomos indicou um arranjo haploide, diploide e poliploide (KAZEMI, 2011; ROGERS et al., 2011).

As constantes mudanças e diferenças expressas nas espécies de *Leishmania*, podem ser causadas por diversos mecanismos como a resposta imune do hospedeiro, modificações devido a uma seleção natural, gerada pelo próprio parasito, visto que, se adequam aos meios em que vivem, e principalmente são considerados importantes mecanismos de escape, quando se levado em consideração o tratamento com certas drogas antimoniais (CROFT et al., 2006; GHOBAKHLOO et al., 2016). As modificações gênicas que ocorrem por mudanças durante a divisão e multiplicação, levam ao aparecimento de regiões gênicas repetitivas, mutações, deleções e/ou

inserções, rearranjos e recombinações (UBEDA *et al.*, 2008). Um outro mecanismo utilizado pelos parasitos, como mecanismo de escape, é a amplificação gênica, capaz de levar amplificação de regiões específicas do genoma (aumento do número de cópias em 2 a 20 vezes, dependendo do gene envolvido). Linhagens estoques mantidas em laboratórios, podem também apresentar essas amplificações, devido a inúmeras passagens em meios de cultura (BEVERLY, 1991; KAZEMI,2011).

A aplicação e estudo de novos marcadores moleculares contribuem assim, para o conhecimento e compreensão dos genes envolvidos no processo de resistência que pode estar relacionado com a ineficácia dos medicamentos utilizados na prática clínica. Portanto, no presente estudo busca-se desenhar novos marcadores moleculares com o intuito de identificar regiões gênicas amplificadas de cepas da espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi*, encaminhadas de diversas regiões do Estado de Minas Gerais, utilizando a metodologia de sequenciamento molecular após amplificação de fragmentos, visto que, as mesmas podem apresentar possível resistência ao Glucantime®, antimonial mais utilizado para o tratamento de leishmanioses.

3 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral se tornou um grave problema de saúde pública, devido a diversos fatores, além da expansão sem controle da doença, baixa notificação dos casos e falha terapêutica. O tratamento de escolha preconizado no Brasil, é baseado em antimoniais pentavalentes como o Glucantime[®], utilizados há mais de 60 anos. Apesar de o tratamento ser relativamente eficaz, existem grandes desafios a serem superados para o tratamento da leishmaniose, visto que, existem poucas drogas disponíveis e com diversos efeitos tóxicos, os tratamentos são de longa duração e por muitas vezes, o paciente não consegue completar todo o tratamento, criando uma situação em que pode haver resistência aos medicamentos (AHLUWALIA et al., 2004; SHARMA et al., 2006).

As drogas antimoniais pentavalentes (SbV) foram utilizadas por mais de seis décadas para o tratamento das Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Cutânea em todo o mundo, onde não apresentavam nenhuma evidência de resistência, que passaram a ser então observadas nas duas últimas décadas. No entanto, estudos recentes relatam uma resistência significativa ao Sb (V) (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SUNDAR et al., 2000).

A partir dessas investigações já realizadas e tão pouco exploradas, é que se pretende por meio da análise molecular realizar o sequenciamento das amostras do parasito que circula em diversas regiões do estado de Minas Gerais, isoladas de cães, afim de, detectar possíveis regiões apresentando modificações gênicas entre as cepas (COLOMBO et al., 2015; LACHAUD et al., 2002; SCHALLIG et al., 2002).

4 OBJETIVOS

Abaixo serão descritos os objetivos gerais e específicos.

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar modificações gênicas em regiões do cromossomo 8 a partir de amostras de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais a partir do sequenciamento genético.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar o desenho de novos iniciadores para verificar a presença de modificações gênicas no cromossomo 8 de *Leishmania (L.) infantum chagasi*;
- b) Realizar a PCR convencional de amostras de cepas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* oriundas de diferentes regiões de Minas Gerais para identificação de diferentes ampliações;
- c) Sequenciar as amostras que apresentaram amplificação com todos os iniciadores, comparando com as sequências depositadas em bancos de dados para analisar eventuais modificações gênicas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo serão descritos todos os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho.

5.1 AMOSTRAGEM

Nos últimos anos, diversos cães foram encaminhados e entregues aos Centros de Controle de Zoonoses e Universidades dos municípios de Alfenas, Ouro Preto, Juiz de Fora, Governador Valadares e Divinópolis, como parte do programa de Medidas de Controle da Leishmaniose Visceral Canina. Os animais eram cães de rua capturados ou animais domiciliados e entregues pelos donos devido ao aparecimento de sinais clínicos da doença.

Todos os cães tiveram uma amostra de sangue coletada (de 3 a 5 mL, em tubo contendo EDTA) e foram eutanasiados devido a presença de ao menos três sinais clínicos da doença, como onicogrifose, alopecia, linfadenopatia, lesões ulcerativas, coceira intensa, pelagem opaca, seborréia, dermatites, perda do apetite e caquexia. Além dos sinais clínicos, todos os animais apresentaram testes positivos no exame parasitológico, sendo, tanto a presença de sinais, quanto o teste parasitológico, considerados testes confirmatórios para leishmaniose visceral canina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Neste trabalho foram utilizadas amostras de DNA extraído de uma amostra de cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) mantida em passagens sucessivas em animais de experimentação (hamster). Também foram extraídos DNA de amostras de sangue de cães de Alfenas (2 amostras), e encaminhados dos municípios de Divinópolis (10 amostras), Guapé (1 amostra), Governador Valadares (10 amostras), Juiz de Fora (10 amostras), Lavras (2 amostras), Ouro Preto (10 amostras), Poços de Caldas (1 amostra), Sete Lagoas (1 amostra coletada em Alfenas), e Três Pontas (1 amostra), totalizando 49 amostras (Tabela 2). Estes municípios delimitam uma área de estudo abrangente do Estado de Minas Gerais, aumentando assim, a chance de encontrar amostras geneticamente diferentes. Todas as amostras de sangue dos cães foram processadas pelo remetente e mantidas em freezer a -20°C até o momento de uso.

O pedido de autorização para o uso de amostras de origem animal foi encaminhado para o CEUA local e dispensado (Número de protocolo 23087.005838/2017.39), tendo em vista a não necessidade de autorização, pois as amostras já foram encaminhadas extraídas e possuem uma aprovação anterior 2014/18 CEUA UFOP. O delineamento experimental, foi exemplificado na Figura 13.

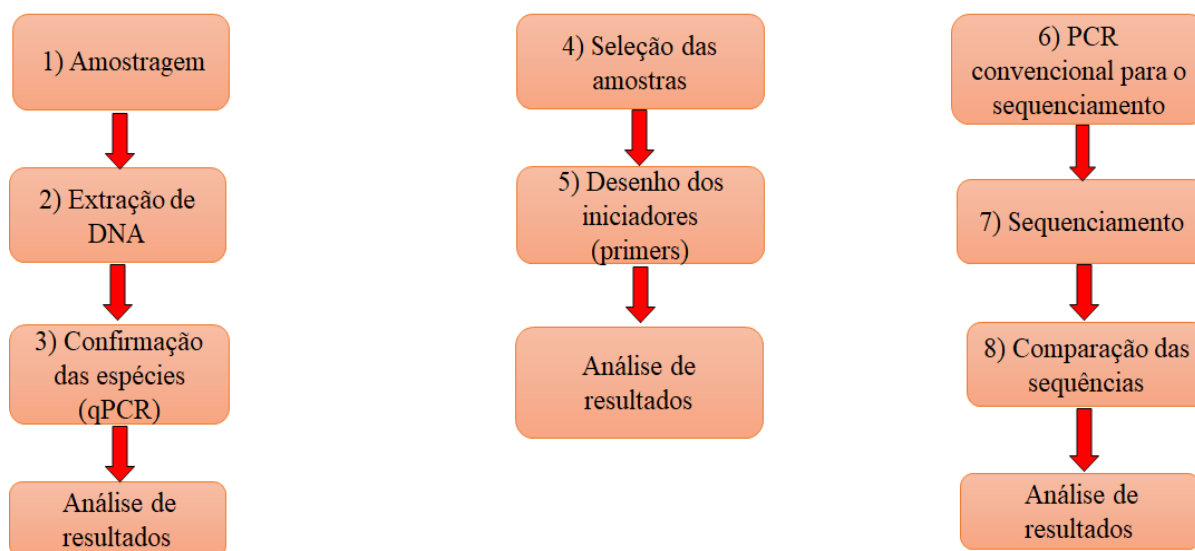


Figura 13 - Fluxograma das atividades desenvolvidas.

Fonte: DO AUTOR

5.2 CONFIRMAÇÃO E SELEÇÃO DAS ESPÉCIES (qPCR)

Para a confirmação que o material extraído e encaminhado das respectivas cidades, continha DNA de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, foi realizada uma PCR em tempo real. Nesta reação, foram utilizadas sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5'-end foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM (*6-carboxy-fluorescein*). Na extremidade 3'-end, foi ligado um “quencher” NFQ (*non-fluorescent quencher*). O desenho das sequências é: LINJ31F: 5'CCG CGT GCC TGT CG3'; LINJ31R 5'CCC ACA CAA GCG GGA ACT3' e a sonda TaqMan 5'CCT CCT TGG ACT TTG C3'. As reações foram realizadas em um ABI StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems), em um volume final de 10,0 µL por reação. O volume de 1,0 µL de DNA (amostras ou controles) foram adicionadas a um reagente contendo 5,0 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) e

1,0 μL de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 18 μM , e a sonda TaqMan, marcada com FAM e usando NFQ como *quencher* na concentração de 5 μL . Foram adicionados às reações dois controles: um negativo e um controle positivo. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos seguido de um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. (COLOMBO et al., 2011).

5.3 ESCOLHA DOS INICIADORES

Como parte deste projeto, quatro conjuntos de iniciadores foram desenhados utilizando como base um fragmento contido no cromossomo 8 da *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 (GenBank: FR796440.1). A região escolhida do cromossomo 8, para o desenho dos iniciadores é homóloga a região onde foi localizada a proteína P299 da *Leishmania major*, responsável pelo aumento da resistência dos parasitos frente a Miltefosina (CHOUDHURY et al., 2008). O mesmo estudo, encontrou evidências que modificações gênicas poderiam estar associadas a essa resistência. Além disso, foi identificada uma proteção cruzada pela P299 após o tratamento com antimoniais. Para o desenho dos iniciadores foi utilizado a ferramenta Primer-BLAST, do website da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

5.4 PCR CONVENCIONAL PARA O SEQUENCIAMENTO

Os iniciadores desenhados foram utilizados na PCR convencional, utilizando um kit comercial (*GoTaq®Green Master Mix - Promega*) contendo 2 corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 μl do “*mix*” contém 1 unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação fora realizada adicionando-se 5 μl do DNA alvo e 50 pmol de cada marcador molecular em um volume final de 25 μl . As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Foram adotadas medidas de controle em todas as etapas da reação.

A cada conjunto de reações foram adicionados um controle negativo com DNA extraído de amostra canina sabidamente negativa para *Leishmania sp.*; e um controle positivo, extraído de cultura de promastigotas de cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46). A PCR foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de uma segunda etapa composta de desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (55°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos) repetida por 30 ciclos. A terceira etapa constituiu em um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos (COLOMBO et al., 2015).

5.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2%

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 2% em TBE (0,045M de Tris-Borato; 0,001M EDTA) com 0,5 µl/ml de brometo de etídio e separados por um sistema de eletroforese horizontal numa cuba contendo o mesmo tampão. Os géis foram visualizados e fotografados, e as imagens adquiridas em transiluminador GeneGenius (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3).

5.6 SEQUENCIAMENTO

Os produtos amplificados na PCR convencional foram previamente purificados utilizando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) conforme instruções do fabricante. Os fragmentos em parte, foram sequenciados usando os marcadores moleculares forward e reverse que amplificam as sequências codificadas pelos marcadores escolhidos. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. Todas as análises de sequenciamento foram realizadas pelo Laboratório Myleus em Belo Horizonte, MG. As quais foram devidamente preparadas conforme especificações exigidas pelo mesmo.

5.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências dos nucleotídeos foram analisadas, editadas, e o alinhamento foi realizado utilizando os softwares SeqMan Pro 15 (DNASTAR, Lasergene) e BioEdit

(Versão 7.2.5). As sequências foram comparadas entre si e com a sequência padrão (*Leishmania infantum* JPCM5 genome chromosome 8) já depositadas no GenBank (número de acesso FR796440.1 no site BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)).

6 RESULTADOS

O trabalho em si teve como foco a busca por modificações gênicas nas cepas de *L. (L.) infantum chagasi*, circulantes em alguns municípios de Minas Gerais, confirmadas após o sequenciamento gênico de amostras selecionadas, de acordo com os testes descritos na metodologia. Diante dos resultados, procurou-se deduzir, de acordo com a literatura, as principais causas dessas modificações encontradas.

6.1 CONFIRMAÇÃO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

A confirmação de que o material recebido continha DNA de *Leishmania (L.) infantum chagasi*, foi realizada a partir de uma PCR em tempo real, como já descrito anteriormente, sendo utilizado o marcador LinJ31 (COLOMBO et al., 2011). Pelo emprego desse teste, todas as amostras apresentaram resultados positivos, contendo material genético compatível com *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Com base neste resultado, foram selecionadas as amostras que apresentaram menores valores de *Ct* (*ciclo threshold*) (dados não mostrados), visto que, quanto menor o *Ct*, maior o número inicial de cópias.

6.2 DESENHO E TESTE DOS NOVOS INICIADORES

A *L. major* apresentam as regiões mais conservadas dentre as espécies de *Leishmania*, visto que, estudos relataram que fragmentos desse cromossomo 8, possam estar associados a possíveis genes de resistência após tratamento com antimoniais (CHOUDHURY et al., 2008, ROGERS et al., 2011). Foram desenhados 4 conjuntos de iniciadores (Tabela 13), a partir de regiões gênicas homologas presentes no cromossomo 8 da *Leishmania (L.) infantum* JPCM5.

Para o desenho, foi escolhida uma região onde supostamente estaria o código genético para a produção da proteína P299, ainda com mecanismo de ação desconhecido, porém relacionada a resistência aos antimoniais. A cobertura total do fragmento compreende 1023 pares de bases (Figura 14), divididos em quatro

fragmentos menores de 143, 279, 492 e 190 pares de base, com regiões sobrepostas, flanqueando toda a extensão da região codificante da proteína P299.

Região do cromossomo 8

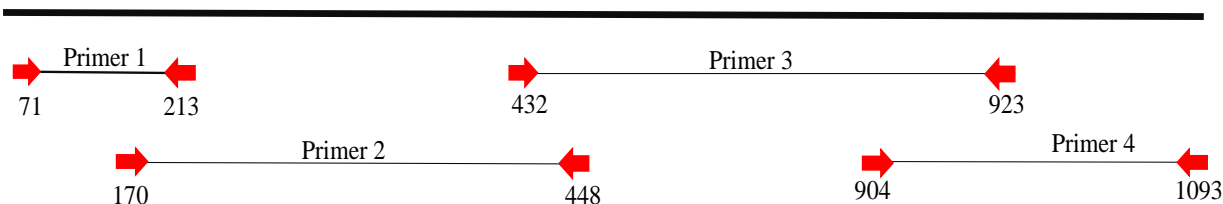


Figura 14 - Esquema de localização dos pares de iniciadores, desenhados no cromossomo 8 com número indicativo da base de início e término.

Fonte: DO AUTOR

Tabela 1 - Desenho dos iniciadores

| Fragmento | Sequência | Tamanho |
|-----------|----------------------|---------|
| CRO8 1F | AAGACGATGATGAGCGCTGG | 143 pb |
| CRO8 1R | TGGTTTTGGTAGTACCCGCC | |
| CRO8 2F | ATCACTCATTCGTCCCCTGC | 279 pb |
| CRO8 2R | GTGCACGCTGTGATTGTTGT | |
| CRO8 3F | ACAATCACAGCGTGCACAAC | 492 pb |
| CRO8 3R | CATACCCGCCGTACCCTAAC | |
| CRO8 4F | GTTAGGGTACGGCGGGTATG | 190 pb |
| CRO8 4R | CAGGCAACCCGAGAGAGAAG | |
| Total | | 1023 pb |

Fonte: DO AUTOR

Duas cepas padrão, uma de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e uma de *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/1980/DD8) foram submetidas à amplificação com os quatro pares de iniciadores e posterior análise eletroforética. Diferentes perfis de amplificação podem estar relacionados à modificação gênica, evidenciado pela amplificação de um ou mais fragmentos. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de Etídio e visualizado em UV (figura 16), confirmando a não amplificação do fragmento 3 (iniciador CRO83) da *L. (L.) donovani*

(MHOM/IN/1980/DD8). Todos os iniciadores foram capazes de amplificar os fragmentos corretos da cepa padrão *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46).

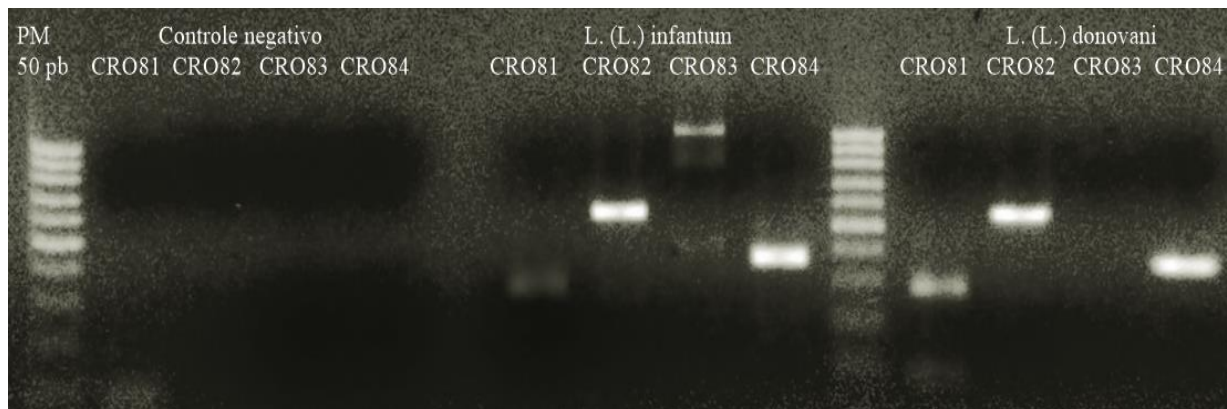


Figura 16 - Teste dos iniciadores. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. Controle negativo e cepas padrões de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/1980/DD8). PM: peso molecular 50 pb

Fonte: DO AUTOR

Após o teste dos novos iniciadores com as cepas padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/1980/DD8), as amostras recebidas foram amplificadas com todos os iniciadores. O critério de seleção dessas amostras, baseou-se na qualidade e quantidade de material genético viável para a realização dos testes moleculares. Muitas amostras apresentaram baixa qualidade e/ou pouca quantidade de DNA (amostras quantificadas pelo Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen), dados não mostrados), levando a uma limitação na seleção das amostras encaminhadas para o serviço de sequenciamento genético (Tabela 2).

Tabela 2: Seleção das amostras

| Municípios | Número de amostras recebidas | Amostras selecionadas | Amostras sequenciadas |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Alfenas | 2 | 0 | 0 |
| Cepa padrão <i>L. (L.) infantum</i> | 1 | 1 | 1 |
| Divinópolis | 10 | 2 | 2 |
| Guapé | 1 | 0 | 0 |
| Governador Valadares | 10 | 2 | 0 |
| Juiz de Fora | 10 | 0 | 0 |
| Lavras | 2 | 1 | 1 |
| Ouro Preto | 10 | 2 | 0 |
| Poços de Caldas | 1 | 0 | 0 |
| Sete Lagoas | 1 | 0 | 0 |
| Três Pontas | 1 | 1 | 1 |
| Total | 49 | 9 | 5 |

Fonte: DO AUTOR

6.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS SELECIONADAS

Foram selecionadas amostras as quais apresentaram amplificação em todos os conjuntos de iniciadores. Um total de 10 amostras de cada cidade foram encaminhadas das cidades de Divinópolis e Governador Valadares, porém apenas duas amostras 53 e 54, proveniente de Divinópolis, apresentaram amplificações com os quatro marcadores moleculares (Figura 17).

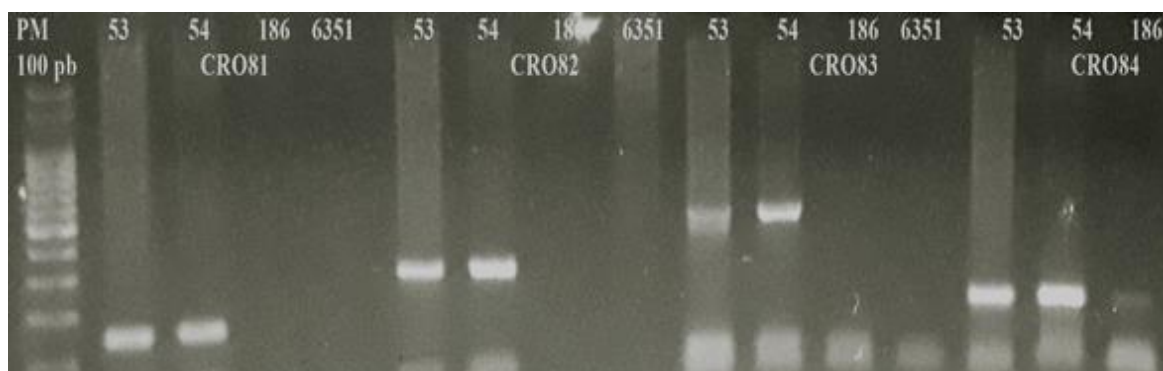


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. Amostras 53 e 54 (Divinópolis), 186 e 6351 (Governador Valadares)

Fonte: DO AUTOR

Das amostras encaminhadas de Ouro Preto, totalizando 10 amostras, duas foram selecionadas frente à amplificação com os quatro pares de iniciadores, como apresentado na Figura 18.

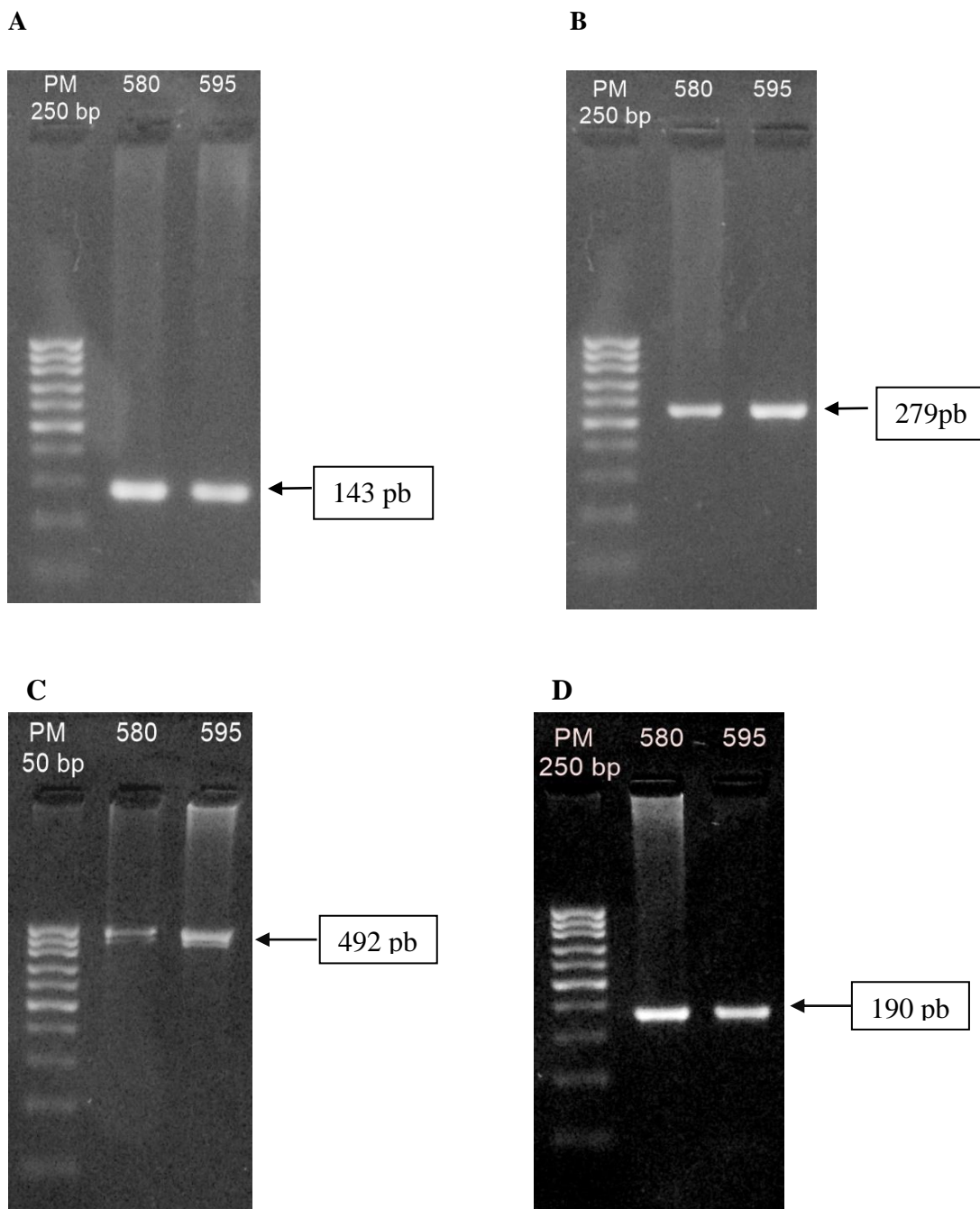


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. Amostras 580 e 595 (Ouro Preto). Legenda: A) Amostras com o iniciador 1, PM 143 pb.

B) Amostras com o iniciador 2, PM 279 pb.

C) Amostras com o iniciador 3, PM 492 pb.

D) Amostras com o iniciador 4, PM 190 pb. PM: peso molecular. pb: pares de bases

Fonte: DO AUTOR

Do mesmo modo, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 2% (coradas com brometo de etídio) para verificação da amplificação das amostras encaminhadas de Três Pontas (total 1 amostra) e da cidade de Lavras (total de 2 amostras). Ambas, apresentaram amplificação com todos os marcadores desenhados (Figura 19), no entanto, a amostra 128 da cidade de Lavras, quando observada sua amplificação com CRO83, não fora visível no gel.

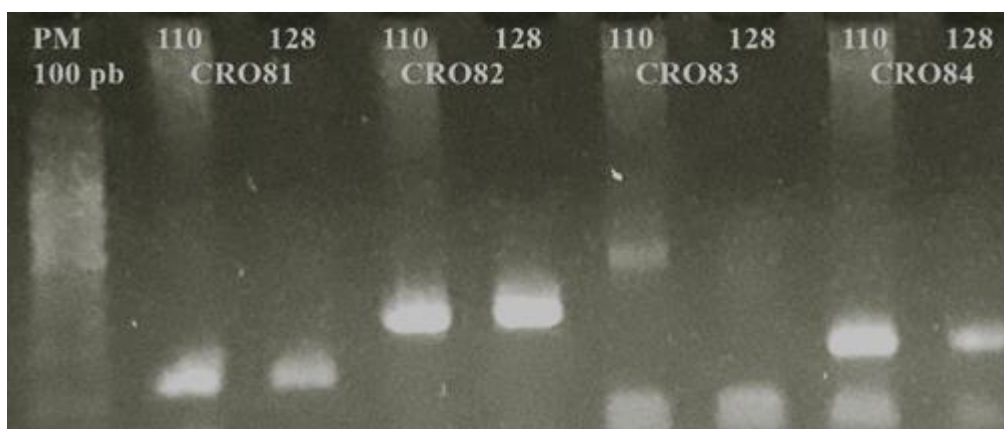


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. Amostras 110 (Três Pontas) e 128 (Lavras)

Legenda: PM: peso molecular pb: pares de base

Fonte: DO AUTOR

6.4 SEQUENCIAMENTO GÊNICO

Após a amplificação dos fragmentos relacionados aos conjuntos de iniciadores, o material amplificado foi purificado pelo Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) e quantificado pelo equipamento Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen). As amostras que obtiverem quantidades mínimas aceitáveis de material genético (cerca de 2 a 3 ng/uL, pelo Qubit) para o sequenciamento foram preparadas com ambos os iniciadores (forward e reverse), e encaminhadas para o Laboratório Myleus em Belo Horizonte, MG. Todas as amostras encaminhadas apresentaram resultados suficientes para a análise, tanto na sequência *forward* quanto na *reverse*. Cada fragmento utilizado na análise comparativa é o resultado de um consenso constituído pela junção das

sequências *forward* e *reverse*. Com isso, cada consenso representa duas vezes a cobertura do mesmo fragmento.

Após a realização de todos os consensos, foi realizada a comparação entre os amplificados das amostras, com cada par de iniciadores. No consenso final 1 (CRO81), foram comparados os consensos das amostras 53, 54, 110, 128, com a cepas padrão *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) mantida no laboratório e com a sequência da *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 retirada do Genbank (FR796440.1), utilizando o par de iniciadores CRO81. Após a análise comparativa, não foi encontrada modificações gênicas entre os fragmentos de 143 pares de base (FIGURA 20).

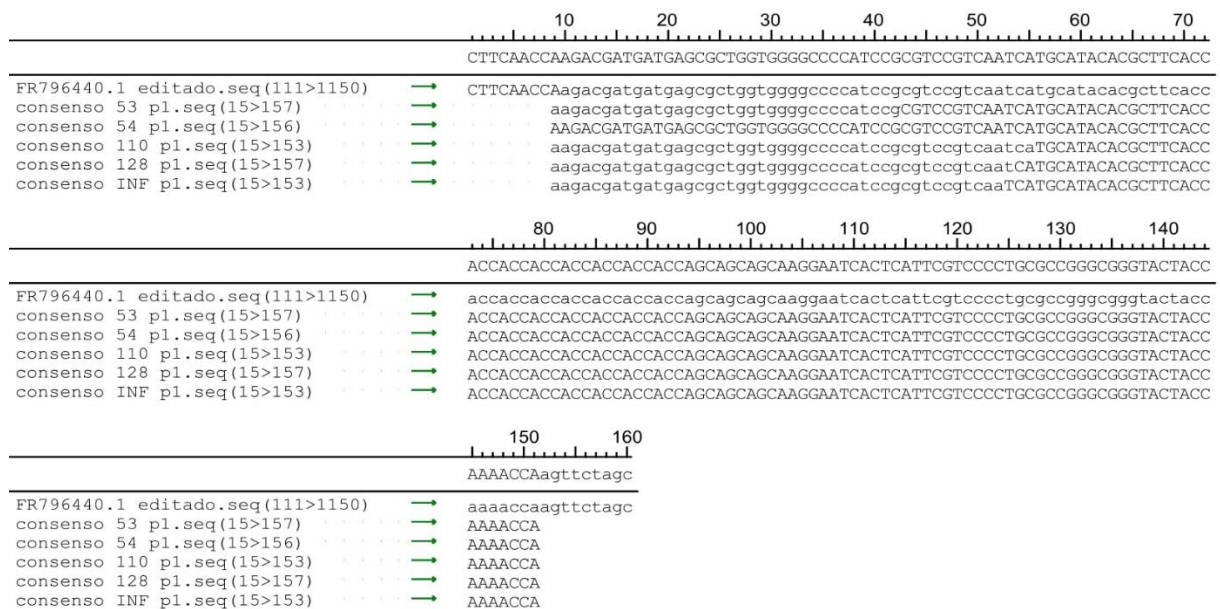


Figura 20 - Consenso final CRO81. Análise comparativa entre os fragmentos amplificados com os iniciadores CRO81, obtendo uma amplificação de 143pb, com total identidade entre as amostras.

Fonte: DO AUTOR

Na análise do consenso final 2 (Figura 21), utilizando o par de iniciadores CRO82, não se observou também nenhuma modificação gênica dentre os fragmentos de 279 pares de base. As amostras comparadas foram respectivamente: 53, 54, 110, 128, com a cepas padrão *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) mantida no laboratório e com a sequência da *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 retirada do Genbank (FR796440.1).

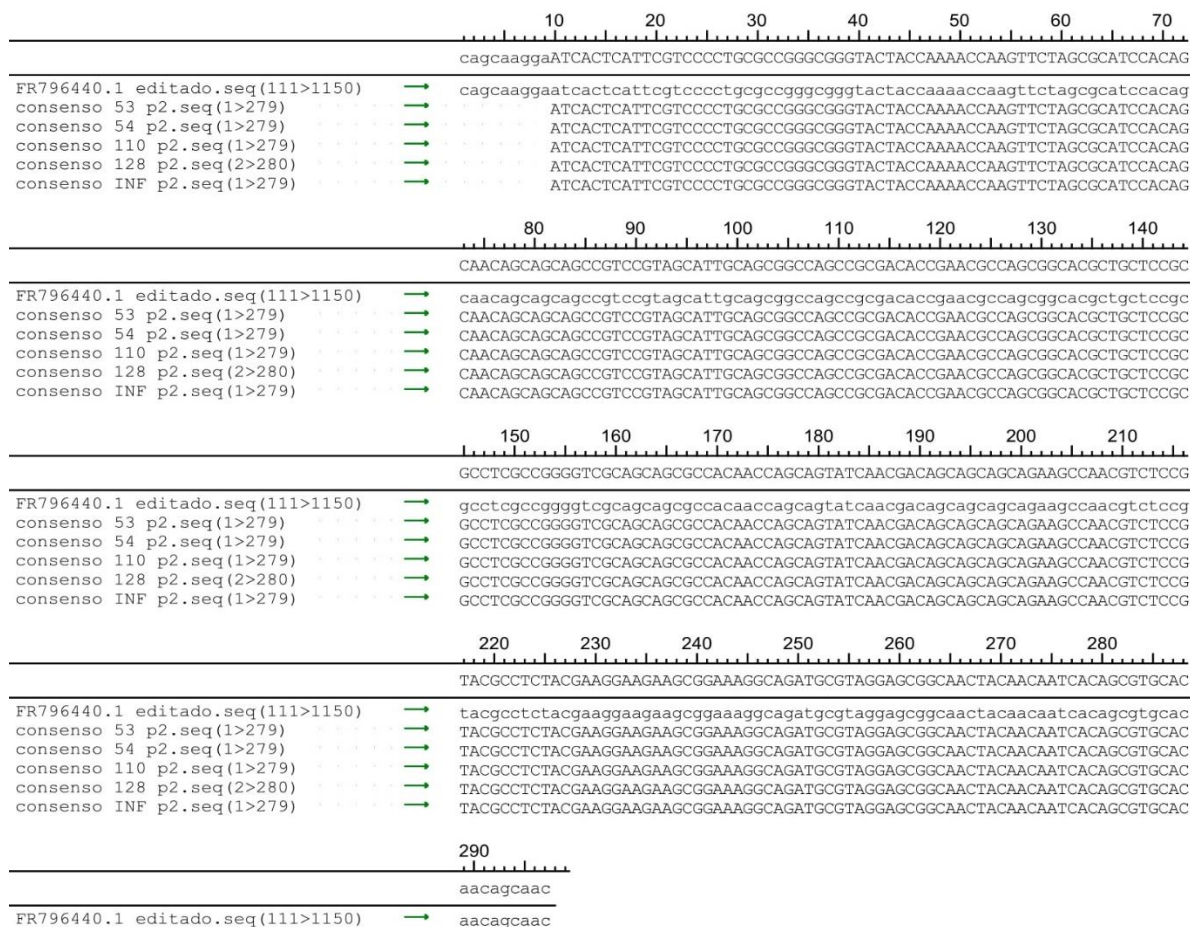


Figura 21 - Consenso final CRO82. Análise comparativa entre os fragmentos amplificados com os iniciadores CRO82, obtendo uma amplificação de 279pb, com total identidade entre as amostras.

Fonte: DO AUTOR

Resultados expressivos foram observados durante a comparação do consenso final com o iniciador 3, mostrando modificações importantes entre os consensos das amostras analisadas e compreendidas entre os fragmentos de 492 pares de bases (FIGURA 22). Dentre as modificações observadas, modificações pontuais na posição 59, foram constatadas nas amostras 53 (Divinópolis) e 128 (Lavras) quando comparadas com as sequências das cepas padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 retirada do Genbank (FR796440.1), onde ocorreu a troca de uma citosina (C) por uma de timina (T).

As mesmas amostras 53 (Divinópolis) e 128 (Lavras) apresentaram também alterações na posição 68, onde ocorreu uma troca de uma base de adenina (A) por uma base de C. Quando analisada a Cepa padrão *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46), encontrou-se uma modificação pontual na posição 68, levando a troca de uma base A por uma base G (guanina), além disso, notou-se uma troca de bases da posição 71 à 85 (Tabela 3), quando comparada com a cepa padrão de *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 genome chromosome 8.

Tabela 3 - Modificação gênica observada na cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46), quando comparada com a sequência de *L. (L.) infantum* JPCM5 genome chromosome 8 depositada no Genebank.

| | |
|---|-------------------|
| <i>L. (L.) infantum</i> JPCM5 genome chromosome 8 | CAACACGGCGGCCAGC |
| <i>L. (L.) infantum chagasi</i> (MHOM/BR/72/BH46) | GTACGCGGGGGTATTGA |

Fonte: DO AUTOR

Por fim, na análise comparativa do consenso final 4, utilizando o par de iniciadores CRO84, nenhuma modificação gênica compreendida entre o fragmento de 190 pares de base, foi encontrada (FIGURA 23). Como já dito, as amostras foram comparadas entre si, com a cepa padrão mantida em laboratório de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e com a sequência retirada do Genbank da *Leishmania (L.) infantum* JPCM5.

7 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral, vem se tornando cada vez mais frequente em todo o mundo, por ser uma doença de caráter endêmico, inclusive em países da América Latina, como é o caso do Brasil, que se encontra entre os países com maior prevalência da doença (DAVIES et al., 2000; HANDLER et al., 2015; WHO, 2018). Essa reemergência da doença também se deve a grande plasticidade do parasito, que apresentam características únicas em sua organização genômica e grande capacidade de modificações frente a resposta imunológica do hospedeiro (KAZEMI, 2011; PEACOCK et al., 2008; SCHALLIG et al., 2002).

Com o crescente número de casos da leishmaniose visceral, importantes estudos em relação a prática terapêutica utilizada por muitos anos, vem sendo descritos, mostrando relatos da resistência aos medicamentos, falhas durante o tratamento e casos de recaídas em pacientes após o término do tratamento (MARY et al, 2010; MONDELAERS et al, 2016; OBONAGA et al., 2014; SUNDAR et al., 2000). Outros estudos foram realizados no intuito de se descobrir quais genes e modificações podem estar possivelmente envolvidos nos mecanismos de resistência, onde a maior parte desses estudos indicou que a resistência ao antimonial em *Leishmania* é um fenômeno multifatorial (CROFT et al., 2006; GOURBAL et al., 2004).

A partir dos estudos já descritos na literatura, o presente estudo teve como objetivo, detectar possíveis modificações gênicas em *Leishmania (L.) infantum chagasi*, de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, a partir de técnicas de biologia molecular capazes de auxiliar na detecção de mudanças nas amostras das cepas circulante em nosso estado. Seguidas do sequenciamento gênico e análise comparativa em busca de marcadores moleculares que possam estar associados a falha terapêutica e resistência ao tratamento convencional.

Assim, a estratégia inicial do desenho de novos iniciadores (Primer-Blast) se apresentou de forma efetiva, uma vez que não haviam dados depositados no GenBank, de iniciadores específicos modelados a partir de regiões homologas presentes no cromossomo 8 da *Leishmania (L.) infantum* JPCM5, para eventual estudo com a cepa de

Leishmania (L.) infantum chagasi (MHOM/BR/72/BH46), contribuindo ainda para utilização em estudos futuros.

Desde o desenvolvimento da técnica de amplificação do DNA, por meio da PCR (década de 80) vários estudos se realizaram de forma rápida e com alta sensibilidade para detecção e diagnóstico de *Leishmania* em amostras biológicas (ROSE et al., 2004; COLOMBO et al., 2015). Sendo, a principal ferramenta utilizada nesse trabalho.

A amplificação realizada com os quatro pares de iniciadores frente as cepas padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) obteve uma amplificação total de todos os fragmentos, no entanto, a cepa de *L. (L.) donovani* (MHOM/IN/1980/DD8), não foi capaz de amplificar o fragmento 3 (CRO83) demonstrando uma possível modificação gênica entre as espécies, provavelmente na região de anelamento do iniciador. Fato esse comprovado por Depledge et al. (2009), em que após o sequenciamento e a comparação de cepas mantidas em laboratório, revelaram a presença de um gene chamado A2, ainda com função desconhecida na *L. donovani*, mas quando o mesmo gene expressa em *L. major*, ocasiona uma disseminação do parasito nas vísceras. Diferenças de amplificação foram também expressas entre cepas mantidas em linhagens estoque de laboratórios e que após sucessivas passagens, apresentaram múltiplas alterações, que possivelmente contribuem para o desenvolvimento de resistência as drogas (BEVERLY, 1991; KAZEMI, 2011; MONDELAERS et al., 2016).

O mesmo procedimento de amplificação realizado para as amostras selecionadas, sabidamente positivas para *Leishmania (L.) infantum chagasi*, (PCR em tempo real), apresentaram amplificações com os quatro marcadores moleculares. As amostras das cidades de Alfenas (2), Guapé (1), Juiz de Fora (10), Poços de Caldas (1) e Sete Lagoas (1), não foram selecionadas para o sequenciamento devido a não amplificação de um ou mais fragmentos quando utilizados os pares de iniciadores desenhados. A não amplificação pode ser devido a diversos fatores como a baixa qualidade e/ou quantidade de material genético nas amostras recebidas, condições adversas de extração e/ou armazenamento, e purificação, que tornou inviável a realização de testes moleculares e limitou a seleção dessas amostras para o serviço de sequenciamento genético.

Duas amostras da cidade Divinópolis (53 e 54) apresentaram amplificação com todos os pares de iniciadores (Figura 17), evidenciando uma única banda, com valores de peso molecular, sendo compatíveis com os esperados para cada par de iniciadores. A não amplificação (Figura 17) das amostras de Governador Valadares (186 e 6351), pode ser explicada pela baixa qualidade do material genético recebido.

A amplificação das amostras de Ouro Preto (580 e 595) ocorreu como o esperado, no entanto, os resultados do sequenciamento não foram satisfatórios, apresentando sequências sobrepostas, necessitando de nova amplificação e repetição do sequenciamento. De acordo com parâmetros avaliados para sequenciamento de amostras da empresa *Thermo Fischer- Life Technologies*, problemas durante o sequenciamento, podem ser devido a quantidade de material genético presente na amostra (excesso ou falta), degradação do material genético, perda de material durante a purificação, problemas durante a extração com Kit's ou quantidade de fenol- clorofórmio utilizados no protocolo, e até mesmo problemas nos sequenciadores.

Por fim, a amplificação das amostras de Três Pontas (110) que gerou bons resultados na amplificação, também com todos os iniciadores; e da amostra de Lavras (128), que durante a visualização da amplificação por meio da eletroforese em gel, não evidenciou o sinal, respectivo a amplificação com o CRO83, podendo ser devido à baixa quantidade de material genético ou ainda como já dito, baixa qualidade da amostra recebida.

Seguido das amplificações por PCR convencional, o sequenciamento das amostras 53, 54, 110, 128 e cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46), quando analisadas com os iniciadores 1, 2 e 4 obtiveram total identidade, e não apresentaram nenhuma modificação gênica. O mesmo não ocorreu quando a análise comparativa do sequenciamento realizada com o CRO83, das amostras de Divinópolis (53), Lavras (128) e cepa padrão mantida no laboratório de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46), as quais apresentaram modificações pontuais com trocas de bases, nas posições 59 e 68. Estes resultados levam a supor duas hipóteses: (i) as modificações foram observadas em cidades diferentes e distantes uma da outra, mostrando que, essa cepa modificada pode ser a mesma em circulação em ambas as cidades, devido a migração de animais domésticos infectados por *Leishmania* de uma área para outra, como estudo já descrito por Stuart et al. (2008); a outra hipótese é que a (ii) modificação pode ter ocorrido de forma independente no mesmo local do

gene em questão devido a fatores relacionados ao mecanismo de escape ou de resistência. De acordo com UBEDA et al. (2008), modificações assim podem levar ao aparecimento de recombinações, mutações, rearranjos e até mesmo deleções, e por fim, interferir na expressão gênica, pois as repetições gênicas, são consideradas importantes fontes de variação em diversos microorganismos, principalmente nos parasitos do gênero *Leishmania*. Este mesmo estudo, relatou que a presença de rearranjos em sequências repetitivas de alguns genes possivelmente está envolvida na resistência a fármacos.

Em continuidade aos seus estudos em relação a rearranjos genômicos, UBEDA et al. (2014), relatou que esses rearranjos são processos muito dinâmicos e altamente frequentes no gênero *Leishmania*, principalmente devido a sua plasticidade (ROBERTS, 2011), que lhe permite realizar mudanças em resposta ao ambiente e pressões submetidas, impedindo que o parasito se adapte as drogas utilizadas para o tratamento.

Outro mecanismo de resistência a drogas, não observado nos resultados das amostras sequenciadas, porém muito comumente utilizado pelas espécies de *Leishmania*, é a amplificação gênica, um fenômeno conhecido das espécies desse parasito, que pode ocorrer em resposta a certos compostos, levando à amplificação de regiões específicas do genoma (BEVERLEY, 1991; KAZEMI, 2011; PAPADOPOULOU, 1993). Este processo metabólico em resposta a um composto é capaz de aumentar o número de cópias em 2 a 20 vezes, nas regiões dos genes envolvidos no mecanismo de resistência. Espécies da família Trypanosomatidae, como o *Trypanosoma brucei*, também foram testadas, em busca dessas amplificações como mecanismo de resistência, no entanto, foram encontradas apenas sequências repetidas onde rearranjos gênicos podem acontecer (PATNAIK et al., 1994; WILSON et al., 1994).

No intuito de se descobrir quais genes e modificações podem estar possivelmente envolvidos nos mecanismos de resistência, estudos vem sendo descritos por Croft et al. (2006) e por Gourbal et al. (2004), os quais comprovam que a resistência ao antimonial em *Leishmania* é um fenômeno multifatorial, como por exemplo: a diminuição da captação do fármaco, mecanismos de amplificação gênica, mutações, dentre outros, podendo contribuir para a indução de um fenótipo resistente. Mecanismos

de resistência à antimoniais já foram relatados envolvendo a espécie *L. major*, que é a espécie de *Leishmania* que possui o cariótipo mais conservado (SUNDAR et al., 2000; GHOBAKHLOO et al., 2016)

Outros genes e regiões também tem sido pesquisados com intuito de se conhecer melhor as variações cromossômicas e alterações gênicas, mostrando-se útil tanto para o diagnóstico da leishmaniose, quanto para estudos epidemiológicos (DE SOUZA MOREIRA et al., 2016; DUJARDIN et al., 1995; NANTULYA, 1991; NATH-CHOWDHURY et al., 2016; OBONAGA et al., 2014). Esses estudos demonstraram e confirmaram que nas espécies de *L. major*, *L. (L.) infantum* e *L. braziliensis*, todos os genes distribuídos diferencialmente são expressos em todos os estágios do ciclo de vida. Mas esta expressão, maior parte desses genes, codificam proteínas de função ainda desconhecida (DEPLEDGE et al., 2009; DUJARDIN et al., 1995; PEACOCK et al., 2008), como é o caso da proteína P299, ainda com mecanismo desconhecido, porém relacionada a resistência aos antimoniais (CHOUDHURY et al., 2008).

Seguindo os resultados de sequenciamento das cepas padrão, uma modificação entre a cepa padrão *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e a cepa de *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 (Tabela 3) foi bem evidenciada. Estas mudanças na cepa BH46 mantida em laboratório, pode estar relacionada a sucessivas passagens tanto em meios de cultura, como em animais de experimentação (hamster), levando a alterações e modificações entre essas cepas (BEVERLY, 1991; KAZEMI, 2011; MONDELAERS et al., 2016). Essas expressivas mudanças entre a cepa *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e a cepa de *Leishmania (L.) infantum* JPCM5, podem ser ainda, intrínsecas as cepas, ou devido a intensa manipulação da cepa BH46 no laboratório, por diferentes pesquisadores e diferentes condições de manutenção.

Valdívia et al. (2017) evidenciaram ainda, a variação de espécies que estão relacionadas à localização geográfica, uma vez que em seus estudos, *L. (L.) amazonensis* foram isoladas de cães, de regiões endêmicas do estado de Minas Gerais, visto que, essa espécie é responsável pela LC nas regiões norte e nordeste do país (CAMARA et al., 2011). Resultados estes que nos mostram que essas variações entre as diferentes espécies, vem ocorrendo e possivelmente possam estar associadas as mudanças encontradas na espécie de *L. (L.) infantum chagasi*, circulante em nossa região.

8 CONCLUSÃO

Os novos iniciadores desenhados a partir da sequência da cepa *Leishmania (L.) infantum* JPCM5, foram capazes de amplificar a região do cromossomo 8 da *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46), nas amostras recebidas, sendo possível a sua utilização para futuros estudos comparativos na mesma região.

Foram observadas modificação gênica entre as amostras quando comparados com sequências da cepa padrão de *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 chromosome 8, depositadas no GenBank, sendo as maiores modificações encontradas na cepa de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46).

Modificações gênicas pontuais foram também encontradas em amostras de diferentes cidades (Divinópolis e Lavras). A amostra de Três Pontas (110) não apresentou nenhuma modificação em relação a cepa padrão.

A sequência amplificada do cromossomo 8 da cepa padrão de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46), será depositada no Genbank, uma vez, que há modificações em relação a outra cepa depositada.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) Realizar outros testes com novos pares de iniciadores já desenhados e solicitados, para tentar amplificar regiões que não foram amplificadas com os iniciadores desenhados neste projeto.
- b) Utilizar a enzima de restrição *Hae* III para confirmação das diferenças encontradas entre as cepas *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/BH46) e *Leishmania (L.) infantum* JPCM5, visto que o sitio de restrição desta enzima foi encontrada na maioria das cepas, mas não na BH46.
- c) Realizar a infecção de dois grupos distintos de hamsters e promover o tratamento em um grupo com dosagem inferior a recomendada, e o outro grupo permanece não tratado. Após a morte natural dos animais, as respectivas cepas serão retiradas do baço e repassadas a outros hamster saudáveis. Este processo será realizado por no mínimo 4 vezes, sendo ao final do experimento, as cepas sequenciadas e comparadas. Com isso, será possível verificar ou não a ocorrência de mudança de novos locais no genoma da *L. (L.) infantum chagasi*, após o estímulo do medicamento.

REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, I. B. et al. Visceral leishmaniasis: consequences to women in a Bangladeshi community. **Journal of women's health** (2002), v. 13, n. 4, p. 360–4, 2004.
- ALVAR, J. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 2, p. 298–319, 1997.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 61, n. 5, p. 223–274, 2006.
- ANOOPA SHARMA, D. et al. The economic impact of visceral leishmaniasis on households in Bangladesh. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 5, p. 757–764, 2006.
- AREVALO, J. et al. Influence of Leishmania (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 12, p. 1846–1851, 2007.
- BEVERLEY, S. M. Gene amplification in Leishmania. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p. 417–44, 1991.
- BLAST- Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI). Leishmania infantum JPMC5 genome chromosome 8. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 23 de maio de 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l: s.n.], Brasília, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. p. 177, 2010a.
- BRASIL, M. DA S. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2498–2498, 2010b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. p. 812, 2014.
- BRYCESON, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 928–934, 2001.
- CABRERA, M. et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1259–64, 1995.
- CAMARA, C. et al. Characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology research** v. 108, p. 671–677, 2011.

CAMPOS, R.; PIANTA, C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul–Brasil. **Bol Saúde**, v. 15, n. 1, p. 61–71, 2001.

CASTILHO, T. M. et al. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of Leishmania Species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 2, p. 540–546, 2003.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHOUDHURY, K. et al. Identification of a Leishmania infantum gene mediating resistance to SbV and SbIII. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1411–1423, 2008.

COLOMBO, F. A. et al. Detection of Leishmania (Leishmania) infantum RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 267–274, 2011.

COLOMBO, F. A. et al. Performance of a real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a L. (L.) infantum hypothetical protein as target in canine samples. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 156–162, 2015.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 73, n. 1–2, p. 145–155, 1995.

DANESHBOD, Y. et al. Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 135, n. 4, p. 478–482, 2011.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Epidemiologia e controle da leishmaniose nos países andinos. Cad. Saude Pública, Rio de Janeiro**, v. 16, n. 4, p. 925–950, 2000.

DE ALMEIDA, M. E. et al. Identification of Leishmania spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3143–3149, 2011.

DE SOUZA MOREIRA, D.; FERREIRA, R. F.; MURTA, S. M. F. Molecular characterization and functional analysis of pteridine reductase in wild-type and antimony-resistant Leishmania lines. **Experimental Parasitology**, v. 160, p. 60–66, 2016.

- DEPLEDGE, D. P. et al. Comparative expression profiling of *Leishmania*: Modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, 2009.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.
- DESJEUX, P.; ALVAR, J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 1, p. S3–S15, 2003.
- DUJARDIN, J. C. et al. From population to genome: ecogenetics of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 89 Suppl 1, p. 45–53, dez. 1995.
- GHOBAKHLOO, NAFISEH; MOTZADIAN, MOHAMMED HOSSEIN; FARDAEI, M. Expression Analysis of Multiple Genes May Involve in Antimony Resistance among *Leishmania major* Clinical Isolates from fars province, Central Iran. **Iran Journal Parasitology**, v. 11, n. 2, p. 168–176, 2016.
- GOURBAL, B. et al. Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin and Biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, n. 30, p. 31010-31017, 2004.
- HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015.
- HENDRICKX, S. et al. Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1875–1881, 2014.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191–1199, 1999.
- KAZEMI, B. Genomic Organization of *Leishmania* Species. **Iranian J Parasitol**, v. 6, n. 3, p. 1–18, 2011.
- LACHAUD, L. et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, n. Pt 3, p. 197–207, 2002.
- LEPROHON, P. et al. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 5, n. 1, p. 26–35, 2015.
- LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3136, Sept. 2014
- MARY, C. et al. Frequency of drug resistance gene amplification in clinical *Leishmania* strains. **International Journal of Microbiology**, v. 2010, 2010.
- MONDELAERS, A. et al. Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0154101, 2016.
- NANTULYA, V. M. Molecular diagnosis of parasites. **Experientia**, v. 47, n. 2, p. 142–145, 1991.

- NATH-CHOWDHURY, M. et al. Real-time PCR using FRET technology for Old World cutaneous leishmaniasis species differentiation. **Parasit Vectors**, v. 9, n. 1, p. 255, 2016.
- O BONAGA, R. et al. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by leishmania subgenus viannia species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 144–152, 2014.
- PALUMBO, E. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: a review. **Am J Ther**, v. 16, n. 2, p. 178–182, 2009.
- PAPADOPOULOU, B. Mechanisms of Drug Resistance in Leishmania. **Parasitology Today**, v. 9, n. 5, p. 150–153, 1993.
- PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. **Nat. Genet**, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2008.
- PIRMEZ, C. et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1819–23, 1999.
- RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. *Leishmania* /HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. sup1, p. 17–28, 2003.
- READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Eurosurveillance**. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). v. 15, n. 10, p. 19505, 2010.
- ROBERTS, S. C. The genetic toolbox for Leishmania parasites. **Bioeng Bugs**. v.2 n.6 p. 320–326, Nov/Dec 2011.
- ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res.**, v. 21, p. 2129–2142, 2011.
- ROSE et al. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. **Int. J. Parasitol.** v. 34, pp. 655-664, 2004.
- SCHALLIG, H. D. F. H. et al. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 8, p. 641–651, 2002.
- SEIFERT, K. et al. Characterisation of Leishmania donovani promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 4, p. 380–387, 2003.
- SILVA, Joana Carolina da. **Avaliação da atividade leishmanicida no contexto *in vivo* de compostos análogos da miltefosina**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.
- SHAW, S. E.; LANGTON, D. A.; HILLMAN, T. J. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 281–285, 2009.
- STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**. v.118 p.1301–1310, 2008.

SUNDAR, S. et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases** : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, 2000.

TEIXEIRA, D. E. Atlas didático: **Ciclo de vida da Leishmania**. Rio de Janeiro: Fundação Cecierj, 2013, p. 64.

UBEDA, J.-M. et al. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. **Genome Biology**, v. 9, n. 7, p. R115, 2008.

UBEDA, J. M. et al. Genome-Wide Stochastic Adaptive DNA Amplification at Direct and Inverted DNA Repeats in the Parasite *Leishmania*. **PLoS Biology**, v. 12, n. 5, 2014.

VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–11, 2017.

WERNECK, G. L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, v. 31, n. 3, p. 174–7, 2003.

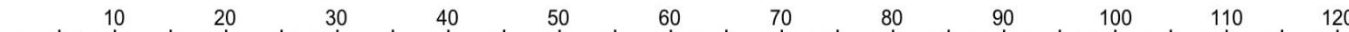
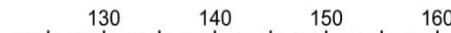
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. **Geneva**, 2010. p. 22–26.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis control programme**. Annual country reports, 2015. Disponível em: <http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_VL_2015_rev.png>. Acesso em: 22 de outubro de 2017.

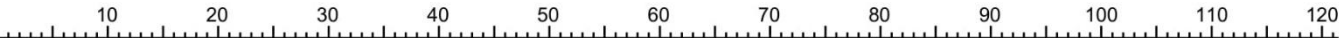

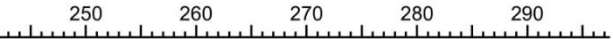
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**, 2014. Disponível em: <www.who.int/gho/neglecteddiseases/leishmaniasis> Acesso em: 19 de abril de 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis – Facts sheet. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 25 de maio de 2018.

APÊNDICE A – CONSENSO FINAL CRO81

| | |
|--|---|
| |  |
| | <p style="text-align: center; margin: 0;">CTTCAACCAAGACGATGATGAGCGCTGGTGGGGCCCATCCGCGTCCGTCAATCATGCATACACGCTTCACCACCACCACCACCACCACCAGCAGCAGCAAGGAATCACTCATTCGTC</p> |
| <p>FR796440.1 editado.seq(111>1150) →</p> <p>consenso 53 pl.seq(15>157) →</p> <p>consenso 54 pl.seq(15>156) →</p> <p>consenso 110 pl.seq(15>153) →</p> <p>consenso 128 pl.seq(15>157) →</p> <p>consenso INF pl.seq(15>153) →</p> | <p>CTTCAACCAagacgatgatgagcgctggtggggcccatccgcgctccgtcaatcatgcatacacgcttcaccaccaccaccaccaccaccagcagcagcaaggaatcactcattcgtc</p> <p>aagacgatgatgagcgctggtggggcccatccgCGTCCGTCAATCATGCATACACGCTTCACCACCACCACCACCACCACCAGCAGCAGCAAGGAATCACTCATTCGTC</p> <p>AAGACGATGATGAGCGCTGGTGGGGCCCATCCGCGTCCGTCAATCATGCATACACGCTTCACCACCACCACCACCACCACCAGCAGCAGCAAGGAATCACTCATTCGTC</p> <p>aagacgatgatgagcgctggtggggcccatccgcgctccgtcaatcaTGCATACACGCTTCACCACCACCACCACCACCACCAGCAGCAGCAAGGAATCACTCATTCGTC</p> <p>aagacgatgatgagcgctggtggggcccatccgcgctccgtcaatCATGCATACACGCTTCACCACCACCACCACCACCACCAGCAGCAGCAAGGAATCACTCATTCGTC</p> <p>aagacgatgatgagcgctggtggggcccatccgcgctccgtcaaTCATGCATACACGCTTCACCACCACCACCACCACCACCAGCAGCAGCAAGGAATCACTCATTCGTC</p> |
| | <p style="text-align: center; margin: 0;">  </p> <p style="text-align: center; margin: 0;">CCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAACCAagttctagc</p> |
| <p>FR796440.1 editado.seq(111>1150) →</p> <p>consenso 53 pl.seq(15>157) →</p> <p>consenso 54 pl.seq(15>156) →</p> <p>consenso 110 pl.seq(15>153) →</p> <p>consenso 128 pl.seq(15>157) →</p> <p>consenso INF pl.seq(15>153) →</p> | <p>ccctgcgccgggCGGGTactaccaaacaagttctagc</p> <p>CCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAACCA</p> <p>CCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAACCA</p> <p>CCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAACCA</p> <p>CCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAACCA</p> <p>CCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAACCA</p> |

APÊNDICE B – CONSENSO FINAL CRO82

| | |
|---|--|
| |  |
| | <hr/> |
| | <p style="font-family: monospace; font-size: 0.8em;">cagcaaggaATCACTCATTTCGTCGCCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAAACCAAGTTCTAGCGCATCCACAGCAACAGCAGCAGCCGTCCTAGCATTGCAGCGGCCAGCCGCGACACCGA</p> |
| <p>FR796440.1 editado.seq(111>1150) →</p> <p>consenso 53 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 54 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 110 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 128 p2.seq(2>280) →</p> <p>consenso INF p2.seq(1>279) →</p> | <p>cagcaaggaatcactcatttcggtccctgcgccgggCGGGTACTACCAAAACCAAGTTCTAGCGCATCCACAGCAACAGCAGCAGCCGTCCTAGCATTGCAGCGGCCAGCCGCGACACCGA</p> <p>ATCACTCATTTCGTCGCCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAAACCAAGTTCTAGCGCATCCACAGCAACAGCAGCAGCCGTCCTAGCATTGCAGCGGCCAGCCGCGACACCGA</p> <p>ATCACTCATTTCGTCGCCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAAACCAAGTTCTAGCGCATCCACAGCAACAGCAGCAGCCGTCCTAGCATTGCAGCGGCCAGCCGCGACACCGA</p> <p>ATCACTCATTTCGTCGCCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAAACCAAGTTCTAGCGCATCCACAGCAACAGCAGCAGCCGTCCTAGCATTGCAGCGGCCAGCCGCGACACCGA</p> <p>ATCACTCATTTCGTCGCCCTGCGCCGGGCGGGTACTACCAAAACCAAGTTCTAGCGCATCCACAGCAACAGCAGCAGCCGTCCTAGCATTGCAGCGGCCAGCCGCGACACCGA</p> |
| | <hr/> |
| |  |
| | <hr/> |
| | <p style="font-family: monospace; font-size: 0.8em;">ACGCCAGCGGCACGCTGCTCCGCGCCTCGCCGGGTTCGAGCAGCGCCACAACCAGCAGTATCAACGACAGCAGCAGCAGAAGCCAACGTCTCCGTACGCCTCTACGAAGGAAGAAGCGGA</p> |
| <p>FR796440.1 editado.seq(111>1150) →</p> <p>consenso 53 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 54 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 110 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 128 p2.seq(2>280) →</p> <p>consenso INF p2.seq(1>279) →</p> | <p>acgccagcggcagcgtgctccgcgctcgccggggtcgagcagcgccacaccagcagatcaacgacagcagcagcagagaagccaacgtctccgtacgctctacgaaggagaagcgga</p> <p>ACGCCAGCGGCACGCTGCTCCGCGCCTCGCCGGGTTCGAGCAGCGCCACAACCAGCAGTATCAACGACAGCAGCAGCAGAAGCCAACGTCTCCGTACGCCTCTACGAAGGAAGAAGCGGA</p> <p>ACGCCAGCGGCACGCTGCTCCGCGCCTCGCCGGGTTCGAGCAGCGCCACAACCAGCAGTATCAACGACAGCAGCAGCAGAAGCCAACGTCTCCGTACGCCTCTACGAAGGAAGAAGCGGA</p> <p>ACGCCAGCGGCACGCTGCTCCGCGCCTCGCCGGGTTCGAGCAGCGCCACAACCAGCAGTATCAACGACAGCAGCAGCAGAAGCCAACGTCTCCGTACGCCTCTACGAAGGAAGAAGCGGA</p> <p>ACGCCAGCGGCACGCTGCTCCGCGCCTCGCCGGGTTCGAGCAGCGCCACAACCAGCAGTATCAACGACAGCAGCAGCAGAAGCCAACGTCTCCGTACGCCTCTACGAAGGAAGAAGCGGA</p> <p>ACGCCAGCGGCACGCTGCTCCGCGCCTCGCCGGGTTCGAGCAGCGCCACAACCAGCAGTATCAACGACAGCAGCAGCAGAAGCCAACGTCTCCGTACGCCTCTACGAAGGAAGAAGCGGA</p> |
| | <hr/> |
| |  |
| | <hr/> |
| | <p style="font-family: monospace; font-size: 0.8em;">AAGGCAGATGCGTAGGAGCGGCAACTACAACAATCACAGCGTGCACaacagcaac</p> |
| <p>FR796440.1 editado.seq(111>1150) →</p> <p>consenso 53 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 54 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 110 p2.seq(1>279) →</p> <p>consenso 128 p2.seq(2>280) →</p> <p>consenso INF p2.seq(1>279) →</p> | <p>aaggcagatgcgtaggagcggcaactacaacaatcacagcgtgcacaacagcaac</p> <p>AAGGCAGATGCGTAGGAGCGGCAACTACAACAATCACAGCGTGCAC</p> <p>AAGGCAGATGCGTAGGAGCGGCAACTACAACAATCACAGCGTGCAC</p> <p>AAGGCAGATGCGTAGGAGCGGCAACTACAACAATCACAGCGTGCAC</p> <p>AAGGCAGATGCGTAGGAGCGGCAACTACAACAATCACAGCGTGCAC</p> <p>AAGGCAGATGCGTAGGAGCGGCAACTACAACAATCACAGCGTGCAC</p> |

APÊNDICE D – CONSENSO FINAL CRO84

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|---------------------------------|---|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| | gtactttctGTTAGGGTACGGCGGGTATGTGGGCGCTTACCATATATATATATATATATTTGTGTGTGTATGTGTATGTGTGCTGTTCTTACGTGGATGTCCTATGGAGAGTTTATAAAAGGTTT | | | | | | | | | | | |
| FR796440.1 editado.seq(26>1587) | → | gtactttctgtagggtagcggcgggatgtggcgcttaccatatatatatatatatttgtgtgtgtatgtgtatgtgtgctgttcttacctggatgtctatggagagtttataaaaggttt | | | | | | | | | | |
| consenso 53 p4.seq(1>190) | → | GTTAGGGTACGGCGGGTATGTGGGCGCTTACCATATATATATATATATTTGTGTGTGTATGTGTATGTGTGCTGTTCTTACGTGGATGTCCTATGGAGAGTTTATAAAAGGTTT | | | | | | | | | | |
| consenso 54 p4.seq(1>190) | → | GTTAGGGTACGGCGGGTATGTGGGCGCTTACCATATATATATATATATTTGTGTGTGTATGTGTATGTGTGCTGTTCTTACGTGGATGTCCTATGGAGAGTTTATAAAAGGTTT | | | | | | | | | | |
| consenso 110 p4.seq(1>190) | → | GTTAGGGTACGGCGGGTATGTGGGCGCTTACCATATATATATATATATTTGTGTGTGTATGTGTATGTGTGCTGTTCTTACGTGGATGTCCTATGGAGAGTTTATAAAAGGTTT | | | | | | | | | | |
| consenso 128 p4.seq(15>204) | → | gtagggtagcggcgggatgtggcgcttaccatatatatatatatatttGTGTGTGTATGTGTATGTGTGCTGTTCTTACGTGGATGTCCTATGGAGAGTTTATAAAAGGTTT | | | | | | | | | | |
| consenso INF p4.seq(1>190) | → | GTTAGGGTACGGCGGGTATGTGGGCGCTTACCATATATATATATATATTTGTGTGTGTATGTGTATGTGTGCTGTTCTTACGTGGATGTCCTATGGAGAGTTTATAAAAGGTTT | | | | | | | | | | |
| | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | | | | |
| | GTTTTCGCGACCGCGTGCCTCTGCTGTTGTTGCTGTTGATATCGCGGCTGTGTGGTGGCTTCTCTCTCGGGTTGCCTGatTTTTTTTT | | | | | | | | | | | |
| FR796440.1 editado.seq(26>1587) | → | gttttcgacccgctgctctgctgttgttgcctgtgatatcgcggtgtgtggcttctctctcgggttgcctgatTTTTTTTT | | | | | | | | | | |
| consenso 53 p4.seq(1>190) | → | GTTTTCGCGACCGCGTGCCTCTGCTGTTGTTGCTGTTGATATCGCGGCTGTGTGGTGGCTTCTCTCTCGGGTTGCCTG | | | | | | | | | | |
| consenso 54 p4.seq(1>190) | → | GTTTTCGCGACCGCGTGCCTCTGCTGTTGTTGCTGTTGATATCGCGGCTGTGTGGTGGCTTCTCTCTCGGGTTGCCTG | | | | | | | | | | |
| consenso 110 p4.seq(1>190) | → | GTTTTCGCGACCGCGTGCCTCTGCTGTTGTTGCTGTTGATATCGCGGCTGTGTGGTGGCTTCTCTCTCGGGTTGCCTG | | | | | | | | | | |
| consenso 128 p4.seq(15>204) | → | GTTTTCGCGACCGCGTGCCTCTGCTGTTGTTGCTGTTGATATCGCGGCTGTGTGGTGGCTTCTCTCTCGGGTTGCCTG | | | | | | | | | | |
| consenso INF p4.seq(1>190) | → | GTTTTCGCGACCGCGTGCCTCTGCTGTTGTTGCTGTTGATATCGCGGCTGTGTGGTGGCTTCTCTCTCGGGTTGCCTG | | | | | | | | | | |