

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR
MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO DE
VARIETADES DE *LEISHMANIA* CIRCULANTES NA
REGIÃO NORTE DO BRASIL.**

ALEXANDER SIBAJEV

**MANAUS – AM
2005**

Universidade Federal do Amazonas

Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia

**“Desenvolvimento de Marcador Molecular para o
Diagnóstico de Variedades de *Leishmania*
Circulantes na Região Norte do Brasil”.**

Alexander Sibajev

ORIENTADORA: Dr^a ANTÔNIA MARIA RAMOS FRANCO

Tese de Doutorado apresentado à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia do
convênio UFAM-INPA-IMTM, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

MANAUS – AM

2005

BANCA EXAMINADORA

1. Dra. Antônia Maria Ramos Franco (INPA) AP__
2. Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto (INPA) AP__
3. Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos (INPA) AP__
4. Dr. José Francisco Luitgards Moura (UFRR) AP__
-
5. Dra. Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira (UniNiltonLins) AP__

RESULTADO _____ APROVADO _____

Este trabalho é dedicado a
Pavel Sibajev (*in memoriam*),
meu pai.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e demais participantes do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, e à SUFRAMA pelo apoio à formação em recursos humanos em nossa região.

À Universidade Federal de Roraima, especialmente os colegas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, que tornaram possível minha liberação para o Curso de Doutorado.

Ao Dr. Spartaco Astolfi-Filho que através de seu idealismo e iniciativa possibilitou a realização do Curso de Doutorado em Biotecnologia na Amazônia, no qual tive o privilégio de ser aceito como aluno e fazer parte de sua primeira turma.

À minha orientadora Dra. Antônia Maria Ramos Franco, pelo apoio constante e seguro; pela honra em poder participar de seu convívio e experiência profissional e também pelo excelente assunto de tese com que fui apresentado.

Ao meu co-orientador Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz, que abriu as portas de seu laboratório, concedendo acesso a equipamentos, reagentes e espaço físico indispensáveis a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Tecnologias do DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM e sua equipe Elza, Edmar, Gustavo, Larissa, Márcia e Jonson, especialmente Enedina Nogueira de Assunção e Alessandra Kariza Costa Lima do Nascimento, pelo apoio com presteza e competência na técnica de sequenciamento e pela cordialidade com que sempre fui recebido.

Ao Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA e seus integrantes Roberto, Paulo, Plínio, Francisco, Lourival, Cândido, Armênio, Ana Cleide, Liliane, Dilvia, Michelle e Sônia pelo ambiente de apoio mútuo e em especial Francimeire Gomes, Luanda de Paula Figueira e Karina Câmara de Mota, que colaboraram na manutenção e origem dos isolados de *Leishmania* usados nesse trabalho.

Ao Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane da Fiocruz-AM, especialmente a Fernando Abad-Franch pela ajuda na análise de seqüências e aos colegas Ormezinda, Adriana, Anie,

Cláudia e de seus vários estudantes e das secretárias Marizete e Rosi, com os quais tive a satisfação de compartilhar do ambiente de trabalho acolhedor e estimulante.

Aos colegas do Curso de Doutorado em Biotecnologia, companheiros de uma história de pioneirismo, pelo empenho na construção do curso, juntamente com os excelentes professores que a ele se dedicam.

À Marilaine Martins pela confiança em minha capacidade profissional, carinho e amizade e aos demais colegas da Universidade do Estado do Amazonas e do Instituto de Medicina Tropical do Estado do Amazonas, especialmente o Dr. Marcus Vinitius de Farias Guerra e o Dr. Wilson Alecrim, pela acolhida pelo qual fui recebido nessa prestigiosa instituição.

À Maricleide de Farias Naiff, pela amizade e companheirismo, exemplo de capacidade, de amor ao trabalho e satisfação com o sucesso profissional de seus colegas.

Ao Dr. Hélio Maia (*in memoriam*) pelo exemplo de dedicação à atividade científica, entusiasmo com seus alunos e qualidade profissional.

À minha mãe querida que tem suportado a longa distância e aos meus irmãos pelo apoio e lindos sobrinhos, aos quais tento retribuir dando o mais dedicado bom exemplo.

À Lúcia pela paciência, carinho e delicadeza.

RESUMO

A determinação da espécie responsável pela Leishmaniose Tegumentar Americana e a detecção específica das variedades do protozoário agente dessa doença endêmica na Amazônia, é importante para determinação do comportamento clínico e indicação da conduta terapêutica, devido as diversas respostas aos quimioterápicos pelas espécies de *Leishmania*.

No momento se desconhece um teste disponível para a *Leishmania (Viannia) guyanensis*, que seja capaz também de incluir suas variedades intra-específicas obtidas de casos humanos e de hospedeiros e vetores silvestres. Neste trabalho se conseguiu discriminar alguns isolados de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e também de *Leishmania (Viannia) panamensis* através da reação em cadeia da polimerase direcionada para a amplificação do espaçador transcrito interno (ITS) do gene do RNA ribossomal. A reação positiva é dada pela visualização de um fragmento amplificado de cerca de 229 nucleotídeos, para *L. (V.) guyanensis* e ausente para as outras duas espécies. O diagnóstico pode ser feito com o DNA extraído de cultivo do parasita, diretamente das amastigotas da borda de lesão cutânea ulcerada ou do vetor infectado pela promastigota de *Leishmania*.

Numa etapa seguinte a região ITS do rDNA foi sequenciada para *L. lainsoni*, *L. naiiffi* e quatro cepas de *L. guyanensis* em que duas apresentavam forma muco-cutânea e duas outras a forma cutânea da leishmaniose. Essas sequências foram comparadas com as disponíveis em banco de dados como o Genbank, resultando na confirmação dos dados obtidos de variabilidade genética por outros autores, quando utilizada a técnica de isoenzimas e ITS-RFLP. O posicionamento de *L. lainsoni* e *L. naiiffi* se mostrou mais divergente que *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. panamensis*, dentro do subgênero *Viannia*. Foi também encontrada uma relação de proximidade entre os isolados de *L. guyanensis* IM4243 e IM4235 apresentando lesão cutâneo-mucosa.

As leishmânias do sub-gênero *Viannia* apresentam importância epidemiológica na América do Sul, sobretudo na região amazônica e esse estudo poder ser considerado importante ao desenvolver meios de diagnóstico específico do parasita, detectando sua presença em vetores e reservatórios silvestres em certas áreas e servindo como marcador para a principal espécie responsável pelas formas clínicas de leishmaniose nessa região.

ABSTRACT

The determination of the prevailing species responsible for American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) and the detection at species level of the varieties of the protozoan parasite agent of this endemic disease at the Amazon region are important for determination of the clinical evolution and to better indicate the therapeutic conduct due to the different responses to chemotherapeutic drugs by the *Leishmania* species.

By now we are not aware of an available test to *Leishmania (Viannia) guyanensis* capable of detecting its intra-specific varieties obtained from human clinical presentations or from vertebrate and invertebrate hosts. We succeed to discriminate *Leishmania (V.) guyanensis* from *Leishmania (V.) braziliensis* and also from *Leishmania (V.) panamensis* through a polimerase chain reaction direct genomic DNA amplification aimed at the transcribed internal spacer (ITS) of the ribosomal RNA gene (rDNA). The positive reaction is visualized at the agarose gel electrophoresis by the presence of an aproximatedly 229 nucleotides size band for *L. guyanensis* that is absent for the two other species *L. braziliensis* and *L. panamensis*. The diagnosis can be done using culture material, skin biopsy or squashing the sand fly vector and having the DNA extracted.

In a second step of the investigation, the ITS rDNA was sequenced in *L. lainsoni*; *L. naiffi* and four *L. guyanensis* strains, two of them presenting a muco-cutaneous form of Leishmaniasis. These sequences were compared to others available at the Genbank Database, confirming the previous data from multilocus enzyme electrophoresis and ITS restriction fragment lenght polymorphisms analysis, positioning *L. lainsoni* and *L. naiffi* as more divergent species as compared to *L. braziliensis*, *L. panamensis* and *L. guyanensis* species inside de *Viannia* sub-genus. A correlation was observed in grouping nearer the two *L. guyanensis* strains, respectively IM4243 and IM4235, responsible for the muco-cutaneous form.

This protozoan belonging to sub-genus *Viannia* show clinical and epidemiological importance in South America north region, particularly the Amazon region and this study can be considered an advance in providing a tool to better understand the parasite species silvatic cycle and in providing tools to characterize the main species responsible for the clinical form presentation of tegumentary leishmaniasis in the human population at this region.

Abreviaturas e Glossário de Termos:

ATL- Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

bp- Pares de bases (pb)

°C- Graus Celsius centígrados

DNA - Ácido desoxiribonucleico

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato (dATP: Desoxiadenosina trifosfato; dCTP:

Desoxicitosina trifosfato; dGTP: Desoxiguanosina trifosfato; dTTP: Desoxitimina trifosfato)

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético

ELISA- Ensaio imunoabsorvente enzimático

ETS - Espaçador transcrito externo

Fig - Figura

FNS - Fundação Nacional de Saúde

g - aceleração gravitacional

G6PDH- Glicose-6-fosfato desidrogenase

Hibridização Molecular - Formação de ligações entre duas sequências de nucleotídeos

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

Isolado - Amostra de um organismo, o mesmo que tipo, variedade, cepa ou sub-população.

ITS- Espaçador interno transcrito

Kb- kilobases

KCl - Cloreto de Potássio

kDNA- Ácido desoxiribonucleico do cinetoplasto

L - *Leishmania*

LSU- Sub-unidade grande do ribossomo

M- Molar

mg - miligrama

µg - micrograma

µg/µL - microgramas por microlitro

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

µL - microlitro

min - minuto

mM - milimolar

µM - micromolar

Marcador Molecular- Estrutura associada a identidade ou característica do organismo

Monoclonal - anticorpo derivado de uma população de linfócitos originada de um clone

mRNA- Ácido ribonucleico mensageiro

mtDNA- Ácido desoxiribonucleico mitocondrial

NaCl - Cloreto de Sódio

ng - nanograma

NNN- meio de cultivo bifásico ágar-sangue de Novy, McNeal & Nicolle.

nt- nucleotídeos

NTS- Espaçador não transcrito

pb- pares de base

PBS - Salina tamponada com fosfato

pM- picomol

pmoles - picomoles

PCR- Reação em cadeia da (enzima) DNA polimerase

Primer- sequência de 10 a 40 nucleotídeos iniciadora da DNA polimerase

RAPD - amplificação ao acaso dos polimorfismos do DNA

RFLP- Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (enzimática)

RNA- Ácido ribonucleico

rRNA- Ácido ribonucleico ribossomal

RT-PCR - Reação em cadeia da DNA polimerase precedida pela transcriptase reversa

s - segundo

SDS - dodecil Sulfato de sódio

Sonda - Fragmento de DNA que reconhece uma sequência nucleotídica complementar

SSU- Sub-unidade pequena do ribossomo

TAE- Tampão tris-ácido acético-ácido etilenodiaminotetracético

Tab - Tabela

Taq- *Thermus aquaticus*

TE - Tris(10mM)-EDTA(1mM)

Tris - Hidroximetil aminometano

U - unidade

UV- Luz ultravioleta

Vetor (Biológico) - Invertebrado que transmite um agente infeccioso para outro indivíduo.

WHO - Organização Mundial da Saúde (OMS)

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	1
1.1 Leishmanioses.....	2
1.2 Protozoários e hospedeiros	4
1.3 Diversidade genética em <i>Leishmania</i>	6
1.4 Diagnóstico parasitário	9
1.5 Marcadores moleculares	10
1.6 Sistemática molecular	14
1.7 Análise dos espaçadores do gene do rRNA (ITS-rDNA)	20
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. Capítulo I	23
3.1 Abstract	23
3.2 Introduction	25
3.3 Material and Methods	27
3.4 Results	31
3.5 Discussion	42
3.6 References	45
4. Capítulo II	51
4.1 Abstract	51
4.2 Introduction	52
4.3 Material and Methods	54
4.4 Results	55
4.5 Discussion	64
4.6 References	66
5. Discussão Geral	70
6. Conclusões	76
7. Perspectivas	77
8. Referências Bibliográficas Geral	78
9. Apêndice	91

1. Introdução

Até o momento, se desconhece um marcador molecular descrito na literatura que seja específico para todas as variedades de *Leishmania (Viannia) guyanensis* e que tenha sido testado para os diversos isolados obtidos desse parasito em casos humanos com várias evoluções clínicas e com isolados provenientes do inseto vetor e dos reservatórios vertebrados silvestres. O que se dispõe atualmente são os marcadores moleculares baseados no DNA do cinetoplasto (mitocondrial), e que podem discriminar essa espécie de outras do subgênero *Leishmania*. Para as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) chagasi (=infantum)* foram descritos marcadores moleculares (Mauricio *et al.*, 2000), do tipo sondas de hibridização capazes de diferenciar entre essas espécies, que, no entanto, não apresentam importância epidemiológica comparável com a *L. (V.) guyanensis* em nossa região (Rey, 2001).

Existe uma busca por marcadores para a *Leishmania (V.) braziliensis* baseados no DNA genômico nuclear e no momento apenas um marcador, o gene da enzima polialélica G6PDH têm sido capaz de discriminar espécies de leishmânias dentro do subgênero *Viannia* por seu padrão de bandas de restrição na reação “PCR-RFLP”. No entanto, ainda não foi testada a eficácia desse marcador em variedades de espécies do subgênero *Viannia*, isoladas na região norte (Castilho *et al.*, 2003).

Nossos estudos se concentram no espaçador do gene do RNA ribossomal, que tem sido proposto como bom marcador para vários organismos (Matioli, 2001). Uma vez seqüenciada a região ITS e obtida uma região consenso para os diversos isolados e variedades de *L. (V.) guyanensis*, pode-se ter um teste específico para esse principal agente etiológico da leishmaniose cutânea na região amazônica, e também um teste quantitativo de monitoração da resposta terapêutica e cura da doença pós-tratamento pela tecnologia do

PCR em tempo real, utilizando sondas “Taqman®”, baseadas em sequências altamente específicas do parasito (Heid *et al.*, 1996).

1.1.- As leishmanioses

As leishmanioses que incluem a forma visceral (calazar), muco-cutânea (tegumentar) e cutânea, têm importância epidemiológica mundial e em todo o nosso País, sendo responsáveis por cerca de 20.000 casos/ano no Brasil (Brasil, 2005). O homem sofre como hospedeiro acidental de graves lesões destrutivas da pele e mucosas pela LTA. Em 1990, a OMS (Organização Mundial da Saúde) estimou a existência de 12 milhões de doentes com incidência anual de 400 mil novos casos, sendo que destes, 300 mil eram de leishmaniose tegumentar. As taxas de infecção variam entre os estados, sendo a maior incidência na região norte com 11.211 casos no ano de 2003. Surtos epidêmicos da LTA estão associados às derrubadas de matas para a construção de estradas ou implantação de novos povoados, fato este comum nessa região. A doença também ocorre com frequência em regiões de colonização antiga, onde se verifica o ciclo de transmissão urbana do parasito (Brasil, 2005).

Na região amazônica a forma mais comum da leishmaniose é a cutânea, causada por várias espécies de leishmânias, sendo a *L. guyanensis* a espécie predominante. As lesões apresentam uma hiperplasia histiocitária, com edema e infiltração celular, alterações vasculares, hiperqueratose e necrose cutânea formando uma úlcera rasa, de bordas salientes, podendo as lesões serem únicas ou múltiplas e espalharem-se através de uma adenite satélite. Quando a lesão se encontra numa fase inicial, sem a formação de úlceras crostosas, é denominada forma cutânea papular (Rey, 2001).

A forma cutânea pode ter úlceras cicatrizadas ou em evolução e no caso de algumas variedades de *L. guyanensis* e principalmente pela infecção por *L. braziliensis*, pode a doença evoluir com o acometimento de mucosas, sobretudo a mucosa nasal, geralmente por metástase por via hematogênica, progredindo a lesão em extensão e profundidade desde a cartilagem e ossos do nariz, até o palato, laringe e faringe (Rey, 2001).

A forma cutânea disseminada pode apresentar um aspecto verrucoso e vegetante com aparência de framboesa. Pode ser causada por *L. braziliensis*, dependendo da resposta imunológica do indivíduo. Uma forma disseminada lembrando a lepra tuberculóide com lesões em forma de placa ou com alguns nódulos subcutâneos pode ser causada na região amazônica por *L. amazonensis*, sendo de difícil tratamento, em função da pouca resposta imune aos antígenos parasitários (Rey, 2001).

A forma visceral da doença no Novo Mundo é causada principalmente por *Leishmania chagasi*(=*infantum*), sendo a sinonímia ainda motivo de discussão. Em virtude dos estudos de tipagem bioquímica e molecular (Mauricio *et al.*, 2000), deve ser adotado a denominação *L. infantum*. Na Venezuela também se observa a *L. colombiensis* causando formas viscerais da doença (Rey, 2001; Rodrigues-Bonfante *et al.*, 2003).

No Estado do Amazonas, foram notificados em 2003 pelo Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde um total de 3.436 casos de LTA de um total de 11.231 casos na região norte brasileira. O maior número de casos autóctones notificados de leishmaniose pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas foram na cidade de Manaus, seguido pelo município de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, porém no ano de 2004 este último município ultrapassou a capital totalizando 343 casos. A LTA pode ser, portanto, considerada como uma endemia de importância na região Amazônica.

1.2. Protozoários e hospedeiros

Dentre os protozoários, os da família Trypanosomatidae (Protozoa: Kinetoplastida), são oriundos de diversos hospedeiros, como por exemplo, indivíduos humanos, mamíferos e invertebrados (flebotomíneos e triatomíneos). A Leishmaniose compreende uma gama de doenças encontradas ao redor do Mundo em regiões tropicais e subtropicais, participando de seu ciclo biológico um vertebrado, geralmente um mamífero silvestre e um invertebrado, o flebotomíneo (Lainson & Shaw, 1979).

As formas amastigotas infectam as células fagocíticas como os macrófagos do hospedeiro vertebrado, evoluindo em vários tecidos, causando lesões locais e também disseminação sistêmica da doença.

Os flebotomíneos, pequenos insetos pertencentes à família Psychodidae (Insecta: Diptera: Psychodidae), onde mais de 800 espécies já foram descritas no mundo inteiro, apresentam uma grande diversidade de habitats, sendo encontrados em regiões semi-áridas, florestas, áreas serranas, chegando até áreas urbanas. As fêmeas pelo seu hábito hematofágico são capazes de veicular diversos flagelados da família Trypanosomatidae, dentre eles, representantes dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* (Rey, 2001).

As formas promastigotas são típicas do gênero *Leishmania*, servindo para a diferenciação morfológica de outros gêneros entre os tripanosomatídeos. São observadas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado e também em meios de cultivo do protozoário.

O principal vetor da *L. (Viannia) guyanensis*, espécie de leishmânia comum na região, ao norte do rio Amazonas é a *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* (Arias & Freitas, 1978; Pajot *et al.*, 1982; Ready *et al.*, 1986, Naiff *et al.*, 1998). Este é apontado como o principal vetor desta leishmânia também na região de Manaus e também ao leste da calha do Rio Negro e norte do rio Amazonas. Entretanto, a *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*

também pode ser encontrada ao sul do Rio Negro, sem que tenha sido detectada a infecção natural por *L. (Viannia) guyanensis* (Barrett, 1993).

As espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, seus vetores e reservatórios silvestres de acordo com Shaw (1985); Grimaldi *et al.*, (1989); Kreutzer *et al.*, (1993); Lainson *et al.*, (1989); Lainson & Shaw (1979); Lainson & Shaw (1987); Lainson (1988); Lainson *et al.*, (1990); Silveira *et al.*, (1987); Shaw *et al.*, (1991); Silveira *et al.*, (2002), estão sumarizadas no Quadro a seguir:

Leishmania	Vetor	Reservatório
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	<i>Lutzomyia umbratilis</i> <i>Lu. anduzei</i>	<i>Choloepus didactylus</i> <i>Tamandua tetradactyla</i> <i>Didelphis marsupialis</i>
<i>L. (V.) shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>	<i>Cebus apella</i> <i>Chiropotes satanus</i> <i>Choloepus didactylus</i> <i>Bradypus tridactylus</i> <i>Nasua nasua</i>
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>Lu. intermedia</i> <i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. whitmani</i>	<i>Choloepus didactylus</i> <i>Canis familiaris</i>
<i>L. (V.) peruviana</i>	<i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucarum</i>	<i>Didelphis albiventris</i>
<i>L. (V.) panamensis</i>	<i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. trapidoi</i>	<i>Choloepus hoffmani</i> <i>Bradypus variegatus</i>
<i>L. (V.) naiffi</i>	<i>Lu. airozai</i> <i>Lu. paraensis</i> <i>Lu. squamiventris</i>	<i>Dasyopus novemcinctus</i>
<i>L. (V.) lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>	<i>Coendou sp.</i> <i>Agouti paca</i>
<i>L. (V.) lindenbergi</i>	<i>Lu. antunesi</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>L. (V.) colombiensis</i>	<i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. hartmanni</i>	<i>Choloepus hoffmani</i>
<i>L. (V.) equatorensis</i>	<i>Lu. hartmanni?</i>	<i>Choloepus hoffmani</i> <i>Sciurus granatensi</i>

1.3 - Diversidade genética em *Leishmania*

A biodiversidade compreende a variabilidade em todos os sistemas marinhos e terrestres, entre ecossistemas, espécies e dentro de espécies (Odum, 1988). Dos estudos de diversidade ainda são escassos aqueles que tratam do risco de extinção de microrganismos e existe uma previsão de 400 mil espécies de protozoários esperados a serem descritos, sendo atualmente conhecidos cerca de 40 mil espécies (Dr. José Odair Pereira, comunicação pessoal).

A Amazônia é um dos principais centros de diversidade tropical do planeta e seu desenvolvimento se mostra um desafio, uma vez que uma diversidade de pragas e doenças criam dificuldades para a produção em maior escala e fixação da população humana (Sioli, 1983). Existe, todavia, uma demanda de mercado por produtos oriundos da região, especialmente fitoterápicos; matérias primas vegetais; produtos para a indústria de cosméticos; bioinseticidas e biopolímeros. Para o conhecimento do real potencial de uso de recursos da biodiversidade amazônica se fazem necessários estudos de bioprospecção, que aliados a várias outras abordagens são empregados estudos de etnofarmacologia, quimiosistemática e mais recentemente de ecologia molecular (Barbosa, 1997).

Na região amazônica existem diversos biomas, como o cerrado e a floresta, que juntamente com a mata atlântica formam o maior patrimônio de biodiversidade (Salati, 1983; Wallace, 1978). A diversidade menos conhecida talvez seja a de microorganismos, que convivem como epífitas, simbiotes, comensais ou parasitas de plantas e animais, como é o caso dos protozoários, cuja maior parte é de vida livre, podendo adquirir importância médica, devido a seu potencial de infectarem o homem (Murray *et al.*, 2000; Tearborgh, 1992).

A família Trypanosomatidae possui os gêneros *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas*, *Walaceina*, *Trypanosoma*,

Phytomonas, *Endotrypanum* e *Leishmania*. Os dois últimos gêneros são transmitidos por flebótomos e parecem ser, entre todos os outros gêneros, os mais próximos (Franco, 1995). Enquanto o gênero *Endotrypanum* infecta somente preguiças no Novo Mundo, o gênero *Leishmania* pode infectar répteis e várias ordens de mamíferos, sendo proposto um novo gênero *Sauroleishmania* (Lainson & Shaw, 1987).

De aproximadamente 33 espécies de leishmânias conhecidas, distinguem-se aquelas cujo desenvolvimento se dá no intestino anterior e médio do flebótomo englobadas no subgênero *Leishmania* e aquelas que possuem uma fase de desenvolvimento também no intestino posterior do inseto, englobadas no subgênero *Viannia*, onde estão basicamente as leishmânias do Novo Mundo (Lainson & Shaw, 1987).

Dentro dos subgêneros agrupam-se as espécies em complexos, sendo aqueles do subgênero *Leishmania*: o complexo donovani com *L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. chagasi*(=*infantum*), *L. infantum*; o complexo tropica com *L. tropica* e *L. killicki*; o complexo major com *L. major*; o complexo *aethiopica* com *L. aethiopica*, *L. garnhami*; o complexo mexicana com *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* outras espécies como *L. turanica*, *L. adleri* e espécies não encontradas infectando humanos como a *L. gerbili*, *L. hertigi*, *L. aristidesi*, *L. foratinni*, *L. enrietti*, *L. deanei*, *L. herreri*. No subgênero *Viannia* temos o complexo *braziliensis* com *L. braziliensis*, *L. peruviana*; o complexo *guyanensis* com *L. guyanensis*, *L. panamensis* e outras não especificadas como a *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. colombiensis* e *L. equatorensis*. Estas últimas apesar de pertencerem ao subgênero *Viannia* pelo tipo de evolução no flebótomo, parecem muito diferentes por vários parâmetros biológicos e bioquímicos (Lainson & Shaw, 1987; Zeledon *et al.*, 1979), daí a relevância de maiores estudos sobre a diversidade das espécies de *Leishmania*, pois seu comportamento biológico resulta em diferentes condições clínicas dos organismos infectados.

Naiff *et al.* (1999) demonstraram extensa variação genética entre amostras de *L. (V.) guyanensis* de isolados da Região Amazônica, sugerindo a existência de clones com ampla distribuição geográfica, enquanto que outros clones ocorriam em focos endêmicos bem localizados. O significado epidemiológico de tal variação para os autores não foi definido no estudo, porém pode estar relacionado à maior diversidade de vetores e/ou animais reservatórios envolvidos nos ciclos de transmissão do parasita, tendo assim implicações importantes no controle da doença humana. A caracterização de parasitas é elemento importante para a pronta instalação de uma vigilância epidemiológica, demanda considerada prioritária pelas autoridades sanitárias brasileiras (Dias, 2000).

A distribuição de parasitas e seus reservatórios vertebrados e invertebrados é ampla no Novo Mundo. A *L. braziliensis* ocorre em 15 países da América Central e do Sul até o norte da Argentina, sendo o agente da LTA mais freqüente no Brasil com formas que acometem a mucosa causando em alguns casos destruição da região oro-nasal. A *L. peruviana* ocorre na região andina do Peru podendo ocorrer em cães e no homem sem que haja comprometimento da mucosa. A *L. guyanensis* ocorre no norte da América do Sul até o rio Amazonas, é o agente predominante da LTA na região amazônica brasileira e geralmente a infecção é mais benigna que a causada por *L. braziliensis*, podendo, no entanto, além da forma cutânea apresentar lesão mucosa ou disseminada. A *L. panamensis* ocorrem na América Central e também na Colômbia, Equador e Venezuela e provoca uma lesão predominantemente cutânea. A *L. lainsoni* ocorre no norte do Pará com lesões também cutâneas. A *L. naiiffi* ocorre no Pará e Amazonas causando uma lesão cutânea com evolução benigna. A *L. shawi* ocorre na região amazônica, sendo responsável por uma forma cutânea da doença. A *L. colombiensis* ocorre na Colômbia, Panamá e Venezuela evoluindo geralmente na forma cutânea, podendo em alguns casos causar a forma visceral. A *L. equatorensis* foi encontrada no Equador e sua distribuição abrange a costa pacífica da

América do Sul parecendo evoluir da mesma forma da leishmania anterior. A *L. lindenbergi* produz uma forma cutânea, ocorrendo na região amazônica brasileira (Rey, 2001; Silveira *et al.* 2002).

1.4. Diagnóstico parasitário

É difícil discriminar os tripanosomatídeos a nível de espécie apenas com base na morfologia. Semelhanças ao nível morfológico, biológico e molecular existem entre muitos exemplares desta família de protozoários, isolados de insetos e/ou hospedeiros vertebrados, dificultando a discriminação de parasitas de importância médica. Além disso, a distribuição geográfica dos vetores e dos hospedeiros vertebrados de diversos tripanosomatídeos, geralmente é simpátrica (Freitas *et al.* 1989; Arias & Naiff, 1981; Rey, 2001; Mayr, 1977).

O diagnóstico da leishmaniose cutânea é feito pelo encontro dos parasitos nas lesões, que são visualizados ao microscópio após coloração pelo método de Giemsa; pelo isolamento do parasito em meio de cultivo (Hendricks *et al.*, 1978; Jaffe *et al.*, 1984; Walton *et al.*, 1977) ou infecção em animais de laboratório como o hamster (*Mesocricetus auratus*) e posterior isolamento do parasito a partir das lesões nesses animais. Testes imunológicos intradérmicos como a reação de Montenegro, a pesquisa de anticorpos para *Leishmania*, também auxiliam no diagnóstico. Outros testes baseados na detecção do DNA na biópsia de lesão e o exame histopatológico são métodos auxiliares no diagnóstico da doença (Ferreira & Ávila, 2001). No entanto, são métodos genéricos que não identificam especificamente o agente etiológico e que demandam tempo e profissionais treinados para a visualização e pesquisa do parasito. Em alguns casos, dependendo da espécie em questão e do organismo infectado, a sorologia pode apresentar reações cruzadas com outras espécies de tripanosomatídeos ou a reação intradérmica podem apresentar resultado

negativo (Ferreira & Ávila, 2001). Portanto, é necessária a busca de métodos mais confiáveis, específicos e rápidos para o diagnóstico da leishmaniose, como é o caso da reação em cadeia da polimerase (Coura *et al.*, 1996).

1.5. Marcadores moleculares

Os métodos moleculares têm se mostrado de grande valor na identificação de tripanosomatídeos, fato importante na taxonomia, e por outro lado, no diagnóstico, terapêutica, epidemiologia e controle parasitário. Métodos moleculares, ao nível do DNA genômico, serão, sem dúvida, ferramentas necessárias aos estudos taxonômicos e evolutivos dos organismos. Em esquemas de classificações mais recentes, a análise dos resultados obtidos por diferentes métodos, tem sido feita através de parâmetros fenéticos e filogenéticos (Kreutzer *et al.*, 1987; Lainson & Shaw, 1987; Kreutzer *et al.*, 1991; Grimaldi *et al.*, 1992; Franco *et al.* 1996). Em alguns dos estudos já realizados, empregando-se a taxonomia numérica, baseado em análises fenética e cladística, a análise de eletroforese de isoenzimas obtida a partir do perfil da mobilidade eletroforética, também tem sido empregada em abordagens de evolução molecular e relações taxonômicas entre algumas espécies de tripanosomatídeos (Grimaldi *et al.*, 1991; Hashiguchi *et al.*, 1991; Franco *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 1997 a,b; Franco & Grimaldi, 1999; Franco *et al.*, 2000; Mayrink, 2000).

O desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico permite uma vantagem competitiva em termos de independência de importação externa de “kits” diagnósticos, de alto valor econômico agregado e só disponível no mercado de países mais desenvolvidos. A vantagem de se obter marcadores genômicos específicos reside no menor risco de reações cruzadas com outros Kinetoplastida, sobretudo o *Trypanosoma cruzi*, endêmico em certas regiões do país. O maior número de marcadores disponíveis poderá facilitar a

identificação do parasito em diversos tecidos e animais, evitando-se reações inespecíficas devido a contaminantes nos materiais de análise utilizados como o sangue, biópsias e o conteúdo do tubo digestivo do inseto vetor (Fernandes *et al.*, 1998).

No momento, alguns estudos têm sido realizados pelo grupo da Dra. Antônia Maria Ramos Franco (INPA) utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas na caracterização e tipagem de tripanosomatídeos (Naiff, 1998; Naiff *et al.*, 1999; Franco, 1995; Barbosa *et al.*, 1999). Os resultados mostraram que a técnica é bastante útil, no entanto, existem algumas limitações que devem ser resolvidas. Um dos principais problemas está associado à perda da variabilidade populacional em virtude da necessidade de cultivo dos parasitas para a avaliação do perfil enzimático (Cupolillo *et al.*, 1994; Cupolillo *et al.*, 2001).

A eletroforese de enzimas nem sempre é capaz de distinguir todos os alelos presentes em uma espécie ou população, logo alguns fenótipos que parecem idênticos podem representar genótipos diferentes. Além disso, através das isoenzimas não é possível detectar todas as variações existentes nas populações estudadas (Gibson *et al.*, 1980; Momen, 1984; Shaw, 1982; Rioux *et al.*, 1990).

Resultados parciais obtidos até o momento mostram que os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam poucas diferenças morfológicas do parasito “*in vitro*” e no vetor, até com representantes de outros gêneros, como o *Endotrypanum*, não patogênico ao homem e encontrado apenas em preguiças, mas, no entanto, diferem muito em suas manifestações clínicas, distribuição geográfica, fatores epidemiológicos e uma variedade de critérios biológicos (Souza *et al.*, 1998).

Diversos isolados de *L. (V.) guyanensis* apresentaram heterogeneidade no perfil isoenzimático e também no perfil de digestão do espaçador ITS intergênico do gene que codifica para o RNA ribossomal, quando analisados para as enzimas *SphI* e *HaeIII* (Naiff, 1998). Tal fato pode estar correlacionado à diversidade inter-específica para a *L.*

guyanensis, à sua variação de comportamento biológico e de patogenicidade, bem como pode ser um efeito de sua complexidade epidemiológica, por sua ocorrência e manutenção entre diversas espécies de insetos vetores do gênero *Lutzomyia* e hospedeiros vertebrados, principalmente os desdentados e os marsupiais, na natureza do ambiente amazônico.

Outros métodos vêm sendo propostos para auxiliar a discriminação de espécies e também na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na diversidade genética destes grupos de organismos. Métodos baseados na detecção da resposta imune podem ser utilizados, no entanto, podem apresentar reatividade cruzada com outros parasitas e no caso do estudo sorológico do paciente podem não precisar se a infecção já foi extinta (Alvar *et al.*, 1997).

Segundo Ferreira & Ávila, (2001), quando a caracterização da espécie de *Leishmania* não é possível pelos dados morfológicos, podemos utilizar além das isoenzimas, os anticorpos monoclonais para a microscopia de imunofluorescência ou ligados ao ensaio imuno-enzimático (ELISA) e também a detecção molecular por meio de sondas para o DNA genômico ou mitocondrial. O uso desses métodos permite correlacionar a espécie com seus ciclos epidemiológicos, bem como caracterizar isolados de tecidos e hospedeiros (Berman, 1997). Como exemplo das técnicas moleculares, temos a amplificação ao acaso de sequência do DNA (RAPD) (Gomes *et al.*, 1995; Machado, 1999); hibridização ou amplificação do DNA do cinetoplasto (Degraeve *et al.*, 1994); hibridização ou amplificação da unidade ribossomal 18S (Van Eys *et al.*, 1992; Uliana *et al.*, 1994); hibridização ou reação direta da PCR para os genes de mini-exon (Fernandes *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1998) ou perfil de restrição da amplificação do kDNA, através da PCR-RFLP (Volpini *et al.*, 2004).

Castilho *et al.* (2003) desenvolveu para a *Leishmania (V.) braziliensis* uma reação de PCR específica baseada no gene da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). No trabalho de Marfurt *et al.* (2003) a sequência alvo era a fita líder de mRNA dos tripanosomatídeos (gene de mini-exon), que quando submetida a restrição enzimática, resultou perfis diferentes para as espécies de *Leishmania* como a *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) panamensis* and *L. (V.) naiffi*. No entanto, não pode distinguir a *L. (V.) guyanensis* de *L. (V.) panamensis* ou a *L. (V.) braziliensis* de *L. (V.) peruviana*. Mendoza-Leon *et al.* (2002), sugerem a utilização de uma sequência beta de DNA de 500 pares de bases localizada no gene da beta-tubulina. Fragmentos de restrição (RFLP) e análise de hibridização têm mostrado que a sequência é específica para o subgênero *Viannia*, especificidade confirmada pela PCR. Esta sequência foi praticamente ausente para *L. colombiense* e *L. equatorensis*.

Algumas proteínas de superfície têm sido apontadas como espécie-específicas. Esse parece ser o caso das kinesinas que fazem parte das proteínas motoras do cinetoplasto, sendo a rK9 associada a *L. chagasi* (=infantum) e a rK39 associada a *L. donovani*. Existem também proteínas associadas ao estímulo da resposta *Th1*, características das espécies de leishmânias capazes de estimularem uma resposta imunológica eficiente por parte do hospedeiro e que são alvo de pesquisas para uma vacina contra a leishmaniose (Pascalis *et al.*, 2003). Outros métodos de tipagem como a caracterização dos açúcares de superfície do parasita, envolvido no mecanismo de adesão à superfície celular do macrófago (Wilson & Pearson, 1988), também buscam estender os conhecimentos da pesquisa básica, de compreensão da diversidade, evolução e tipificação dos organismos, à pesquisa aplicada, de determinação da virulência, sensibilidade a drogas e citocinas eficientes na resposta imunológica (Colmenares *et al.* 2002).

Existe também a necessidade de se desenvolver um método que possa ser utilizado mais diretamente sem a necessidade de passagem em meio de cultura, evitando a perda da variabilidade populacional que normalmente acontece com o cultivo dos parasitos e desta forma facilitando os estudos epidemiológicos. O emprego de metodologias de PCR (Innis *et al.*, 1990) e sequenciamento tem auxiliado muito neste tipo de problema, no entanto, ainda não se conhece uma metodologia definida, que já possa ser aplicada diretamente e que consiga separar as espécies de parasitas e ao mesmo tempo sirva como marcador para estudos genéticos populacionais (Grimaldi. & Tesh,1993).

1. 6 - Sistemática molecular

A sistemática molecular tem como objetivo o estudo das características genéticas por técnicas como o sequenciamento; padrão de restrição de fragmentos de DNA por meio de enzimas endonucleases e análise de seqüências de DNA intercaladas entre genes. No caso de leishmânias e outros microrganismos é possível que estes estudos levem a um melhor conhecimento da diversidade de certas espécies com uma grande distribuição e variedade intra-específica, confirmando a existência de espécies válidas e novas, ou inversamente, quando análises por outros métodos indicaram a existência de espécies diversas, o método molecular pode definir exemplares de uma mesma espécie, como ocorreu com a *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* (Hyde, 1990; Mauricio *et al.*, 2000).

A análise filogenética que evoluiu a partir do século XVII através da coleta de dados, principalmente geológicos, indicava que o mundo em seu componente biótico e abiótico, não era tão recente e imutável. Tais idéias foram somente consolidadas no século XIX e XX com Lamarck, Darwin e Wallace. Para estes a filogenia não seria uma progressão de formas em direção a perfeição, afastando-se assim a idéia central do

pensamento teológico em que haveria finalidades divinas no processo de modificação dos organismos. O estudo da filogenia passou a considerar dados populacionais com a visão que a variabilidade de indivíduos de uma espécie não era mais encarado como cópias imperfeitas de uma essência, mas sim como características passadas a progênie das variações naturais relacionadas à sobrevivência diferencial dos tipos melhor adaptados às condições prevalentes do meio no momento (Avisé & Wollenberg, 1997; Hills *et al.*, 1996).

A partir de 1940 surgiu a síntese evolutiva, sendo as idéias de Mendel resgatadas e servindo para explicar a origem da variação apontada nos experimentos de Darwin. Para isto contribuíram, entre outros, Fisher, Haldane, Wright, Dobzhansky, Huxley e Mayr considerando que a observação da evolução contínua a nível populacional poderia advir de modificações abruptas ou subjacentes a certos indivíduos que frente à seleção se tornam mais adaptados e fundadores de um caractere novo dentre os vários que constituem os indivíduos em suas populações (Hills *et al.*, 1996).

A noção que os seres vivos partilham de um ancestral comum e que a estrutura dos organismos de hoje testemunha parte de sua história evolutiva, já defendida por Haeckel, fundou as bases da construção de árvores filogenéticas e demandou o desenvolvimento de recursos metodológicos para a construção das filogenias mais consistentes. O primeiro dado analisado foi a morfometria com a análise subjetiva do peso relativo das características utilizadas por um especialista do estudo do grupo taxonômico em questão. A análise filogenética evoluiu para a sistemática fenética com a abordagem da maior quantidade possível de similaridade entre os organismos estudados, com o racional que quanto maior a proximidade, menor o tempo de divergência evolutiva (Hyde, 1990; Mayr, 1997).

Na análise cladística, criada por Zimmermann e Hennig, é importante não considerar convergências, reversões, paralelismos e características primitivas conservadas sendo somente aceitos os agrupamentos monofiléticos, em que um ancestral e todos seus descendentes pertencem a um grupo definido. Os grupos parafiléticos, com muitas mudanças a partir de um mesmo ancestral, constituindo linhagens irmãs, não permitem inferência filogenética, como é o caso dos répteis, pois esse grupo exclui os seus descendentes: aves e mamíferos. Os grupos polifiléticos, compostos por vários ancestrais diferentes também não são aceitos pela análise cladística. A dificuldade nesse tipo de análise é uma vez não se conhecendo o ancestral em comum, como é o caso das espécies de *Leishmania* dentro do subgênero *Viannia*, é identificar uma característica como sendo homóloga, ou seja, vinda do ancestral mais próximo. Nesses casos a análise numérica de todas as características indistintamente, sem atributo de valor de um determinado caractere sobre outro, parece ser o tipo de análise mais adequada a ser adotada e se aplica, sobretudo, em relação aos dados moleculares (Li & Graur, 1991; Matioli, 2001).

Quando não existem características morfológicas suficientes compartilhadas entre organismos mais distantes, como é o caso dos protozoários, a análise molecular pode ser muito útil. Dentre essas moléculas o DNA, RNA e as proteínas são as que carregam maior significado para utilização de inferência filogenética. Os primeiros estudos utilizaram anticorpos através da intensidade de reações cruzadas que sugeriam haver um grau de parentesco entre os organismos. Com o DNA um estudo semelhante foi utilizado baseado na hibridação entre moléculas, cuja intensidade deveria refletir uma proximidade filogenética entre organismos. Após os trabalhos de Avery, MacLeod, MacCarthy, Wilkins, Watson, Crick, Jacob e Monod mostrando a hereditariedade, como sendo produto do DNA com estrutura e processo de expressão conhecidos, tornou-se claro que a informação genética seria mais segura que os dados indiretos, como as proteínas, pois a informação

filogenética é uma característica herdável. Além disso, cada grupo de nucleotídeos que contribuem para a codificação de um aminoácido se torna um caráter independente de análise, sendo que um gene pode envolver centenas de características (Amorim, 1997; Hills *et al.*, 1996).

Dentre os métodos de análise da informação trazida pelos marcadores moleculares estão a análise de distâncias, parcimônia máxima ou verossimilhança máxima. Os dados são basicamente fenéticos (numéricos) embora possam ser arbitrariamente atribuídos pesos ao cálculo estatístico das sequências. Pode-se então construir uma árvore filogenética a partir de um algoritmo computacional ou criar várias árvores para maximizar ou minimizar uma certa característica, como por exemplo, o número de substituições de nucleotídeos. Os métodos que se baseiam na análise de distâncias entre sequências são os de computação mais veloz e são úteis principalmente na análise de um grande número de grupos taxonômicos (entre famílias, gêneros ou espécies). Um desses métodos é o de agrupamento vizinho (*neighbour joining*) que junta as sequências par a par, sendo o resultado uma matriz triangular de distâncias. Um método geralmente utilizado para a comprovação da otimalidade da construção de uma árvore filogenética é o de mínimos quadrados, em que se procura minimizar a distância, na forma de soma dos quadrados das diferenças, entre os dados observados e esperados na árvore analisada (Hills *et al.*, 1996; Matioli, 2001).

Os métodos de cálculo de distância filogenética mais utilizados são o UPGMA ("unweight pair group method with arithmetic mean"), que é a formação de grupos através do pareamento dos indivíduos baseado na média aritmética simples, que assume que as linhagens evoluíram a partir de um ancestral com a mesma velocidade, resultando uma árvore em que a distância da ponta dos galhos até a raiz é a mesma; e o NJ ("neighbour joining") que é o agrupamento vizinho resultante do pareamento entre linhagens que podem ter uma taxa de evolução diferente, formando uma árvore aditiva cuja distância

entre a raiz e os ramos terminais da árvore podem variar em seus comprimentos (Li & Graur, 1991; Schneider, 2003).

Os métodos de otimização, como o de parcimônia permitem considerar determinados pesos aos dados moleculares observados como a modificação de um certo aminoácido num sítio importante da molécula e assim se aceita um preceito da cladística de não se misturar todas as características como igualmente válidas para a definição do parentesco. Dentre os diferentes métodos, um dos mais usados é o de Sokal em que as mudanças devem ocorrer de forma irreversível. Embora a parcimônia tenha por premissa que as mudanças ocorram com a mesma velocidade em todas as linhagens e esse nem sempre seja o caso verdadeiro, acontece que quanto maior o número de dados, maior a confiança no desenho da árvore filogenética, pois mudanças rápidas e lentas dos caracteres estariam sendo balanceadas (Hills *et al.*, 1996; Schneider, 2003).

Já o método de otimização por verossimilhança máxima é feito com uma grande quantidade de dados estatísticos e de forma a tornar possível a enorme quantidade de multiplicações e casas decimais envolvidas. Se expressa a verossimilhança (likelihood) na forma de um logaritmo neperiano ($\ln L$), que mostra a soma das probabilidades de que cada alinhamento ancestral possa ter resultado no alinhamento observado no presente, funcionando como um teste estatístico clássico entre os dados esperados e os observados. No caso dos dados moleculares deve-se dispor de modelos que especifiquem como as sequências estudadas evoluem. Para algumas sequências gênicas a taxa de evolução foi calculada em organismos específicos por autores como Kimura, Felsenstein e Nei e consideram o tipo e frequência de substituição de certos nucleotídeos. No caso dos genes ribossômicos existem regiões de evolução lenta e outras de evolução rápida. Conforme se utilizem mais parâmetros para explicar a evolução das sequências, maior se torna a verossimilhança (Hills *et al.*, 1996; Schneider, 2003).

A complexidade das análises e a exigência de recursos computacionais de grande porte, sobretudo na análise de grupos taxonômicos muito numerosos contribuem para a baixa utilização da máxima verossimilhança, sendo este método aplicado mais especificamente para análise de modificação genética e da diversidade proteica e menos para análise sistemática e filogenética entre os vários *taxa*, levando em consideração o postulado de Ockham que as hipóteses mais simples têm preferência sobre as mais complexas, quando ambas explicarem igualmente uma dada situação (Hills *et al.*, 1996; Li & Graur, 1991).

A procura de uma filogenia é uma estimativa sobre um processo passado, a qual não se tem mais acesso, sobretudo no caso dos microorganismos como os protozoários, em que o registro fóssil é mais improvável de ser obtido. Para se avaliar a confiabilidade de um processo de filogenia, geralmente se utiliza medidas de comparação com filogenias que se conhece com certeza a comparação de incertezas entre outras análises, buscando aquela que requeira o menor número de dados para se chegar a uma filogenia. O teste mais usado para esse fim é o "bootstrap", que se baseia na perturbação aleatória de um conjunto de dados, pela substituição de algumas bases em uma sequência, por exemplo. A suposição é que pequenas modificações nos dados não diminuirão a capacidade de se encontrar os grupamentos, caso estes estejam bem representados pelos dados. Desta forma, um baixo valor de "bootstrap" sugere um baixo suporte dos dados em relação a cada ramo de uma árvore filogenética. O limiar da significância deve ser de 70% de "bootstrap" quando há repetibilidade dos dados, enquanto que para dados baseados em uma única observação, deve se considerar significativo valores superiores a 95% de "bootstrap" (Li & Graur, 1991; Schneider, 2003).

Os programas para análise de alinhamento nucleotídico, entre eles o ClustalW servem para comparar par a par medindo a similaridade entre eles, descontando o número

de substituições de bases e intervalos nas sequências comparadas. A escolha do gene em questão é fundamental para o sucesso da análise, em função de sua conservação e do número de nucleotídeos informativos da diversidade dos organismos (Li & Graur, 1991).

No caso do gene que codifica para o RNA ribossomal, este é uma família multigênica. Estudos recentes corroboram a hipótese que as sequências repetitivas, bem como a de famílias multigênicas não evoluem independentemente, mas sim em concerto, o que leva à homogeneidade intraespecífica das sequências de DNA. O evento molecular mais provável para que isto ocorra é decorrente do "crossing-over" desigual e deslizamento das fitas de DNA durante a replicação (Matioli, 2001).

1.7 - Análise dos espaçadores do gene do rRNA (ITS-rDNA).

A região ITS é uma região variável flanqueada por uma região altamente conservada entre vários tripanosomatídeos como *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Crithidia*. Os "primers" utilizados no estudo dos tripanosomatídeos se baseiam nessas sequências, sendo o "primer" **IR1** a sequência conservada da extremidade 3' terminal de SSU -5' GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA GCT GGA TCA TT- 3' e o "primer" **IR 2** a sequência 5' terminal de LSU -5' GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCA GGT CTG- 3' (Hernandez *et al.*, 1990).

Entre os diversos marcadores moleculares o rDNA, ou seja, o gene que codifica a síntese das unidades de RNA que compõem os ribossomos, tem sido utilizado para a sistemática de uma grande diversidade de organismos, sendo que as técnicas mais recentes utilizam uma região determinada do cistron gênico, que é o espaçador interno transcrito (ITS - internal transcribed spacer), sendo suas vantagens:

- o tamanho: o ITS1, mais a região codificante da unidade 5.8S, mais o ITS2 que se localizam entre as regiões codificantes da sub-unidade menor (SSU) e sub-unidade maior

(LSU) no gênero *Leishmania* tem um tamanho de aproximadamente 1 a 1.2 kb, possibilitando a chance de obtenção de dados de uso filogenético;

- a presença em todos os organismos vivos, à exceção dos vírus, o que permite a comparação e estudo filogenético da diversidade de organismos de todos os reinos conhecidos, o que não é possível com qualquer outro método de estudo;

- grande quantidade de cópias do gene que codifica para o RNA ribossomal, sendo este a maior parte do RNA produzido pela célula, contendo no cistron muitas repetições em sequência, que evoluem geralmente em conjunto;

- pressão seletiva de conservação de sequências, exceto aquelas que são transcritas, mas não codificadas, como é o caso das regiões ITS, que permitem estabelecer diferenças específicas e sub-específicas flanqueadas por sequências conservadas onde iniciadores (primers) podem ser desenhados para amplificação dentro do gênero e categorias taxonômicas mais elevadas;

- quantidade de informações já geradas dispostas em bancos de dados, que permitem análise filogenética entre os vários organismos (Li & Graur, 1991; Matioli, 2001).

Se pretende nesse estudo estudar a diversidade específica e inter-específica no gênero *Leishmania*, sobretudo em algumas espécies do subgênero *Viannia*, cuja variabilidade de espécies e subpopulações (cepas) desses organismos, tem importância na evolução clínica da Leishmaniose, doença de importância mundial, sobretudo na região Norte do Brasil. Existe o interesse na melhoria das técnicas diagnósticas para a tipagem da variedade do agente etiológico, que está relacionado com a evolução da infecção, com os aspectos patológicos e também na conduta terapêutica (Grimaldi & Tesh, 1993).

2- Objetivos

2.1 - Geral

- ❖ Obter um marcador molecular espécie-específico para *Leishmania (Viannia) guyanensis* e aplicá-lo em métodos de diagnóstico laboratorial;

2.2 – Específicos

Capítulo I

- ❖ Desenhar iniciadores (“primers”) gênero e espécie-específicos;
- ❖ Avaliar e implementar a utilização de marcadores genéticos úteis na caracterização das populações de parasitas na Coordenação de Ciências da Saúde, CPCS, INPA;
- ❖ Utilizar marcadores moleculares obtidos neste estudo, na diferenciação de espécies ou variedades de importância epidemiológica de isolados originados de padrões clinicamente específicos (lesão disseminada, ulceração atípica), de origem vetorial e de animais envolvidos no ciclo epidemiológico.

Capítulo II

- ❖ Verificar similaridade das regiões seqüenciadas com outras espécies do subgênero *Viannia*;
- ❖ Comparar seqüências obtidas de produtos de PCR da região espaçadora ITS amplificada, de diversas cepas da espécie *Leishmania (Viannia) guyanensis*;

3 - Capítulo I

A PCR method based on ribosomal RNA gene internal transcribed spacer (rDNA-ITS) discriminates *Leishmania (Viannia) guyanensis* from species of the *Viannia* and *Leishmania* subgenus.

Alexander Sibajev.¹; Sérgio Luis Bessa Luz.²; Karina Câmara da Mota ³; Luanda de Paula Figueira³; Maricleide de Farias Naiff ³; Telma Aquino Damasceno⁵; Spartaco Astolfi-Filho⁴ & Antônia Maria Ramos Franco³.

Doutorado Multi-Institucional em Biotecnologia-UFAM e CCBS-UFRR¹; Laboratório de Biodiversidade do CPqLM&D-FIOCRUZ/AM²; Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas-CPCS-INPA³; Laboratório de Tecnologia do DNA-UFAM⁴ & Escola Superior de Ciências da Saúde-UEA⁵.

Corresponding author: Alexander Sibajev - Universidade Federal de Roraima - Av. Ene Garcez, 2413 - Boa Vista - Roraima - Brasil . CEP 69.304-000. e-mail: sibajev@ig.com.br .

ABSTRACT

The determination of the prevailing species responsible for American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) and the detection at species level of the varieties of the protozoan parasite agent of this endemic disease at the Amazon region are important for determination of the clinical evolution and to better indicate the therapeutic conduct due to the different responses to chemotherapeutic drugs by the *Leishmania* species.

By now we are not aware of an available test to *Leishmania (Viannia) guyanensis* capable of detecting its intra-specific varieties obtained from human clinical presentations or from vertebrate and invertebrate hosts.

The molecular tests by the time can differentiate species representatives of the subgenus *Leishmania* from others belonging to the subgenus *Viannia* based on the kinetoplast DNA or when they are based on the mini-exon sequence, can distinguish species of the *Viannia* subgenus other than the *Leishmania (V.) guyanensis*.

We succeed to discriminate *Leishmania (V.) guyanensis* from *Leishmania (V.) braziliensis* and also from *Leishmania (V.) panamensis* through a polimerase chain reaction direct genomic DNA amplification aimed at the transcribed internal spacer (ITS) of the ribosomal RNA gene (rDNA). The positive reaction is visualized at the agarose gel electrophoresis by the presence of an aproximatedly 229 nucleotides size band that is absent for the two other species *L. braziliensis* and *L. panamensis*. The diagnosis can be done using culture material, skin biopsy or squashing the sand fly vector and having the DNA extracted.

This protozoan belonging to subgenus *Viannia* show clinical and epidemiological importance in South America north region, particularly the Amazon region and this study can be considered an advance in providing a tool to better understand the parasite species silvatic cycle and in characterizing the species responsible for the clinical form presentation of tegumentary leishmaniasis in the human population at this region.

Key Words: Leishmaniasis; ITS - Internal Transcribed Spacer; rDNA; ribosomal RNA; *Leishmania guyanensis*; Amazon Region; Genetic Markers.

1-Introduction

The American Tegumentary Leishmaniasis is caused by several species of the protozoan parasite belonging to genus *Leishmania* transmitted by a sand fly of genus *Lutzomyia* during its haematophagic feeding. The natural cycle of this anthrozoosis include in the New World more than 40 species of mammals and about 20 species of the parasite. Leishmaniasis is prevalent throughout the world, in at least 88 countries (Grimaldi *et al.*, 1989). An estimated 12 million people are currently infected and 350 million people live in areas at risk of infection (WHO, 1990; WHO 2005).

Clinical aspects of the disease depends on the parasite species involved that can produce skin ulcers with elevated borders on the face, arms, legs and ears, known as the cutaneous form or develop in skin and mucosa as the muco-cutaneous form, responsible for lesions that can destroy the nose, mouth and throat cavities (Marsden, 1986).

The protozoan can develop in the suprapylarian or peripylarian region of the vector digestive tract and due to this behaviour was classified in *Leishmania* or *Viannia* subgenus. The *L. (V.) braziliensis* is considered the most widespread agent of leishmaniasis mucosal form in the Americas but this clinical aspect can be also presented by other species such as *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) panamensis* (Lainson & Shaw, 1987).

The diagnostic is made using clinical and epidemiological data and visualization of the amastigote forms through the microscope in stained smears of biopsy materials or from cultivation forms as promastigotes. The first is cheap but lack sensitivity due the low number of parasite in tissue samples and the second require a laboratory facility (Weigle *et al.*, 1987). Indirect methods based on detection of immune response can cross-react with other parasites and may not distinguish past and present infection (Alvar *et al.*, 1997). The species characterization by morphological methods is not possible and biochemical as

isoenzymes, immunological as monoclonal antibodies and molecular methods as specific DNA detection have been important to correlate species with their geographical distribution, epidemiological cycles and clinical presentations of disease (Berman, 1997).

Some authors have described the use of molecular methods to characterize *Leishmania* species in isolates from human lesion samples or wild reservoirs hosts and vectors by random polymorphic analysis (Gomes *et al.*, 1995; Shaw, 1997) or using kinetoplast DNA, ribosomal 18s sub-unit or mini-exon genes as targets for hybridizations; PCR and PCR-RFLP techniques (Degraeve *et al.*, 1994; Van Eys *et al.*, 1992; Uliana *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1994; Volpini *et al.*, 2004). Castilho *et al.* (2003) developed to *Leishmania (V.) braziliensis* a specific polymerase chain reaction (PCR) assay, based on the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene that could distinguish this species from the others of the subgenus, however no other species could be identified by a set of specific primers. Using a slight different approach Marfurt *et al.* (2003) succeeded to amplify the spliced leader RNA gene from the trypanosomatids (mini-exon gene) and submit it to restriction fragment length polymorphism analysis in several *Leishmania* species resulting in a characteristic profile to some of them as *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) panamensis* and *L. (V.) naiffi*, but could not distinguish *L. (V.) guyanensis* from *L. (V.) panamensis* or *L. (V.) braziliensis* from *L. (V.) peruviana*.

Since *L. (V.) guyanensis* is an important species in the Amazon region mainly upwards the Amazon River occurring in a high incidence in the Amazonas State (Brasil, 2005), showing an intraspecific variability and pathogenic and therapeutic differences to other *Leishmania* species from the region (Naiff *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2001), we decided to further investigate differences that could be used to obtain a specific molecular diagnostic to this parasite.

2 - Material and Methods

2.1- Parasite strains

The strains representative for the different *Leishmania* species and *Endotrypanum* genus which were used in this study are listed in Table. Samples were obtained from culture promastigotes, cultivated in Schneider's Drosophila medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 26 °C in 250 mL bottles that reached the stationary phase after two weeks when they were harvested, washed in 0.15M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, pelleted by centrifugation and kept frozen at -20°C until processing. The strains were characterized by isoenzyme electrophoresis in a previous work representing several kind of isolates from human and reservoir hosts. Five different isolates of *L. guyanensis* were used in this study. They show a diversity of ITS patterns when submitted to enzyme digestion. Based on the restriction fragment length polymorphism types was used A; B; F; H and I, presenting cutaneous (A,B,F) or mucocutaneous (H,I) clinical forms (Naiff *et al.*, 1999).

2.2- DNA Preparation

The DNA extraction was made using a standard protocol of cell lysis and ethanol precipitation described in Davis *et al.* (1986) when a cultured cell pellet of *Leishmania* promastigotes corresponding to about 10^7 cells were resuspended in 150 μ L lysis buffer (10 mM Tris; 10 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0.4% SDS) and kept for 65 °C /30min., centrifuged at 14.000 rpm/10min., collected the supernatant, added 5 μ L Proteinase K and incubated at 37 °C/30min.. This was followed by addition of 150 μ L salt saturated phenol

pH 7.4 mixing by inversion, centrifugation at 14.000 rpm/ 2 min. and removal of the aqueous phase. Addition of 150 µL chloroform to aqueous phase, repeating the centrifugation to new aqueous phase collection. Then 30 µL 8M KAc and 500 µL frozen ethanol was mixed to the aqueous phase, precipitating the DNA at the tube bottom. The ethanol was decanted, the precipitated DNA air dried and finally resuspended in TE (10mM Tris HCl [pH 7,2], 1 mM EDTA) solution.

2.3- ITS amplification using Leishmania generic primers

We developed our test based on the internal transcribed spacer of the ribosomal RNA gene, capable of distinguish between the two subgenus by the size of fragment as well as to point out intra-specific variations when used with the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique (Cuppolillo *et al.*, 1995).

A first polymerase chain reaction (Mullins & Faloon, 1987) was made in order to obtain the *L. guyanensis* genetic material to be sequenced and for this purpose we used the primers **IR1** and **IR2**, shown in Fig. 4 that describe the annealing region and the sequence of primers, which were designed to the conserved region of the ribosomal RNA gene flanking the internal transcribed spacer (ITS) variable region of the gene (rDNA). Reagents from Invitrogen® were used at standard PCR conditions of buffer (10mM Tris-HCl/50mM KCl pH 8.0), deoxynucleotides (100mM each), MgCl₂ (1.5mM), primers (20 pmol each), 1 unit Taq DNA Polymerase to each tube, 50 ng template DNA for 40 amplification cycles with 58°C annealing temperature in a Eppendorf Thermocycler™. PCR products were separated in a 1,5% agarose gel and visualized at ultraviolet light transillumination showing fragments of about 1 kb in size corresponding to the ITS complete sequence to the *Viannia* subgenus (Cuppolillo *et al.*, 1995).

2.4- Sequencing the ITS region from *Leishmania* species studied

The PCR (Invitrogen® Kit) ~1kb size product (Fig. 1) obtained according to conditions described above was purified in Concert® DNA cleaning columns (GibcoBRL/LifeTechnologies) and then subject to sequencing reaction using the dideoxytermination method (Sanger *et al.*, 1977) and reagents specific for MegaBACE automated sequencer (Amersham Biosciences, 2002) shown in Figure 3. We have sequenced the ITS region of rDNA, responsible for coding rRNA sub-units and spacers gene structure, from *L. guyanensis* strains.

2.5- Analysing the ITS sequences for obtaining a species specific PCR primers

Some of the ITS sequences are already described for the *Viannia* subgenus and are available at the Genbank as *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*(=*infantum*) and *L. guyanensis* strains IM4147 and UUS4. Other sequences were originally obtained in this study to *Endotrypanum schaudinni*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* and others *L. guyanensis* strains. All of them were used to perform a BLAST (Altschul *et al.*, 1997) search, shown in figure 2, to check for *L. guyanensis* specificities. It was used BIOEDIT (Hall, 1999) software to align the sequences and visualize distinct nucleotides were primers could be suitable to a specific PCR reaction for *L. guyanensis*. The primer design and PCR conditions were analyzed using the Primer3 web-based primer prediction.

2.6- Primer design

Candidate amplification primers to identify potential sites for *L. guyanensis* specific PCR priming were obtained after alignment of sequences for the ITS region of the samples already described and then analyzed for false priming regions and internal stability. It was chosen oligonucleotide primers which were specific to *L. guyanensis* “types”. The primers and their sequences are as follows: 5'GCATATATATATATATACGCA CACG3' (Primer **P2** position 483 nt) ; 5'GAGGTGTGGGGGAGGCCTGTACCAGGATAA3' (Primer **REVGUY** position 680 nt) - INPI patent submission no.0000220505211006. The locations and directions of the primers are shown in Fig.7. Oligonucleotides were synthesized by Invitrogen®.

2.7- PCR assay with *Leishmania guyanensis* specific primers

The designed set of primers **P2** and **REVGUY** (Invitrogen®) were used with the standard PCR conditions of buffer (10mM Tris-HCl/50mM KCl pH 8.0), deoxynucleotides (100mM each), MgCl₂ (1.5mM), primers (20 pmol each), 1 unit Taq DNA Polymerase to each tube, 50 ng template DNA for 40 amplification cycles with 58°C annealing temperature in a Eppendorf Thermocycler™.

The reaction products were loaded to an agarose 1.5% gel stained with ethidium bromide (1 µg/mL) and run for 1 hour at 80 V in a eletrophoresis apparatus (Pharmacia®). The fragment obtained was visualized at an U.V. 365 nm light in an Bioimaging System GDS-8000 (UVP™) consisting of a transilluminator device inside a chamber with an

attached camera from which pictures could be taken. The single fragment size measured according to the 1 kb DNA ladder molecular marker (Invitrogen® cat.no. 15615-016).

3- Results

3.1- Primer design.

To develop an assay that would amplify products of different sizes to discriminate *L. guyanensis* from the others species of the *Viannia* subgenus, certain criteria were chosen for primer design, namely, (i) the presence of sequences conserved among all *L. guyanensis* types (ii) elevated copy number as obtained in repetitive sequence of the abundant and stable ribosomal RNA, and (iii) suitable fragment size for agarose gel visualization.

One set of *L. guyanensis* types specific primers was used in the PCR assay with distinct New World *Leishmania* complexes and *Endotrypanum schaudinni*. By means of sequencing the complete internal transcribed spacer (ITS) 1 kb in size fragment of *L. guyanensis* strains and then comparing amongst other species in the *Viannia* subgenus we found a region where primers could be designed (Fig. 4). The ITS fragment shown in Figure 1 can also distinguish the two *Leishmania* subgenus by its comparative size being about 1.2 kb in *L. (L) amazonensis*, corroborating previous studies (Naiff *et al.*, 1999).

Three *L. guyanensis* strains were sequenced IM4243, IM4155 and IM3823 showing only small differences in their composition, but enough to find a region with a different nucleotides in relation to the *L. braziliensis* sequence available at Genbank (Fig. 2). This region amplified by **P2** and **REVGUY**, the selected primers specific for *L. guyanensis*, spans inside ITS2 yielding a 229 nucleotide size fragment (Fig 4).

The primer **P2** when associated with primer **IR2** produced a 480 nucleotide size fragment that amplified several *Leishmania* species. It was decided then to use these **P2** and **IR2** set of primers as a positive control of PCR reaction (Fig.6).

The PCR reaction using the **P2** and **REVGUY** set of primers showed specificity on all five (IM4243; IM4235; M4147; IM4155; IM3823) *L. guyanensis* strains used. It could amplify a less intense band in *L. naiffi*, *L. lindenbergi*, *L. lainsoni* and *L. shawi*. Any bands were amplified in *L. panamensis*, *L. colombiensis*, *L. amazonensis*, *L. deanei*, *L. chagasi* (= *infantum*) and *E. schaudinni*.

3.2 -Detection of *Leishmania* in vectors and skin biopsy material.

DNA extracted from skin biopsy from ulcerate lesion of confirmed cutaneous leishmaniasis from experimental inoculated hamster with *L. (V.) guyanensis* (M4147) and DNA from five specimens of sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* females captured in an endemic area, previously confirmed as positive to natural infection to *Leishmania (Viannia)* sp. (Pinheiro, 2005), yielded a *L. guyanensis* – sized fragment in the PCR assay using the set of the P2/REVGUY primers.

Representative amplifications are shown in Fig. 8. All of these samples were also previously amplified using primers that targets the region of the mini-exon gene and are specific to *Viannia* subgenus, resulting in products with expected size (Pinheiro *et al.*, 2005). Results of the amplification of tissue specimens from non-*Leishmania* – infected negative controls and males of sand flies which are not haematophagous and therefore free from *Leishmania* infection were used as reaction controls.

Table - Species and strains used in this study.

International code ¹	Species	Origin	Clinical Form / ITS type ²
MHOM/BR/75/M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous (A)
MHOM/BR/99/IM4243	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Muco-Cutaneous (I)
MHOM/BR/92/IM4235	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Muco-Cutaneous (H)
MHOM/BR/75/IM4155	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous (F)
MHOM/BR/75/IM3823	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous (B)
MHOM/BR/75/M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous
MDID/BR/95/IM4159	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous
MHOM/BR/96/M15733	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous
MHOM/BR/00/IM2773	<i>L. (V.) naiffi</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous
MCEB/BR/84/M8408	<i>L. (V.) shawi</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous
MHOM/PA/71/LS94	<i>L. (V.) panamensis</i>	CanalZone/Panama	Cutaneous
MCOE/BR/82/IM1367	<i>L. (V.) lainsoni</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous
MHOM/BR/77/LTB0016	<i>L.(L.) amazonensis</i>	Bahia State/Brazil	Cutaneous/Disseminated
MSCI/EC/82/LSP1	<i>L. (V.) equatorensis</i>	Guayas/Ecuador	Cutaneous / Visceral
IGOM/PA/85/E582.34	<i>L. (V.) colombiensis</i>	Colon/ Colombia	Cutaneous / Visceral
MHOM/BR/74/PP75	<i>L. (L.) chagasi</i>	BahiaState/Brazil	Visceral
	(= <i>infantum</i>)		
MCOE/BR/00/M1530	<i>L. (L.) deanei</i>	Pará State/Brazil	Not found in Humans
MCHO/BR/79/M5725	<i>Endotrypanum schaudinni</i>	Pará State/Brazil	Not found in Humans

1- Designations: Host [M= Mammalia; HOM= *Homo sapiens*; CHO= *Choloepus didactylus*; CEB= *Cebus apella*; DID= *Didelphis marsupialis*; COE= *Coendou prehensilis*.; SCI= *Sciurus granatensis*; I= Insecta; GOM= *Lutzomya gomezi*]; 2-The letter after the clinical form represents the ITS restriction type according to Naiff, M.F. (1999).

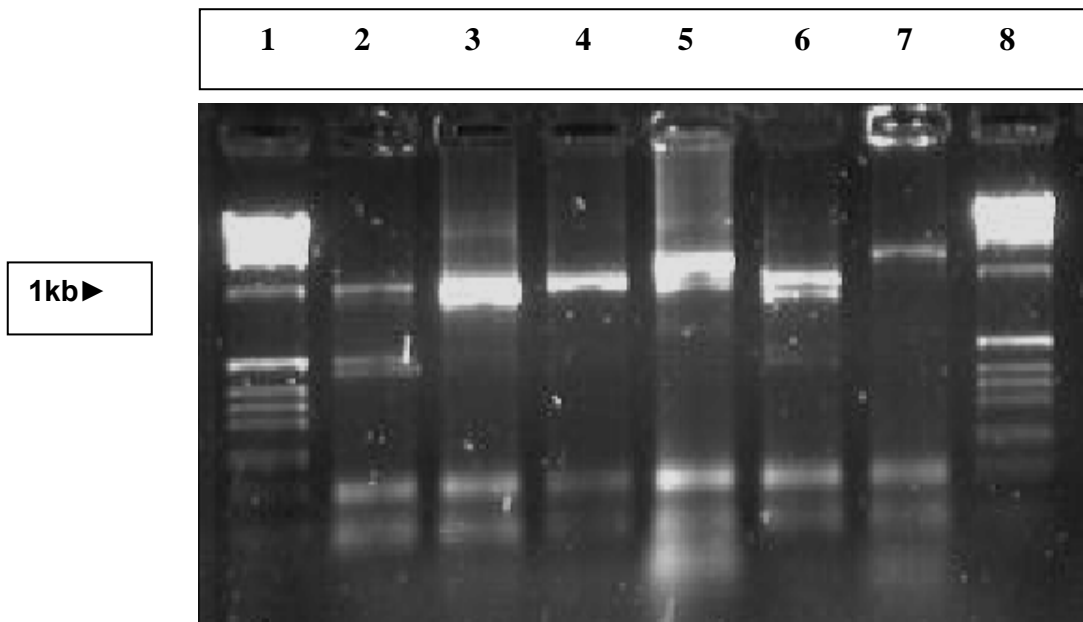


Figure 1 - ITS amplification of culture cells by PCR: lanes 1- Molecular Marker; 2- *L. (V.) lindenbergi*; 3- *L. (V.) guyanensis*; 4- *L. (V.) lainsoni*; 5- *L. (V.) panamensis*; 6- *L. (V.) naiffi*; 7- *L. (L.) amazonensis*; 8- Molecular Marker (1kb DNA Invitrogen® cat.no. 15615-016)

Sequences producing significant alignments: (bits) Value

[gi|2764483|emb|AJ000300.1|LGITSUUS4](#) *Leishmania guyanensis* D... 254 2e-64
[gi|2764482|emb|AJ000299.1|LGITS4147](#) *Leishmania guyanensis* D... 254 2e-64
[gi|2764481|emb|AJ000298.1|LPITSNEL3](#) *Leishmania panamensis* D...240 3e-60
[gi|11558411|emb|AJ300484.1|LBR300484](#) *Leishmania braziliensis* ...216 5e-53
[gi|11558410|emb|AJ300483.1|LBR300483](#) *Leishmania braziliensis* ...174 2e-40
[gi|8346979|emb|AJ276260.1|LDO276260](#) *Leishmania donovani* kin ...129 8e-27
[gi|8346978|emb|AJ276259.1|LDO276259](#) *Leishmania donovani* kin ...129 8e-27
[gi|7288085|emb|AJ276258.1|LDO276258](#) *Leishmania donovani* com...129 8e-27
[gi|2764489|emb|AJ000306.1|LCITS9702](#) *Leishmania chagasi* DNA ...129 8e-27

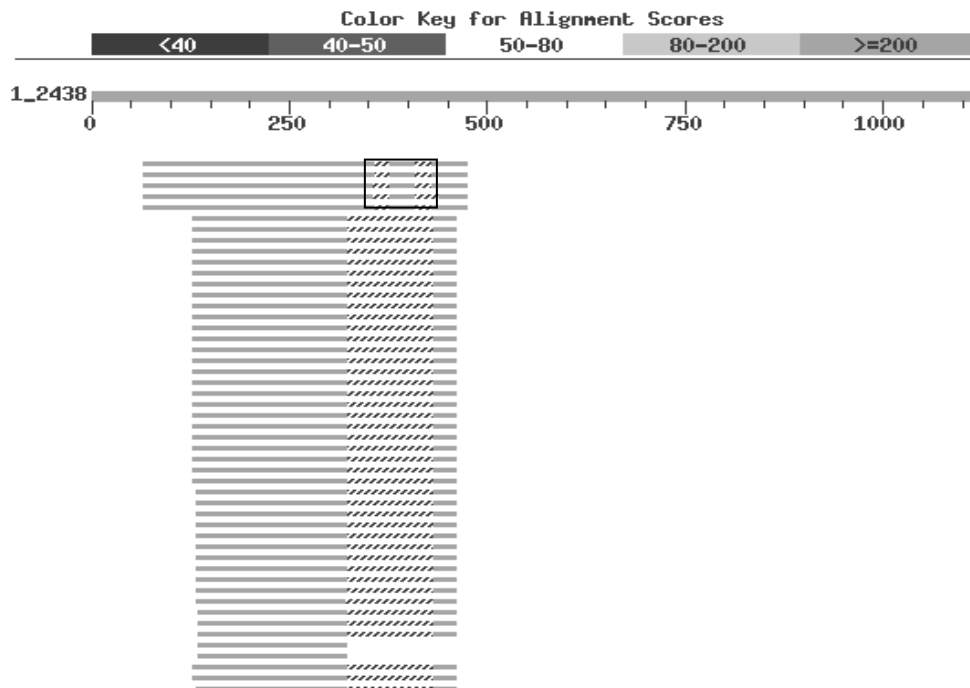


Figure 2 - Blast alignment obtained to IR1/IR2 primer amplification of *L.(V.) guyanensis* strains and ITS region sequence comparison to other *Leishmania* species. The divergent areas in the box are the ones chosen to design the specific primers to *L.(V.) guyanensis*.

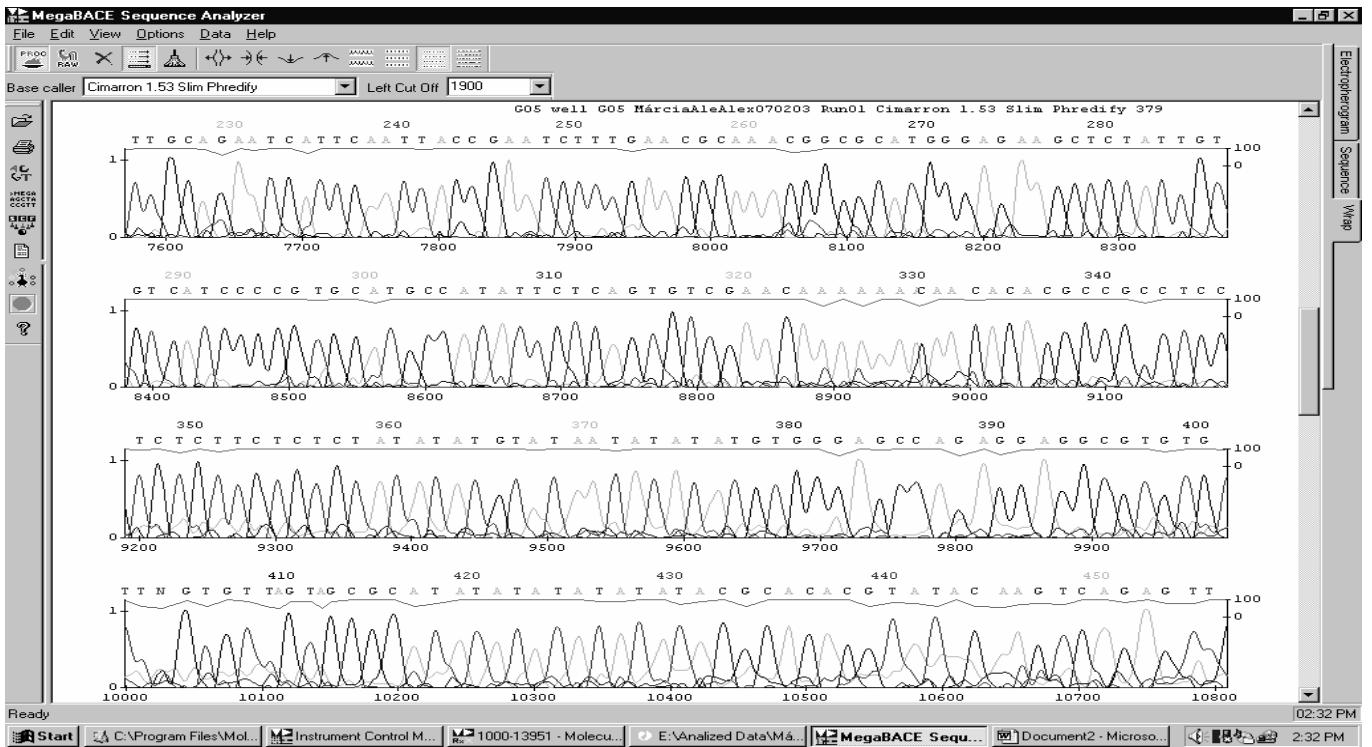


Figure 3 - MegaBACE® sequence analysis obtained for *L.(V.) guyanensis* strain IM4243.

(5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3') **IR1**

TTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACTCCGGGGAGTGCTTGTGTTTTCTA
GCAATGCCTTTCCACAGATACGCAATACAATCTATATATATATGTATATAGAC
ACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCTGACGTTAACATATCGCTGTATACAA
CAAAAAAGTTCTGTTCTACGGCTTTCTTTTTTGGCGGCGTGCGTGGATAACGGC
TCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCA
GTAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTT
GAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATTGTGTCATCCCCGTGCATGCCA
TATTCTCAGTGTCGAACAAAAACAACACACGCCGCCTCCTCTCTCTCTCTAT
ATATGTATAATATATATTGTGGGAGCCAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGC
GCATATATATATATACGCACACGTATAACAAGTCAGAGTTGGACAAAATA
CACACCTGCACTCCCTTTTCGAGATGTGCGTGTGGAAAACTCCTCTCTG
GTGATTGCAAAGCAGTCTCTCTCTCCTCTCTCCTCTCTATTCTCTCTTCTC
CTCTCACTTTAAGAGGGGGGAGAGGAGAGGTTTTATATAGAGAAGAGAGG
TGTGGGGGGAGGCTGTGACCAGGATAATAAACAAAAACCAAACGAGAATT
CAACTTCGCGTTGGCCATTTTTTGCTTAATGGTGTGGGACCTCCTTTCTCTTTCT
CTCTCTCTCCGTGTATATGCAAGTGTGTGTGGTTCTCTATATATACATAGAGAA
CCGCTCACGCAAAAAACATACTCAGAGAAGAGGGGGGAAGACGAGAGGGGGG
GGAGCCCCACCACAAACCTTTGTTTA

CAGACCTGAGTGT...

(5'-GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3') **IR 2**

ITS1-5.8S-ITS 2 = 919 nt + primers IR1 e IR2 = 981 nt (~1kb).

Figure 4 - *Leishmania (V.) guyanensis* (strain IM4243) ITS entire sequence from rDNA with conserved primers IR1/IR2 (Cuppolillo *et al.*, 1995). Primers P2 e REVGUY (underlined) were designed after BLAST analysis and can distinguish by a 229 nt fragment (in bold) *Leishmania (V.) guyanensis* from other *Viannia* subgenus species as *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (V.) panamensis* and from *Leishmania* subgenus species as *Leishmania chagasi* (L.) (=infantum) and *Leishmania (L.) amazonensis*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

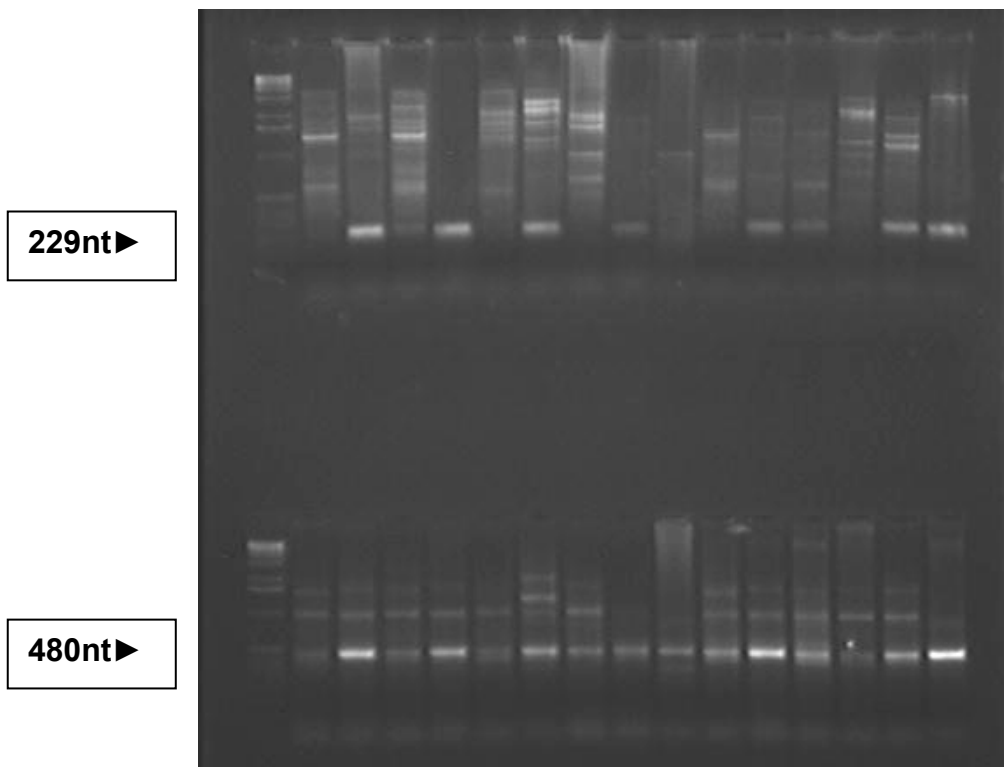
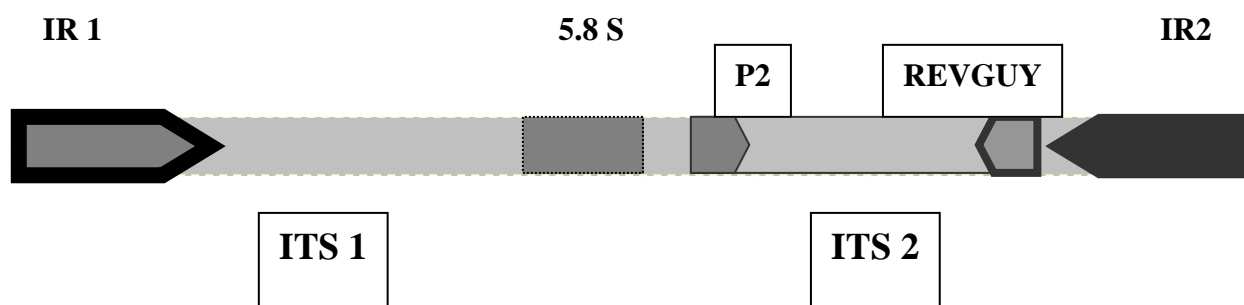
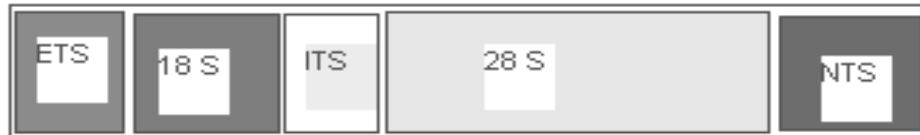


Figure 6 - Gel showing amplification of ITS rDNA from several *Leishmania* species. Row 1 : primers P2 and REVGUY yield a 229 nt fragment observed in *L. (V.) guyanensis* (lanes 3; 5; 7; 15; 16) and faintly bands to *L.(V.) lainsoni* (lane 9); *L.(V.) shawi* (lane12) and *L. (V.) lindenbergi* (lane 13) with a diferent profile. Row 2 : primers P2 and IR2 yield a 480 nt fragment present in all species, used as a positive control of DNA amplification at 58 °C annealing temperature. Lanes: 1- Invitrogen®cat.no.15615-016 Molecular Weight Marker; 2- *L. (V.) braziliensis* (M2903); 3- *L. (V.) guyanensis* (IM3597); 4- *L. (V.) braziliensis* (IM4159); 5- *L. (V.) guyanensis* (IM4243); 6- *L. (V.) panamensis* (LS94); 7- *L. (V.) guyanensis* (M4147); 8- *L. (L.) deanei* (M1530); 9- *L. (V.) lainsoni* (IM1367); 10- *L. (L.) chagasi(=infantum)* (PP75); 11- *L. (V.) naiffi* (IM2773); 12- *L. (V.) shawi* (M8408); 13- *L. (V.) lindenbergi* (M15733); 14- *L. (L.) amazonensis* (LTB0016); 15- *L. (V.) guyanensis* (IM3823); 16- *L. (V.) guyanensis* (IM4155).

rDNA repeating unit from eucariotes

ETS- external spacer; 18 S- small sub-unit; ITS- internal transcribed spacer, with 5.8 S sub-unit;
28 S- large sub-unit; NTS- intergenic spacer.



GCATATATATATATATACGCACACG

Primer **P2**

position 483 nt

GAGGTGTGGGGGGAGGCCTGTACCAGGATAA
(CTCCACACCCCCCTCCGACACTGGTCCTATT)

Primer **REVGUY** position 680 nt

Figure 7 - rDNA region amplified by P2 e REVGUY primers based on *L.(V.) guyanensis* divergent regions from *L.(V.) braziliensis* and *L.(V.) panamensis*.

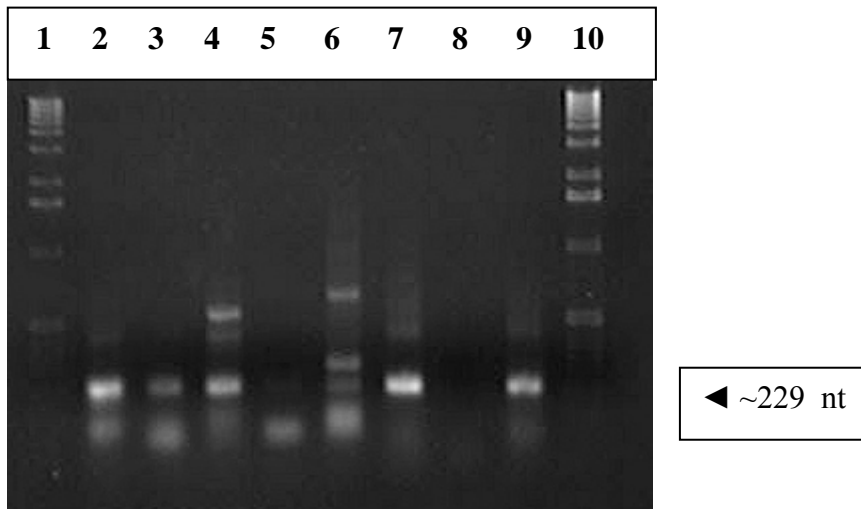


Figure 8- PCR reaction fragments with P2/REVGUY primers using sand fly DNA and skin biopsy extracted DNA from a hamster infected with *L. guyanensis* (strain M4147). 1- Molecular Marker; 2- *Lutzomyia umbratilis* (976); 3- *Lutzomyia umbratilis* (977); 4- *Lutzomyia umbratilis* (978); 5- *Lutzomyia umbratilis* (980); 6- *Lutzomyia umbratilis* (981); 7- *L. guyanensis* DNA (strain M4147 positive control); 8- male (uninfected) *Lutzomyia umbratilis* DNA; 9- hamster (*Mesocricetus auratus*) skin biopsy; 10- Molecular Marker (1kb DNA Invitrogen® cat.no. 15615-016).

4- Discussion

Previous works based on molecular diagnostic have succeeded to discriminate the two subgenus of *Leishmania* based on the ITS fragment size and could point out a high degree of divergence in species and subspecies in *Leishmania* when this DNA target was used and subject to PCR-RFLP analysis (Cupolillo *et al.*, 2003). However, by this technique was not possible to find an unique profile characteristic of a species.

Other targets have been used like the mini-exon gene that can provide a specific detection for *L. braziliensis* (Marfurt *et al.*, 2003), also provided by other tests like the use of repeats in telomere sequence (Fu *et al.*, 1998) and the G6PDH gene PCR amplification (Castilho *et al.*, 2003). The use of the mitochondrial DNA found in the minirepeats of the kinetoplast DNA have been proposed for the use for direct PCR (de Bruijn & Barker, 1992) or by PCR-RFLP (Volpini *et al.*, 2004). The first method seems to fail to some *L. braziliensis* strains (Lanús *et al.*, 2005) and the second is a more tedious two step technique depending on restriction profiles to be compared and a partial digestion can give confusing results. The kDNA target for a direct PCR amplification was used for *L. donovani* apparently with good results (Salotra *et al.*, 2001).

The microsatellite sequences have been used (Russel *et al.*, 1999) for a variety of *Leishmania* species including *L. guyanensis* and at the present do not provide a specific characterization, but they seem to be suitable for showing the variation inside the genus for populational studies (Barker, 2002). Arbitrary primers were appointed to be capable of specific PCR-based detection of *L. guyanensis*, *L. panamensis* and *L. braziliensis* but a more recent study by these authors recognized that the primers used were effective only to a strain of *L. guyanensis* (Mimori *et al.*, 1998).

The experimental protocol that we propose in this work could distinguish the two main species of *L. guyanensis* and *L. braziliensis* which are important in the Amazon Region concerning the human leishmaniasis number of cases (Romero *et al.*, 2001). Since it did not amplified a band or gave only a smear in the gel when *L. panamensis* DNA was used, it could also distinguish this species.

The *L. panamensis* is considered a close species to *L. guyanensis* (Fig. 2) in some previous published papers using isoenzyme analyses (Cuppillo *et al.*, 2001) and the differentiation of both species was not succeeded by any methods used before (Marfurt *et al.* 2003).

The primers P2 and REVGUY could not distinguish *L. guyanensis* from some other species as *L. naiffi*, *L. lindenbergi*, *L. lainsoni* and *L. shawi* , also found in Amazon region. The same happens to other techniques described for analyses of the *Viannia* subgenus. Due to sequence similarities it is a risk to be very restrictive in primer design and exclude other *L. guyanensis* isolates. Nonetheless, it can discriminate *L. guyanensis* from the species belonging to the *Leishmania* subgenus tested so far, as *L. deanei*, *L. chagasi*(=*infantum*) and *L. amazonensis* besides the some other belonging to the *Viannia* subgenus as *L. panamensis*, *L. colombiensis* and the genus *E. schaudinni* (Fig.6).

Our goal to establish a direct PCR method of amplification requiring no posterior manipulation, contrary to the use of enzyme digestion, was fully accomplished for the *L. guyanensis* and *L. braziliensis* species. The intra-specific variation can be better detected by other methods as the use of monoclonal antibodies (Romero *et al.*, 2002) or PCR-RFLP (Cupolillo *et al.*, 2003), that are however more complicate to perform.

The *L. braziliensis* strain (IM4159) shown a smear or an undefined group of bands and this could be due to the fact that the primer P2 was based in a **TA** repeat sequence (Fig. 5) that maybe present in other regions, when compared to *L. guyanensis*. The

occurrence of the repeats were appointed by Rodriguez *et al.* (1997) and are the base of techniques as RAPD or SSP-PCR (Volpini *et al.*, 2001) that reach minirepeats regions in the kDNA minicircle. However, could only be used as an amplification profile when a set of isolates are compared, similarly to the isoenzyme and DNA restriction analysis and there is a question if minicircles rapidly evolve, since there is evidence of selective pressure in maintaining sequence class conservation over the entire minicircle molecule, even in different species. Species differentiation and phylogenetic studies therefore depends on the suitable minicircle class (Brewster & Barker, 2002).

The RAPD or SSP-PCR tests exclude the possibility of use of clinical specimens or obtained from vectors and reservoirs since the excess of DNA from the host would compete with the parasite DNA resulting loss of signal or inespecific bands due by diluting the specific target DNA in a larger amount of carryover DNA that can as well compete for primers at inespecific ligation sites and for Taq-DNA polymerase by misprimer coupling. PCR fingerprints by PCR-RFLP were species-specific in general but also displayed a considerable extent of intra-species variability (Schönian *et al.* 1996; Schönian *et al.* 2000) that can be adequate to visualize intra-specific variability but inadequate for species characterization.

The ITS analysis have been used in several organisms as fungi, bacteria and protozoa (Sogin *et al.*, 1986) and recommended for phylogenetic studies as an standard for species identification (Schultz *et al.*, 2005). It has been used for other trypanosomatids species identification (Beltrame-Botelho *et al.*, 2005; Njiru *et al.*, 2005) and there is a reference for a higher sensibility of ITS-rDNA PCR detection as compared to the kDNA minicircle PCR amplification in cultured *L. (L.) major* (Parvisi *et al.*, 2005)

We plan to further study other species in the *Viannia* subgenus occurring in the Amazon Region for genetic divergence based on ITS sequences of the ribosomal RNA

gene (rDNA) (Fig. 7) and in doing so check for other specific primers to species belonging to this subgenus that could help in characterize the occurrence of *Leishmania* species in epidemiological cycles in vector and silvatic hosts.

5- References

- Alvar, J.; Canavate, C.; Gutierrez-Solar, B.; Jimenez, M.; Laguna, F.; Lopez-Velez, R.; Molina, R. & Moreno, J. 1997 . *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 298-319.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lippman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.
- Amersham Biosciences, 2002 – DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis System - Instructions for Product Code US81090; US81095.
- Castilho, T.M.; Shaw, J.J. & Floeter-Winter, L.M. 2003. New PCR assay using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2, 540-546.
- Barker, G.C. 2002. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 93 (Suppl.1):S1/21-S1/24.
- Berman, J. D. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24, 684–703.
- Beltrame-Botelho, I.T.; Gaspar-Silva, D.; Steindel, M.; Davila, A.M. & Grisard, E.C. 2005. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infect. Genet. Evol.* 5(1): 17-28.
- Brasil - Fundação Nacional de Saúde, 2005 [http://: www.fns.gov.br](http://www.fns.gov.br).

- Brewster, S. & Barker, D.C. 2002. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 93 (Suppl.1):S1/55-S1/63.
- Cuppolillo, E.; Grimaldi, J.G.; Momen, H. & Beverley, S.M. 1995. Intergenic Region Typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 145-155.
- Cupolillo E., Alves A. F., Brahim L.R., Naiff M.F., Pereira L.O.R., Oliveira-Neto M.P., Falqueto A & Grimaldi Jr. G. 2001. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Med. Microbiol. Immunol.* 190: 57-60.
- Cupolillo E., Brahim L.R., Toaldo, C.B., Oliveira-Neto M.P., Brito, M.E.F., Falqueto A, Naiff M. F. & Grimaldi Jr. G. 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41(7): 3126-3132.
- Davis, L.G.; Dibner, M. K. & Battey, J.F. 1986. Basic Methods in Molecular Biology. Ed. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut, USA. 388p.
- De Bruijn, M. H. & Barker, D. C. 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 52: 45-58.
- Degrave W., Fernandes O., Campbell D., Bozza M., Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89:463 –469.
- Fernandes O., Murthy V.K., Kurath U., Degrave W., Campbell D. 1994. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:261 – 271.
- Fu, G.; Perona-Wright, G. & Barker, D.C. 1998. *Leishmania braziliensis*: characterization of complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.* 90: 236-243.

- Gomes R.F., Macedo A.M., Pena S.D., Melo M.N. 1995. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp. Parasitol.* 80:681–687.
- Grimaldi, Jr., G., Tesh, R.B. & MacMahon-Pratt, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am.J. Trop.Med. Hyg.*, 41: 687-725.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Lainson R., Shaw J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In *The leishmaniasis in biology and medicine*. Eds, W. Peters, R. Killick-Kendrick. London : Academic Press, pp 1–20.
- Lanús, E.C.; Piñero, J.E.; Gonzáles, A.C.; Valladares, B.; Grosso, M.L. & Salomón, O.D. 2005. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100(2): 187-192.
- Marfurt, J.; Niederwieser, I.; Makia, N.D.; Beck, H.P. & Felger, I. 2003. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 46, 115-124.
- Marsden P.D. 1986. Mucosal leishmaniasis ("Espundia", Escomel, 1911). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80:859–876.
- Mimori, T.; Sasaki, J.; Nakata, M.; Gomez, E.A.; Vezato, H.; Nonaka, S.; Hashiguchi, Y.; Furuya, M. & Saya, H. 1998. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene* 210: 179-186.

- Mullis, K.B. & Falloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Naiff, M.F., Cupolillo, E., Naiff, R.D., Momen, H., Barrett, T. & Grimaldi Jr. G. 1999. Leishmaniose tegumentar na Amazônia: Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 243.
- Njiru, Z. K.; Constantine, C.C.; Guya, S.; Crowter, J.; Kiragu, J.M.; Thompson, R.C. & Davila, A.M. 2005. The use of ITS1 rDNA in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol. Res.* 95(3): 186-92.
- Parvisi, P.; Maurício, I.; Aransay, A.M.; Miles, M.A. & Ready, P.D. 2005 . First Detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 93: 75-83.
- Pinheiro, F.G.; Pereira, E.S.; Zanotti, M.G.S.; Muñoz, J.M.R.; Luz, S.L.B. & Franco, A.M.R. 2005. Detecção de *Leishmania* sp. pela reação de nested PCR em *Lutzomyia (Nissomyia) umbratilis* naturalmente infectadas em áreas de treinamento militar no Estado do Amazonas, Brasil. *Anais do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia*, Porto Alegre, Brasil, 1 a 4 novembro, 2005.
- Rodriguez, N., Lima, H., Rodriguez, A., Brewster, S., Barker, D.C. 1997. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. *Parasitol.* 115: 349-358.
- Romero, G.A.; Guerra, M.V.F.; Paes, M.G. & Macedo, V.O. 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 456-465.

- Romero, G.A.; Ishikawa, E.; Cupolillo, E.; Toaldo, C.B.; Guerra, M.V.F.; Paes, M.G. Macedo, V.O. & Shaw, J.J. 2002. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. *Acta Tropica* 82: 25-29.
- Russel, R.; Iribar, M.P.; Lambson, B.; Brewster, S.; Blackwell, J.M.; Dye, C. & Ajoka, J.W. 1999. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103:71-77.
- Salotra, P., Sreenivasm, G., Pogue, G. P., Lee, N., Nakhasi, H. L., Ramesh,V., & Negi, N. S. 2001. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with Kala-azar and Post-Kala-azar dermal leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* : 39, 849–854.
- Sanger, F., Nicken, S.& Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS (USA)*. 74: 5463-5467.
- Schönian G., Schweynoch C., Zlateva K., Oskam L., Kroon N., Gräser Y. & Presber W. 1996. Identification and determination of the relationship of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, pp. 19–29.
- Schönian, G.; Akuffob, H.; Lewina, S.; Maashob, K.; Nylenb, S.; Pratlange F.; Eisenbergerd, C.L.; Schnurd, L. F. & Presber, W. 2000. Genetic variability within *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106: 239-248.
- Schultz, J.; Maisel, S.; Gerlarch, D. Muller, T & Wolf, M. 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. 2005. *RNA* 11(4): 361-4.

- Shaw J.J. 1997. RAPD for the differentiation of *Leishmania*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:93–94.
- Sogin, M.L., Elwood, H.J. & Gunderson, J.H. 1986 Evolutionary diversity of eukariotic small-subunit rRNA genes. *Proc. Acad. Sci. USA*, 83: 1383-1387.
- Uliana S.R.B., Nelson K., Beverley S.S., Camargo E.P., Floeter-Winter L.M. 1994. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41:324 – 330.
- Van Eys G.J.J.M., Schoone G.J., Kroon N.C.M., Ebeling S.B. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Biochem. Parasitol.* 51:133 – 142.
- Volpini, A.C., Passos, V.M.A. & Romanha, A.J. 2001. Attempt to differentiate *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L.(L.) chagasi*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L.(V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. *Parasitol. Res.* 87: 1056-1059.
- Volpini A.C., Passos V.M.A., Oliveira G.C., Romanha A.J. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 90:31 – 37.
- Weigle, K.A.; Davalos, M.; Heredia, P.; Molineros, R.; Saravia, N.G. & D'Alessandro A. 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 489-496.
- WHO.1990. Expert committee: control of the leishmaniasis. *WHO Techn. Ser.*793.Geneva: World Health Organization.
- WHO. 2005. Division of control of tropical diseases. Leishmaniasis control home page WWW.who.int/health-topics/leishmaniasis.htm (updated 2005).

4 - Capítulo II

Genetic divergence studies based on rDNA ITS sequences from the *Viannia* subgenus of the *Leishmania* parasite.

Sibajev, A.¹; Luz, S.L.B.²; Mota, K.C.³; Figueira, L. P.³; Palma, M.L.M.¹; Naiff, M.F.³; Damasceno, T.A.⁵; Astolfi-Filho, S.⁴ & Franco, A.M.R.³.

Doutorado Multi-Institucional em Biotecnologia-UFAM e CCBS-UFRR; Laboratório de Biodiversidade do CPqLM&D-FIOCRUZ/AM; Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas-CPCS-INPA; Laboratório de Tecnologia do DNA-UFAM & Escola Superior de Ciências da Saúde-UEA.

Abstract

The ITS rDNA was sequenced in *L. lainsoni*; *L. naiffi* and four *L. guyanensis* strains, two of them presenting a muco-cutaneous form of Leishmaniasis. These sequences were compared to others available at the Genbank Database, resulting the confirmation of the previous data from multilocus enzyme electrophoresis and ITS restriction fragment length polymorphisms analysis, positioning *L. lainsoni* and *L. naiffi* as more divergent species as compared to *L. braziliensis*, *L. panamensis* and *L. guyanensis* species inside de *Viannia* subgenus. A correlation was observed in grouping nearer the two *L. guyanensis* strains, respectively IM4243 and IM4235, responsible for the muco-cutaneous form. However, this could be coincidental and more related to the origin of this two isolates from the same region and its epidemiological cycles. Nonetheless, the ITS rDNA sequencing may provide a mean to develop molecular markers for the strains and species studied.

Introduction

Epidemiological studies of leishmaniasis in the New World have revealed that the genus *Leishmania* Ross, 1903 (Protozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in that geographical region includes a number of different parasite species infecting a wide variety of mammalian host and phlebotomine sand flies of the genera *Lutzomyia* and *Psychodopygus* which serve as vectors (Grimaldi *et al.*, 1989).

The historical background of all *Leishmania* species, including their classification and nomenclature, has been reviewed by some authors (Lainson & Shaw, 1987; Grimaldi *et al.*, 1989). The difficulties in identifying this genus are obvious in view of the wide range of possible host responses to any given parasite. Consequently, there is a need for *Leishmania* markers using intrinsic characteristics of the parasites themselves, which may not be modified by host or environmental factors.

Genetic variation in medically important protozoan parasites and the nature of the reproductive strategies which predispose to such variation are currently the subject of much interest and controversy (Dye *et al.* 1990, Tibayrenc *et al.* 1990, 1991, Tibayrenc & Ayala 1991, Hurst *et al.* 1992, Sibley & Boothroyd 1992). This genetic heterogeneity produces different phenotypes which can be associated with a diversity of clinically important manifestations. Parasites of the genus *Leishmania* are capable of a variety of clinical manifestations ranging from the benign cutaneous infection and the more severe cutaneous disseminated form to the very serious mucosal and visceral forms. Several vertebrate hosts and vectors are related to the sylvatic and peridomestic cycles and the parasite shows the ability to adapt to environmental changes as well to specialize in a vector species occurring in a specific area. This capacity seems to lead to genetic variations that ultimately generate new *Leishmania* species mainly where the biological diversity of hosts is observed like the Amazon region (Lainson & Shaw, 1987).

All species of *Leishmania* are morphologically similar, with exception for minor differences in size. The initial criteria for identification and classification of these parasites were based on extrinsic characteristic (such as clinical manifestations, geographic and epidemiological features, and a variety of other biologic criteria). However, the variation produced by these criteria lead to the development of biochemical, immunological and molecular methods to provide more precise taxonomic markers based on intrinsic characteristics of the parasites themselves. Among the techniques currently in use are

isoenzyme electrophoresis [Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)], species-specific monoclonal antibodies or DNA probe and analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) using different DNA sequences as targets (Macedo *et al.* 1992, Guizani *et al.* 1994, Mendonza-Leon *et al.* 1995). DNA analysis provides a means of examining expressed and non-expressed sequences of an organism and is not subject to environmental influences. RFLP analysis detects genetic differences by comparing size variation in DNA banding patterns after restriction endonuclease analysis. The technique has been applied to *Leishmania* focusing basically on the restriction patterns of the minicircle kDNA molecule (Lopes *et al.* 1984, Pacheco *et al.* 1986).

The transcribed noncoding region of rRNA genes (ITS) show extensive variability. Unlike the non-transcribed spacers, the ITS are relatively small, with approximately 1 kb in *Leishmania*, and flanked by highly conserved segments to which PCR primers can be designed. While the sub-units of the ribosomal gene cluster like the LSU; SSU and 5.8S regions are more suitable for the study of phylogenetic relation in distant organisms (Hori & Osawa, 1987; Kjems & Garret, 1990). The ITS have been used in protozoa for species analysis (Beltrame-Botelho *et al.*, 2005; Njiru *et al.*, 2005). In particular, this approach, can potentially be applied in many evolutionary situations and amongst a broad range of target *loci* (Cupolillo *et al.* 1995).

We studied the genomic intra-specific variations in the rapidly-evolving internal transcribed sequence (ITS) in the ribosomal operon by sequencing the PCR amplification product to check for intra-specific and specific differences that could group by genetic similarities the species inside the *Viannia* subgenus that comprises the species responsible for the tegumentary form of leishmaniasis observed at the Americas.

We expect that the evolutionary divergence or similarities amongst *Leishmania* species may help to understand the clinical aspect of disease and the epidemiological cycles resulting from the selective pressures these parasites are submitted during its physiological adaptation to the vector body structures and to the vertebrate immunology and tissue metabolism.

Materials and Methods

1- Parasites:

Strains isolated from wild reservoirs or the skin of patients were examined. *Leishmania* promastigotes were maintained in NNN medium and cultured in RPMI 1640 supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) at 26°C. Cultures were harvested at a density of 2×10^6 parasites/mL, washed in buffered saline and centrifuged. The parasite species and its international code are listed in Table. They represent a variety of strains characterized as types A; B; F; H and I by *Sph I* and *Hae III* ITS restriction profiles, according to Naiff (1998).

2- DNA extraction:

The pellets were frozen at -70°C. DNA extraction was performed by phenol/chloroform and ethanol precipitation method (Davis *et al.* 1996).

3- PCR amplification of rDNA ITS sequence (rRNA gene cistron):

The internal transcribed spacer in the ribosomal operon was amplified with primers IR1 (5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3') and IR2 (5'GCGGTTA GTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3'), used by Cupolillo *et al.*, 1995. A total of 50 ng template DNA was added to the reaction mixture containing 10 pmol of each primer; Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0/50 mM KCl); 1.5 mM MgCl₂; 100 mM of each dNTP; 1 U Taq polymerase. The PCR was performed in 25 µl volumes using a Eppendorf Gradient thermocycler as follows: initial denaturation of 94°C for 5 min and 40 cycles of 94°C for 1 min., 58°C for 1min., 72°C for 2 min followed by an final extension of 72°C for 5 min. Amplification fragments were separated in a 1.5% agarose gel with 1×TAE buffer and visualised by staining with ethidium bromide.

4- Sequencing the *Leishmania* isolates:

The PCR obtained fragments were subject to sequencing reaction using the dideoxytermination method (Sanger *et al.*, 1977) and reagents specific for MegaBACE automated sequencer (Amersham Biosciences, 2002). The sequences which provided a highest quality at scorecard analysis were then chosen for comparison with previous described ITS sequences for *L. braziliensis* moro and M2905, *L. panamensis* LS94, *L.*

guyanensis M4147 and TRUU4 references strains for *Viannia* subgenus and *L. amazonensis* LTB0016 for *Leishmania* subgenus available at the Genbank database deposited by Shönian *et al.* (1996) and *L. guyanensis* LBC40 and LBC41 deposited by Couppiè *et al.* (2004). We used the program BIOEDIT (Hall, 1999) to align these previous known ITS sequences and compare with our originally obtained sequences for *L. guyanensis* strains 4243; 4235; 4255, 3823; *L. naiffi* and *L. lainsoni*.

Genetic distance was calculated by alignment of ITS whole 1kb sequence using BIOEDIT software (Hall, 1999). Evolutionary trees were constructed using the Maximum Likelihood method and the DNAMLK version 3.5c software in PHYLIP package (Felsenstein, 1981; 1993) and ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) alignment to Neighbor Joining and Maximum Parsimony Analysis in the MEGA software (Kumar *et al.*, 1993).

Results

The sequence of ITS region of the ribosomal gene is described in figures 1 to 6 for the *Leishmania* species and the maximum likelihood phylogenetic tree obtained for them is shown in figure 7.

The maximum likelihood tree build to *Viannia* subgenus showed *L. (V.) lainsoni* in a distinctly separate branch while *L. (V.) naiffi* was in a distant position of the same branch as *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) panamensis* and *L. (V.) guyanensis* this two species were close related and some *L. (V.) guyanensis* strains were more related to *L. (V.) panamensis* than others . This is the case of *L. (V.) guyanensis* strain LBC 40 and TRUS4. A correlation to the clinical symptoms was observed to the species in the *Viannia* subgenus for the strains IM4243 (type I) and IM4235 (type H) presenting the muco-cutaneous form of disease were grouped closer than the strains IM4155 (type F); IM3823 (type B) and M4147 (type A) presenting the cutaneous form of leishmaniasis. The main cluster in both dendrograms contained all strains of *L. (V.) guyanensis* besides *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) naiffi*.

Table - Species and strains used in this study.

International code ¹	Species	Origin	Clinical Form / ITS type ²
MHOM/BR/75/M4147	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous (A)
MHOM/BR/99/IM4243	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Muco-Cutaneous (I)
MHOM/BR/92/IM4235	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Muco-Cutaneous (H)
MHOM/BR/75/IM4155	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous (F)
MHOM/BR/75/IM3823	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous (B)
MHOM/BR/75/M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous
MDID/BR/95/IM4159	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous
MHOM/BR/96/M15733	<i>L. (V.) lindenbergi</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous
MHOM/BR/00/IM2773	<i>L. (V.) naiffi</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous
MCEB/BR/84/M8408	<i>L. (V.) shawi</i>	Pará State/Brazil	Cutaneous
MHOM/PA/71/LS94	<i>L. (V.) panamensis</i>	CanalZone/Panama	Cutaneous
MCOE/BR/82/IM1367	<i>L. (V.) lainsoni</i>	Amazonas/Brazil	Cutaneous
MHOM/BR/77/LTB0016	<i>L.(L.) amazonensis</i>	Bahia State/Brazil	Cutaneous/Disseminated
MSCI/EC/82/LSP1	<i>L. (V.) equatorensis</i>	Guayas/Ecuador	Cutaneous / Visceral
IGOM/PA/85/E582.34	<i>L. (V.) colombiensis</i>	Colon/ Colombia	Cutaneous / Visceral
MHOM/BR/74/PP75	<i>L. (L.) chagasi</i> (= <i>infantum</i>)	BahiaState/Brazil	Visceral
MCOE/BR/00/M1530	<i>L. (L.) deanei</i>	Pará State/Brazil	Not found in Humans
MCHO/BR/79/M5725	<i>Endotrypanum schaudinni</i>	Pará State/Brazil	Not found in Humans

1- Designations: Host [M= Mammalia; HOM= *Homo sapiens*; CHO= *Choloepus didactylus*; CEB= *Cebus apella*; DID= *Didelphis marsupialis*; COE= *Coendou prehensilis*.; SCI= *Sciurus granatensis*; I= Insecta; GOM= *Lutzomya gomezi*]; 2-The letter after the clinical form represents the ITS restriction type according to Naiff, M.F. (1998).

GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT **IR1**

TTCCGATGATTACACCAAAAAACATAACAACCTCCGGGGAGTGCTTGTGTTTTCTA
GCAATGCCTTTCCACAGATACGCAATACAATCTATATATATATGTATATAGAC
ACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGTAAACATATCGCTGTATAACA
AAAAAAGTTCTGTTCTACGGCTTTCTTTTTTGGCGGCGTGCGTGGATAACGGCT
CACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCTATTTTCGTTGAAGAACGCA
GTAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTT
GAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATTGTGTCATCCCCGTGCATGCCA
TATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACACGCCGCCTCCTCTCTCTCTAT
ATATGTATAATATATATTGTGGGAGCCAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGC
GCATATATATATATACGCACACGTATAACAAGTCAGAGTTGGACAAAATACA
CACCTGCACTCCCTTTTCGAGATGTGCGTGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGATT
GCAAAGCAGTCTCTCTCCTCTCTCCTCTCTATTCTCTCTTCTCCTCTCACTTTA
AGAGGGGGGAGAGGAGAGGTTTTATATAGAGAAGAGAGGTTGTGGGGGGAGGC
TGTGACCAGGATAATTAACAACAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGC
CATTTTTTGCTTAATGGTGTGGGACCTCCTTTCTCTTTCTCTCTCTCCGTGTAT
ATGCAAGTGTGTGGTTCTCTATATATACATAGAGAACCGCTCACGCAAAAA
ACATACTCAGAGAAGAGGGGGAAGACGAGAGGGGGGGGAGCCCCACCACAA
ACCTTTGTTTA
CAGACCTGAGTGT...
(GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG) **IR 2**

Primer P2

REVGUY

GCATATATATATATATACGCACACG Primer **P2** position 483 nt

GAGGTGTGGGGGGAGGCCTGTACCAGGATAA Primer **REVGUY** position 680 nt
(CTCCACACCCCCCTCCGACACTGGTCCTATT)

ITS1-5.8S-ITS 2 = 919 nt + primers IR1 e IR2 = 981 nt (~1kb).

Figure 1 - ITS rDNA sequence from *L. guyanensis* strain IM4243.

GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT **IR1**

TTCCGATGATTACACCAAAAAACATAACAACCTCCGGGGAGTGCTTGTGTTTTCTA
GCAATGCCTTTCCACAGATACGCAATACAATCTATATATATATGTATATAGAC
ACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCTGACGTTAACATATCGCTGTATACAA
CAAAAAAGTTCTGTTCTACGGCTTTCTTTTTTGGCGGCGTGCCTGGATAACGGC
TCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCA
GTAAAGTGCGATAAGTGGTATCAATTTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTT
GAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATTGTGTCATCCCCGTGCATGCCA
TATTCTCAGTGTGCAACAAAAACAACACACGCCGCCTCCTCTCTTCTCTCTAT
ATATGTATAATATATATTGTGGGAGCCAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGC
GCATATATATATATATACGCACACGTATAACAAGTCAGAGTTGGACAAAATACA
CACCTGCACTCCCTCTTTTCGAGATTTTCGTGTGAAAACCTCTCTGGTTATTGCAA
GCAGTCCTCTCTCCTCTCTCCTCTCTATTCTCTCTTCTCCTCTCACTTTAGGAGG
GGGAGAAGAGAGGTTTATATAGAGAAGAGAGGGTGTGGGGGGAGGCTGTGAC
CAGGATAATTAAACAAAACAAAAGAAATTCCTTCGCGTTGGCCATTTTTGCTT
AATGGTGTGGGACCTCCTTTCTCTTTCTCTCTCTCTCCGTGTATATTCCAGGTGT
GTGTGGTATCTCTATATATACATAGAGAACCGCTCACGCAAAAAACATACTCA
GAGAAGAGGGGGAAGACGAGAGGGGGGGGAGCCCCACCAAACCTTTGTTTA
CAGACCTGAGTGT...
(GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG) **IR 2**

Primer P2

REVGUY

GCATATATATATATATACGCACACG Primer **P2** position 483 nt

GAGGTGTGGGGGGAGGCCTGTACCAGGATAA Primer **REVGUY** position 675 nt
(CTCCACACCCCCCTCCGACACTGGTCCTATT)

ITS1-5.8S-ITS 2 = 910 nt + primers IR1 e IR2 = 972 nt (~1kb).

Figure 2 - ITS rDNA sequence from *L. guyanensis* strain IM3823.

GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT

TTCCGATGATTACACCAAAAAACATAACAACCTCCGGGGAGTGCTTGTGTTTTCTA
GCAATGCCTTTCCACAGATACGCAATACAATCTATATATATATGTATATAGAC
ACAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCTGACGTTAACATATCGCTGTATACAA
CAAAAAAGTTCTGTTCTACGGCTTTCTTTTTTGGCGGCGTGCCTGGATAACGGC
TCACATAACGTGTCGAGATGGATGACTTGGCTTCCTATTTTCGTTGAAGAACGCA
GTAAAGTGCAGATAAGTGGTATCAATTTGCAGAATCATTCAATTACCGAATCTTT
GAACGCAAACGGCGCATGGGAGAAGCTCTATTGTGTCATCCCCGTGCATGCCA
TATTCTCAGTGTGGAACAAAAACAACACACGCCGCCTCCTCTCTTCTCTCGAT
ATATGTATAATATATATTGTGGGAGCCAGAGGAGGCGTGTGTTTGTGTTGTGC
GCATATATATATATATACGCACACGTATAACAAGTCAGAGTTGGACAAAAATAC
ACACCTGCACTCTCTTTTCGAGATGTGGGTGTGGAAAACTCCTCCTCTGGTGA
TTGCAAAGCAGTCTTCTCTCCTCTCTCCTCTCTAGTTCTCTCTTCTCCTCTCAC
TTAAGAGGGGGGAGAAGAGAGGTTTTATATAGAGAAGAGAGAGGTGTGGGGGG
AGGCCTGTGACCAGGATAATTAAACAAAAACCAAACGAGAATTCAACTTCGCG
TTGGCCATTTTTTGGCTTAATGGTGTGGGACCTCCTTTCTCTTTCTCTCTCTCC
GTGTATATGCAAGTGTGTGTGGTTCTCTATATATACATAGAGAACCGCTCACGC
AAAAACATACTCAGAGAAGAGGGGGGAAGACGAGAGGGGGGGGAGCCCCAC
CACAAACCTTTGTTTA
CAGACCTGAGTGT...
(GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG) **IR 2**

Primer P2

REVGUY

GCATATATATATATATACGCACACG Primer **P2** position 482 nt

GAGGTGTGGGGGGAGGCCTGTACCAGGATAA Primer **REVGUY** position 675 nt
(CTCCACACCCCCCTCCGACACTGGTCCTATT)

ITS1-5.8S-ITS 2 = 925 nt + primers IR1 e IR2 = 987 nt (~1kb).

Figure 3 - ITS rDNA sequence from *L. guyanensis* strain IM4155.

GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT **IR1**

CTGGATCATTTTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACCTCCGGGGAGTGCT
TGTGTTTTCTAGCAATGCCTCCCCCGATACTCAGTACATCGATATATATATG
TATATCGACCCATCTACCGTAGAAAAAGGCCGATCGACGTTAACATATCGCGT
ATACCACAAAAAAGTTCGTTCTACGGGCTTTTTTTTATGGCGGCGTGCGTGGAT
AACGGCTCCATAACGTGTCGCGATGGATAGACTTGGTCTTCCTATTTTCGTTTAA
AAACCCCTTTAAAANTTGCGATAAAGTGGTATCCATTGCCAGAATCATTCAATT
TACCGAATCTTTTGAACGCAAACGGCCATGGGAAAAAGCTCTATTTGTTGTCAT
CCCCGTTTCCATTTCCATATTTCTCAGTTGTGCAACAAAAAACAACAACACG
CCGCTTCCCTTCTTCTTTCTCTCTTATATATTGTTAATAACTATATATTTTTGT
GGGAACCCAGAAGGGAGGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCGCATATATATATATAT
ACGCACACGTATAACAAGTCAGAGTTGGACAAAAATACACACCTGCACTCTCTT
TTCGAGATGTGCGTGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGATTGCAAAGCAGTCTCTC
TCTCCTCTCTCCTCTCTATTCTCTCTTCTCCTCTCACTTTAAGAGGGGGGAAAAA
AGGTTATATAGAGAAGAGAGGTGTGGGGGGAGGCCTGTACCAGGATAATTA
ACAAAAACCAAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTTGCTTAATGGTG
TGGGACCTCCTTTCTCTTTCTCTCTCTCCGTGTATATGCAAGTGTGTGTGGTT
CTCTATATATACATAGAGAACCGCTCACGCAAAAAACATACTCAGAGAAGAGG
GGGAAGACGAGAGGGGGGGGAGCCCCACCACAAACCTTTGTTTACAGACCTG
AGTGT

CAGACCTGAGTGT...

(GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG) **IR 2**

Figure 5 - ITS rDNA sequence from *L. lainsoni* strain IM1367.

GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT **IR1**

TTCCGATGATTACACCAAAAAACATACAACTCCGGGGAGTGCTTGTGTTTTCTA
GCAATGCCTCCCCCGATACTCAGTACATCGATATATATATGTATATCGACCC
ATCTACCGTAGAAAAAGGCCGATCGACGTTAACATATCGCGTATAACCACAAAA
AAGTTCGTTCTACGGGCTTTTTTTTATGGCGGCGTGCGTGGATAACGGCTCCAT
AACGTGTCGCGATGGATAGACTTGGTCTTCCTATTTTCGTTTAAAAACCCCTTTA
AAANTTGCGATAAAGTGGTATCCATTGCCAGAATCATTCAATTTACCGAATCTT
TTGAACGCAAACGGCCATGGGAAAAAGCTCTATTTGTTGTCATCCCCGTTTCCA
TTCCATATTTCTCAGTTGTCGAACAAAAAACAACAACACGCCGCTTCCTT
CCTTCTTTCCTCTCTTATATATTGTTAATAACTATATATTTTTGTGGGAACCCAG
AAGGGAGGGCGTGTGTTTGTGTTGTGCGCATATATATATATATACGCACACGT
ATACAAGTCAGAGTTGGACAAAAATACACACCTGCACTCTCTTTTCGAGATGT
GCGTGTGGAAAACTCCTCTCTGGTGATTGCAAAGCAGTCTCTCTCTCCTCTCT
CCTCTCTATTCTCTCTTCTCCTCTCACTTTAAGAGGGGGGAAAAAAGGTATAT
AGAGAAGAGAGGTGTGGGGGGAGGCCTGTACCAGGATAATTAACAAAAACC
AAACGAGAATTCAACTTCGCGTTGGCCATTTTTTGCTTAATGGTGTGGGACCTC
CTTTCTCTTCTCTCTCTCTCCGTGTATATGCAAGTGTGTGTGGTTCTCTATATA
TACATAGAGAACCGCTCACGCAAAAAACATACTCAGAGAAGAGGGGGGAAGAC
GAGAGGGGGGGGAGCCCCACCACAAACCTTTGTTTA
CAGACCTGAGTGT...
(GCGGTTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG) **IR 2**

Figure 6 - ITS rDNA sequence from *L. naiffi* strain IM 2773.

Discussion

Due to the selective pressures in keeping the coding regions of the ribosome molecule while varying the translated but not coding spacer regions, the rapidly evolving DNA polymorphisms are detected by the amplified ITS region in the ribosomal operon. This method displays species-specific nucleotide substitutions which seems to be characterized by micro-satellite repeats or deletions that identify strains of *Leishmania* at the species level and where specific probes can be designed to provide a diagnostic PCR reaction. Rather than establish an extensive phylogenetic analysis, this study's intention is to display the varieties of leishmanias inside the subgenus. The analysis by the maximum likelihood provides the use of more information from DNA sequence than a parsimony method that could be less adequate in distinguish close isolates.

Species of *Leishmania* that cause the different clinical forms of CL can be differentiated by ITS technique and by some isoenzyme typing (Schönian *et al.*, 2003). According to the literature, these clinical cases of cutaneous leishmaniasis may be due to the capacity of parasites to induce IL-10 production by mononuclear cells whereas there is a low secretion of IL-2 and promastigotes capacity to inhibit an immune response (Akufo *et al.*, 1988). These are likely due to a differential secretion of parasite cell surface components rather than deletions in genes capable of inducing such components responsible for these differences. In our case the ITS was used only as a marker where other genetic differences could be coincident, since the parasite was under population natural divergence selective pressure to new hosts adaptation. The advantage of the ITS region rDNA analysis is that it can be amplified directly from clinical samples of *Leishmania* obtained from blood, lymph node and bone marrow aspirates and the knowledge of their specific sequences can be valuable for genetic studies of species and intra-specific varieties, besides its use for designing species specific primers based on ITS divergence.

Some mechanisms as the occurrence of cellular fusion and species hybrid formation and the occurrence of mixed infection in the vector and the reservoir, altering the parasite population imbalance, may explain the diversity generation in *Leishmania* (Rioux *et al.*, 1990).

We observed that *L. guyanensis* contain a cluster 1 of reference strain M4147 with strains IM4155 and IM3823; a cluster 2 with IM4243 and IM4235 and cluster 3 with strain

TRUS4 and LBC40 grouped near to *L. panamensis*. The different species *L. lainsoni* and *L. naiffi* are well discriminated from the *L. guyanensis* / *L. panamensis* branch, while *L. braziliensis* seems to be more related to it. The *L. braziliensis* is very widespread and seems to be very heterogeneous maybe comprising more than one related species as is the case of *L. peruviana* (Grimaldi & Tesh, 1993; Cupolillo *et al.*, 2003).

According to Cupolillo *et al.* (2000) the genus *Leishmania* would have a cluster containing *L. lainsoni*; *L. naiffi*; *L. braziliensis*; *L. panamensis* and *L. guyanensis*. Our results support this above classification for the cluster containing the *Viannia* subgenus. A replacement of *L. lainsoni* closer to *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* and *L. naiffi*, based on G6PDH heterozygosity isoenzyme analysis; sialidase presence on parasite cell surface; restriction fragment length polymorphism of the ITS rRNA and sequencing the SSU from the rRNA gene came to update the previously data obtained by isoenzyme analysis and seems more likely to the to the *Viannia* subgenus also observed by our ITS rDNA sequencing and tree construction in analysing the New World *Leishmanias* especially those obtained from the Amazon Region.

The *L. guyanensis* is more observed in upper north region of Brazil and other countries above the Amazon basin as Ecuador and Venezuela where *L. panamensis* is also observed and appear to be very related to *L. guyanensis* by isoenzyme data (Grimaldi *et al.*, 1989; Banuls *et al.*, 1999). These conclusions are supported by our results and also from data obtained by the microsatellite sequencing technique by Russel *et al.*, (1999).

The *L. lainsoni* occurring in Pará (Silveira *et al.*, 1991) among silvatic animal was at first related to *L. colombiensis* and *L. equatorensis* by an isoenzymatic study (Cupolillo *et al.*, 1998) but both species are very peculiar being *L. colombiensis* able to cause cutaneous and visceral leishmaniasis in human (Rodriguez-Bonfante *et al.*, 2003) and *L. equatorensis* is very similar to *Endotrypanum schaudinni* (Katakura *et al.*, 2003) by mini-exon gene analysis. This explains why *L. colombiensis* and *L. equatorensis* were grouped along *E. schaudinni* and *E. monterogeii* in the clade *Paraleishmania* inside the *Leishmania* genus, despite the suprapylarian development in the vector, characteristic of the *Viannia* subgenus.

Interestingly the *L. guyanensis* strain LBC40 which presented a different behaviour (Couppiè *et al.*, 2004) of cutaneous disseminated lesions grouped more distantly from the ones with muco-cutaneous forms and closer to *L. panamensis*, being jointly with strain

TRUS4 separated from mainstream cutaneous *L. guyanensis* as IM3823; IM4155 and M4147 reference strain as well to the muco-cutaneous strains IM4235 and IM4243 .

L. lainsoni was the more distant species reflecting its differences in biological and biochemical behaviour according to Correa *et al.* (2005). *L. naiffi* has also a different epidemiological and nosological characteristic diverse from *L. guyanensis* (Naiff *et al.*, 1991)

While a positive correlation was found in the clinical type of leishmaniasis and ITS restriction types H and I as well to its positioning in a separate branch, this fact could be coincidental and the proximity be related to the epidemiological cycles as observed to other leishmanial species (Ishikawa *et al.*, 2002).

References

- Akuffo, H.O.; Fehniger T.E. & Britton, S. 1988. Differential recognition of *Leishmania aethiopica* antigens by lymphocytes from patients with local and diffuse cutaneous Leishmaniasis — evidence for antigen induced immune suppression. *J. Immunol.* 141 pp. 2461–2466.
- Amersham Biosciences, 2002 – DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis System - Instructions for Product Code US81090; US81095.
- Banuls, A.; Jonquieres, R.; Guerrini, F.; Le Pont, F.; Barrera, C.; Espinel, I.; Guderian, R.; Escheverria, R. & Tibayrenc, M. 1999. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* distinct taxa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(5): 838-845.
- Beltrame-Botelho, I.T.; Gaspar-Silva, D.; Steindel, M.; Davila, A.M. & Grisard, E.C. 2005. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infect. Genet. Evol.* 5(1): 17-28.
- Correa, J.R.; Brazil, R.P. & Soares, M.J. 2005. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100(6):687-692.
- Couppiè, P.; Clyti, E.; Saint-Marie, D.; Dedet, Carme, B. & Pradinaud, R. 2004 Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: a case of a patient with 425 lesions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(5): 558-560.

- Cupolillo, E ; Momen, H. & Grimaldi Jr.,G. 1998. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93(5):663-668.
- Cupolillo, E., Grimaldi, G. Jr, Momen, H. & Beverley, S.M. 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 145–155.
- Cupolillo, E.; Medina-Acosta, E. Noyes, H.; Momen, H. & Grimaldi Jr., G. 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol.Today* 16(4):142-144.
- Cupolillo.E.; Brahim, L.R.; Toaldo, C.B.; Oliveira-Neto, M.P.; Brito, M.E.F., Falqueto, A.; Naiff, M.F. & Grimaldi Jr., G. 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41(7): 3126-3132.
- Davis, L.G.; Dibner, M. K. & Battey, J.F. 1986. Basic Methods in Molecular Biology. Ed. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut, USA. 388p.
- Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SDJ 1992.DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationship between species and strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 53:63-70.
- Naiff, R.D., Freitas, R.A., Naiff, M.F., Arias, J.R., Barrett, T.V., Momen, H. & Grimaldi, Jr. G. 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* (Lainson & Shaw 1989). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 529-530.
- Njiru, Z. K.; Constantine, C.C.; Guya, S.; Crowter, J.; Kiragu, J.M.; Thompson, R.C. & Davila, A.M. 2005. The use of ITS1 rDNA in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol. Res.* 95(3): 186-92.
- Dye C, Davis CR, Lines JD 1990. When are parasites clonal? *Nature* 348: 120.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17:368-376.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP 3.5c (phylogeny inference package). Department of Genetics. University of Washington. Seattle. U.S.A.
- Grimaldi, Jr., G., Tesh, R.B. & MacMahon-Pratt, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am.J. Trop.Med. Hyg.* 41: 687-725.
- Grimaldi, Jr, G. & Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(3): 230-250.

- Ishikawa, E.A.; Silveira, F.T.; Magalhães, A.L.; Guerra Jr., R.B.; Melo; M.N. Gomes, R. Gomes, R.; Silveira, T.G. & Shaw, J.J. 2002. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (Suppl.)1: 11-21.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hori, H. & Osawa, S. 1987. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 4: 445-447.
- Hurst, L.D., Hamilton, W.D., Ladle, R.J. 1992. Covert sex. *Tree* 7: 144-145.
- Katakura, K.; Mimori, T.; Furuya, M.; Uezato, H.; Nonaka, S.; Okamoto, M.; Gomez, L. E.A. & Hashiguchi, Y. 2003. Identification of *Endotrypanum* species from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. *J. Vet. Med. Sci.* 65 (5): 649 - 53.
- Kjelms, J. & Garret, R.A. 1990. Secondary structural elements exclusive to sequences flanking ribosomal RNAs lend support to the monophyletic nature of archaebacteria. *J. Mol. Evol.* 31: 25-32.
- Kumar, S.; Tamura, K. & Nei, M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis. Pennsylvania State University. Pennsylvania. U.S.A.
- Lainson, R. & Shaw, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: W. Peters and R. Killick-Kendrick Editors, *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* 1 Academic Press, London pp. 1–120.
- Lopes UG, Momen H, Grimaldi Jr G, Marzochi MC, Pacheco RS, Morel CM 1984. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous *Leishmaniasis*. *J. Parasitol.* 70: 89-98.
- Mendoza-Leon A, Havercroft JC, Barker DC 1995. The RFLP analysis of the b-tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitology* 111: 1-9.
- Naiff, M.F. 1998. *Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região*. Tese de mestrado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ, 60 p.
- Naiff, R.D.; Freitas, R.A.; Naiff, M.F. Arias, J.R.; Barrett, T.V.; Momen, H. & Grimaldi Jr., G. 1991 Epidemiological and nosological aspects *Leishmania naiffi* (Lainson & Shaw, 1989). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83: 529-530.

- Pacheco, R.S., Lope,s U.G., Morel, C.M., Grimaldi, G.Jr., Momen, H. 1986. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques, p. 57-65. In J.A. Rioux, *Leishmania. Taxonomy and Phylogeny*, IMEEE, Montpellier.
- Rioux, J.A.; Lanotte, G.; Serres, E.; Pratlong, F.; Bastien P. & Périère, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 65 pp. 111–125.
- Rodriguez-Bonfante, C.; Bonfante-Garrido, R.; Grimaldi Jr, G.; Momen, H. & Cupolillo, E. 2003. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect Genet. Evol.* 3 (2): 119-124.
- Russel, R.; Iribar, M.P.; Lambson, B.; Brewster, S.; Blackwell, J.M.; Dye, C. & Ajoka, J.W. 1999. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103:71-77.
- Sanger, F., Nicken, S.& Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS (USA)* 74: 5463-5467.
- Schönian G., Schweynoch C., Zlateva K., Oskam L., Kroon N., Gräser Y. & Presber W. 1996. Identification and determination of the relationship of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, pp. 19–29.
- Schönian, G. Nasereddin, A.; Dinse, N.; Schweynoch, C.; Schallig H.; Presber, W. & Jaffe, C. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 349-358.
- Sibley LD, Boothroyd JC 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359: 82-85.
- Silveira, F.T.; Lainson, J.J.; Braga, R.R.; Ishikawa, E. & Souza, A.A. 1991. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor Agouti paca (Rodentia: Dasyproctidae), no Estado do Pará, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 26: 271-275.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J & Higgins, D.G. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tibayrenc M, Ayala FJ 1991. Towards a population genetics of micro-organisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 7: 228-232.

Tibayrenc M, Kjelberg F, Ayala FJ 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the populations structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2414-2418.

Tibayrenc M, Kjelberg F, Aranaud J, Oury B, Brenière F, Dardé ML, Ayala FJ 1991. Are eukaryotic microorganism clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5129-5133.

5 - Discussão Geral

Em seu trabalho de mestrado Naiff (1998) situou a Leishmaniose Tegumentar na Amazônia como uma doença ocupacional, afetando principalmente o sexo masculino entre os 20 e 39 anos, em função das atividades de extrativismo silvestre e do padrão de transmissão da doença, que está presente em áreas urbanas e rurais, com maior concentração nessa última e em regiões florestais. A *Leishmania* predominante na região é a *L. (V.) guyanensis* que apresenta lesões cutâneas isoladas ou múltiplas, com cerca de 20 mm de diâmetro e forte reação ao exame de Montenegro. A resistência ao tratamento por parte da *L. (V.) guyanensis* se apresentou mais acentuada que os casos da leishmaniose devidos a *L. (V.) naiffi*, também presente na região. Os diversos isolados da região tipados de acordo com um padrão de restrição enzimática do espaçador transcrito interno (ITS-RFLP) mostraram-se circulantes em diferentes áreas do estado, distribuídos entre diversos hospedeiros silvestres e casos humanos em vários focos endêmicos, representando subpopulações do parasita que apresenta uma dinâmica complexa do ciclo de transmissão, devido a fatores eco-epidemiológicos citados naquele estudo. Na conclusão desse mesmo trabalho existe a sugestão que outras técnicas bioquímicas e que marcadores moleculares fossem utilizados para o estudos das variantes genéticas de *Leishmania*. Em vista da técnica de sequenciamento molecular (Sanger *et al.*, 1977) ter se tornado mais acessível com a automatização através de equipamentos, como o MegaBace (Amersham

Biosciences, 2002), o sequenciamento de regiões específicas do DNA genômico, como o caso do ITS, atende a recomendação ao estudo das variedades de *Leishmania* possibilitando desenvolver oligonucleotídeos baseados em regiões espécie-específicas do DNA identificadas pelo sequenciamento.

O motivo de escolha dos subtipos de *L. (V.) guyanensis* reside no fato desses representarem a maior parte das cepas observadas para essa espécie e estarem associados a ciclos epidemiológicos e evoluções clínicas diferentes, conforme a Tabela listando as espécies e cepas desse estudo, sendo respectivamente A (8%); B (68%); F (6%); I (2%), H (2%) das amostras populacionais de *L. (V.) guyanensis*, totalizando 86% dos tipos de amostras encontradas na Amazônia no estudo realizado por Naiff (1998). Os demais 14% estão distribuídos em 6 outros grupos com menos de 3% cada um da população total. Em relação as demais espécies de *Leishmania*, foram utilizadas cepas padrões como referência de espécies representantes dos subgêneros (Grimaldi & Tesh, 1993).

A variabilidade inter-específica e intra-específica em *Leishmania* ocorre não só por diversos fenômenos genéticos intrínsecos ao parasita, como também pela pressão adaptativa proporcionada para a sobrevivência às condições fisiológicas, bioquímicas e imunológicas de vários hospedeiros e vetores, como é o caso da região amazônica onde estão presentes 120 das 800 espécies de flebotomíneos conhecidos em todo o mundo (Grimaldi & Tesh, 1993; Arias & Freitas, 1977).

As espécies aqui estudadas dentro do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*; *L. guyanensis*; *L. panamensis*; *L. lainsoni*; *L. naiffi*; *L. lindenbergi*; *L. shawi* e *L. colombiensis* são todas elas patógenos humanos.

O diagnóstico da leishmaniose é efetuado levando em consideração dados clínicos e epidemiológicos em relação ao paciente ou uma população, no entanto deve ter sua confirmação a partir do exame laboratorial. A tendência desse diagnóstico é evoluir no

sentido de identificar não só o parasita como também a espécie de leishmânia em questão, em vista da determinação do prognóstico clínico e da conduta terapêutica apropriada. O exame atualmente mais amplamente empregado que é a visualização dos amastigotas em lâminas coradas pelo Giemsa e observadas ao microscópio ótico é rápido e barato, mas pobre em sensibilidade, pois os parasitos podem estar em baixo número na lesão, onde a amostra para a biópsia foi colhida. O material para ser cultivado, precisa de instalações laboratoriais dispendiosas e não se afasta o risco de contaminação, além de depender da presença de organismos viáveis e requerimentos de cultivo, que variam de espécie para espécie. Por último, a análise de reação imune em resposta a infecção leishmaniótica, não distingue facilmente as reações presentes e passadas, bem como, apresenta reação cruzada com outros patógenos, também variando com a espécie de leishmânia infectante, o tropismo tissular e a capacidade de resposta imune do hospedeiro, como é o caso mais dramático nos portadores de imunodeficiência por HIV ou outras causas de imunossupressão, onde pode ser que nenhuma resposta imune seja obtida.

Além do diagnóstico clínico, o conhecimento epidemiológico advindo dos testes laboratoriais, deve permitir correlacionar o parasito à sua distribuição geográfica, variações clínicas e virulência, observadas espacialmente. Com a mera observação morfológica das leishmânias, isso não é possível, mas através do método diagnóstico aqui proposto pode-se estudar epidemiologicamente a presença dessa espécie em vetores, reservatórios vertebrados e casos humanos, que ocorram numa área em estudo. A observância dos fatores epidemiológicos é também importante em vista de relatos sobre a mudança do comportamento de algumas leishmânias, como a *L. tropica* e *L. mexicana*, que embora tradicionalmente dermatrópicas, têm potencial de desenvolverem a visceralização (Magill *et al.*, 1993), como inversamente, a *L. infantum* que causa a forma visceral, pode também se mostrar dermatrópica (Rioux *et al.*, 1990).

A sensibilidade da PCR foi comparada a várias técnicas e se apresenta como a técnica mais sensível e específica. A maior sensibilidade se observa para a PCR, que busca detectar a presença de leishmânia nas lesões, quaisquer espécies que sejam, sendo menos sensíveis àquelas que além da positividade para o parasita, também buscam identificá-lo especificamente.

Em relação à especificidade, a *L. guyanensis* encontrada na região amazônica, quando analisada por isoenzimas mostra uma homogeneidade entre seus perfis, sendo seis enzimas suficientes para discriminar esta espécie através da comparação do perfil eletroforético de migração, principalmente na enzima G6PDH (Cupolillo *et al.*, 1995). Na análise das sequências do ITS do gene do RNA ribossomal, nós pudemos observar que as diferenças entre os isolados são muito pequenas, às vezes de alguns poucos nucleotídeos, que pode criar perfis de restrição diferentes entre os isolados, porém insuficientes para a confecção de primers específicos. Nesses isolados o trabalho de Naiff (1998) mostrou que dos 12 tipos de perfil de restrição encontrados, os tipos denominados A e B representaram uma grande proporção da população de *L. guyanensis* encontrada em várias localidades da região amazônica.

Algumas espécies como a *L. braziliensis* e *L. panamensis* têm a região ITS muito semelhante com a *L. guyanensis*, sendo que esta última espécie também é muito semelhante por isoenzimas, e nos isolados obtidos no Equador não se consegue distinguir pela enzima alelo diagnóstica G6PDH a *L. panamensis* de *L. guyanensis* (Banuls, 1999). Essas espécies são diferenciadas, no entanto, pelo uso de anticorpos monoclonais e pelo fato de possuírem vetores e reservatórios diferentes e evolução patológica no homem também diferente, permanecendo, portanto, como espécies distintas.

O uso de anticorpos monoclonais pode mostrar variações nos isolados de *L. guyanensis* obtidos na região amazônica. Embora estes sejam importantes, a tipificação de

um determinado isolado e sua correlação a uma evolução clínica ou condição de manutenção, a partir de determinado hospedeiro ou esquema de passagem em cultivo, os anticorpos monoclonais exibem diferenças da superfície celular do parasita relacionadas à interação celular, e não é a técnica mais indicada para a determinação de espécie, uma vez que uma determinada espécie, dependendo de sua manutenção em condições de aporte nutricional em cultivo e resposta imune do hospedeiro, pode variar suas características antigênicas ou mesmo metabólicas, refletindo até mesmo na síntese de algumas enzimas, e nos determinantes antigênicos de natureza glicoproteica da superfície celular. Alguns monoclonais, como os utilizados por Romero *et al.* (2002) em um estudo de pacientes na cidade de Manaus, falharam em detectar a espécie para o qual foram sintetizados, no caso o monoclonal B19, que reconheceria a *L. guyanensis*, reforçando a importância da diversidade genética do parasito associado a certos ciclos epidemiológicos e tipo clínico.

A análise da diversidade através da construção de árvore filogenética mostrou que existe uma grande proximidade entre as diversas espécies do subgênero *Viannia* e que essas pequenas diferenças podem ser vistas no sequenciamento e alinhamento da região ITS para as espécies descritas nesse estudo e também para as sequências depositadas em banco de dados. Essa observação é comprovada por outros dados, como o estudo de isoenzimas e o perfil de restrição do kDNA e ITS-RFLP (Cuervo *et al.*, 2004), quando se conclui ser necessária a investigação de um grande número de enzimas para a obtenção de um perfil capaz de discriminar algumas das espécies (Schönian *et al.*, 2003). O teste do "bootstrap" demonstrou que a significância entre as diversas árvores é pequena o que se deve, provavelmente, ao pequeno número de sítios discriminativos na sequência de ITS. Uma perturbação desses sítios por substituições ao acaso induziria uma mudança no arranjo da árvore filogenética. Isso vem reforçar a necessidade de se utilizar um maior número de sequências de isolados representativos de cada uma das espécies, para se ter

uma melhor idéia da extensão da variabilidade de cada espécie. A árvore que produziu o maior distanciamento foi aquela obtida pela análise de máxima verossimilhança, provavelmente, porque leva em consideração uma maior quantidade de informações sobre todos os nucleotídeos dispostos na sequência ITS, enquanto que a eficiência do método de parcimônia tende a ser menor, uma vez que é necessária a coleta de um maior número de dados para se obter a mesma probabilidade de inferir a árvore filogenética correta.

Os dados de sequenciamento devem ser associados aos dados de outros marcadores como isoenzimas, proteínas de superfície, açúcares e antígenos de superfície revelados por lectinas, anticorpos monoclonais, estudos de expressão gênica, microsátélites (Chiurillo *et al.*, 2001; El Tai *et al.*, 2001; Kuhls *et al.* 2005). Para a análise de filogenia deve também considerar a estrutura secundária do ribossomo, como subsídio ao correto alinhamento dos sítios da sequência ITS entre os organismos da família *Trypanosomatidae*, para que se possa traçar a correta posição de um nucleotídeo, em relação a esse *taxa*, estabelecendo assim uma homologia posicional relativa a um ancestral comum.

A grande quantidade de variabilidade intra-específica oriunda do grande número de isolados de *Leishmania*, como, por exemplo, a observada por isoenzimas para a *Leishmania braziliensis* (Cupolillo *et al.*, 2003), contribuiu para complicar a classificação taxonômica.

Devido à existência de infecções mistas em hospedeiros invertebrados e vertebrados e da ocorrência de híbridos em *Leishmania*, as variedades intra-específicas que são um balanço temporal de clones dentro de uma população de leishmânias que são mais adaptadas às condições fisiológicas a um compartimento de um organismo, à pressão seletiva exercida pela resposta imunológica do hospedeiro, ou pelo uso de quimioterápicos selecionando os clones resistentes.

O espaçador ribossomal, no entanto, não está sujeito ao efeito dessas pressões seletivas e sim ao tempo de evolução entre as espécies, em que eventos de modificação das sequências nucleotídicas vão se acumulando, sendo o ITS um bom alvo para o desenho de “primers” espécie-específicos e que possam caracterizar a distribuição das espécies de *Leishmania* na natureza e sua ocorrência em vetores, reservatórios e casos humanos em uma área geográfica.

6 - Conclusões

- ⇒ A partir da análise de sequências da região de ITS de amostras isoladas de *Leishmania* (V.) *guyanensis* foi possível desenhar um “primer” específico capaz de discriminar pela técnica de PCR as espécies *L. (V.) guyanensis* de *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) braziliensis*.
- ⇒ O PCR foi eficaz a partir do DNA extraído de culturas, lesão ulcerada e também do flebótomo infectado por *Leishmania*, possibilitando seu uso em estudos clínicos e epidemiológicos.
- ⇒ O uso do ITS permite avaliar a diversidade de espécies de leishmânias sem o risco de estabelecer classificações instáveis, como aquelas baseadas em marcadores genéticos sujeitos a pressões seletivas.
- ⇒ A proximidade detectada pelo ITS de alguns isolados, refletindo um pequeno tempo de divergência entre eles, mostrou poder coincidir com algumas características bioquímicas e fisiológicas em comum, como foi o caso das cepas com comportamento muco-cutâneo.
- ⇒ As sequências ITS das espécies *L. lainsoni* e *L. naiffi* foram pela primeira vez descritas nesse trabalho, podendo subsidiar a construção de primers diagnósticos dessas espécies.

7 - Perspectivas

Não há até o momento um método seguro para o acompanhamento da cura da Leishmaniose, havendo a necessidade de reavaliações periódicas pelas técnicas tradicionais de diagnóstico ao longo de 5 a 10 anos. No caso de se estabelecer uma seqüência diagnóstica com iniciadores (“primers”) específicos e que discriminem a *L. (V.) guyanensis* e suas variantes através da PCR, poderia ser realizada a análise quantitativa do DNA pela técnica de PCR em tempo real (Heid, 1996); tais “primers” seriam utilizados para a obtenção da seqüência da região intergênica, com a finalidade de construir uma sonda fluorogênica específica, que propicie a detecção do DNA do parasita em biópsias de lesões (Davis *et al.*, 1986), objetivando a comprovação da cura pós-tratamento para a leishmaniose. A meta do grupo se insere na necessidade de elaboração e execução de projetos para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, produção de soros, vacinas e medicamentos para as doenças tropicais, buscando estudar na Biodiversidade Amazônica, agentes de etiologias endêmicas da região, que têm atuado como elementos desfavoráveis para a fixação humana e o desenvolvimento de atividades florestais.

Sendo assim:

- ⇒ O estudo das seqüências ITS de cada uma das espécies do subgênero *Viannia* pode gerar novos "primers" marcadores espécie-específicos;
- ⇒ O maior detalhamento das variedades de *Leishmania (V.) guyanensis* encontradas na região poderá permitir a construção de "primers" que, através da metodologia do "Nested-PCR", detectem não somente a espécie, mas também, uma cepa de interesse, caso esta ocorra associada a uma área ou ciclo epidemiológico específico.

⇒ O uso da PCR para *Leishmania (V.) guyanensis* em vetores da região permitirá um estudo do ciclo epidemiológico e um alerta da densidade de insetos infectados em determinadas regiões, auxiliando a vigilância epidemiológica.

8 – Referências Bibliográficas Gerais

- Alvar, J.; Canavate, C.; Gutierrez-Solar, B.; Jimenez, M.; Laguna, F.; Lopez-Velez, R.; Molina, R. & Moreno, J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 298-319.
- Amersham Biosciences, 2002 – DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis System - Instructions for Product Code US81090; US81095.
- Amorim, D.S. 1997 Elementos básicos de sistemática filogenética 2ª ed., Holos Ed. e Soc. Bras. Entomol., Ribeirão Preto, SP.
- Arias, J.R. & Freitas, R.A. 1978. Sobre os vetores da leishmaniose cutânea na Amazônia Central do Brasil. 2. Incidência de flagelados em flebótomos selváticos. *Acta Amaz.* 8., 387-396.
- Arias, J.R. & Naiff, R. D. 1981. The principal reservoir host of cutaneous Leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. *Mem. Instituto Oswaldo Cruz*, 76 (3): 279-286.
- Avise, J.C. & Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94 (15): 7748-7755.
- Banuls, A.L.; Hide, M. & Tibayrenc, M. 1999. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *Int. J. Parasitol.* 29: 1137-1147.

- Barbosa, A F., Moreira, C.F.S., Oliveira, S. M. P., Bertho, A L., Grimaldi Jr., G., Rangel, E. F. & Franco, A.M.R. Ocorre seleção e recombinação genética entre parasitas dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* em infecções experimentais em flebótomos? I - Desenvolvimento e grau de infecções de *Endotrypanum* sp. em *Lutzomyia longipalpis*. Congresso de Parasitologia, Poços de Caldas. 1999.
- Barbosa, R. I., Ferreira, E.J.G. & Castellón, E.G. 1997. Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima. Manaus, AM. Ed. INPA. 630 p.
- Barrett, T. V. 1993. Cutaneous leishmaniasis in Amazonas State, Brazil: Eco-epidemiology and questions of control em Brandão-Filho, SP. *Research and Control of Leishmaniasis in Brazil*, pp.31-44. Recife, Fundação Oswaldo Cruz.
- Berman, J. D. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24, 684–703.
- Brasil.Ministério da Saúde. www.saude.gov.br (atualizado 2005).
- Castilho, T.M.; Shaw, J.J. & Floeter-Winter,L.M. 2003. New PCR assay using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2, 540-546.
- Chiurillo, M.A., Sachdeva, M.; Dole, V.S.; Yepes, Y.; Miliani, E.; Vásquez, L.; Rojas, A.; Crisante, G.; Guevara, P. Anez, N.; Madhubala, R. & Ramirez, J.L. 2001. Detection of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in the Old and New Worlds by a polymerase chain reaction assay based on telomeric sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(5): 573-582.
- Colmenares, M.; Kar, S.; Goldsmith-Pestana, K. & McMahon-Pratt, D. 2002. Mechanisms of Pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (Suppl. 1): S1/3-S1/7.

- Coura J.R., Fernandes O., Arboleda M., Barrett T.V., Carrara N., Degraive W. & Campbell D.A. 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 90: 278-279.
- Cuervo, P.; Cupolillo, E.; Nehme, N.; Hernandez, V. Saravia, N & Fernandes, O. 2004. Leishmania (*Viannia*): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp. Parasitol.* 108: 59-66.
- Cupolillo.E.; Brahim, L.R.; Toaldo, C.B.; Oliveira-Neto, M.P.; Brito, M.E.F., Falqueto, A.; Naiff, M.F. & Grimaldi Jr., G. 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41(7): 3126-3132.
- Cupolillo E., Alves A. F., Brahim L.R. N., Naiff M. F., Pereira L.O.R., Oliveira-Neto M.P., Falqueto A & Grimaldi Jr.G. 2001. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Med. Microbiol. Immunol.* 190: 57-60.
- Cupolillo E., Grimaldi Jr. G., Momen H. & Beverley S. M. 1995. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 145-155.
- Cupolillo E., Grimaldi Jr, G. & Momen H. 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50(3): 296-311.
- Davis, L.G.; Dibner, M. K. & Battey, J.F. 1986. Basic Methods in Molecular Biology. Ed. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut, USA. 388p.
- Degraive W., Fernandes O., Campbell D., Bozza M., Lopes U. 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89:463–469.
- Dias, J.C.P. 2000- Doença de Chagas no Novo Milênio. *Rev. Patol. Trop.*, 29: 229-239.

- El Tai, N.O.; El Fari, M.; Mauricio, I.; Miles, M.A.; Oskam, L.; El Safi, S.H.; Presber, W. & Shönian, G. 2001. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp. Parasitol.* 97: 35-44.
- Fernandes O., Murthy V.K., Kurath U., Degraeve W., Campbell D. 1994. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:261 – 271.
- Fernandes O., Souto R.P., Castro J A., Borges J., Carrara N., Junqueira A.C.V., Naiff R.D., Barrett T.V., Degraeve W., Zingales B., Campbell D.A. & Coura J.R. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am.J. Trop.Med.Hyg.* 58: 807-811.
- Ferreira, A.W. & Ávila, S.L.M. 2001. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro, R.J., Ed. Guanabara Koogan. 2ª Ed., 302 p.
- Franco A.M.R. 1995. *Caracterização Biológica e Molecular de Parasitos do Gênero Endotrypanum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)*. Tese de Doutorado, Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Franco, A M.R., Guzman, H., Deane, M., Tesh, R.B. & Grimaldi, Jr. G. 1997a. The experimental infections in species of New and Old World phlebotomine sand flies with *Endotrypanum* spp. *J. Med. Entomol.*, 34: 198-192.
- Franco, A. M.R., Machado, G.M.C., Naiff, R.D., Moreira, C.F.S., McMahon-Pratt, D. & Grimaldi Jr., G. 1997b. Characterization of *Endotrypanum* parasites using specific monoclonal antibodies. *Mem, Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 63-68.
- Franco, A.M.R. & Grimaldi Jr. G. 1999. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the Neotropical Tree Sloths (Edentata). *Mem. Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 261-268.

- Franco, A. M. R., Machado, G. M. C.; Moreira, C.F.S., & Grimaldi Jr., G. 2000. Minicircle kDNA microheterogeneity in *Endotrypanum* discriminate parasites within this genus. *Mem. Instituto OswaldoCruz*.
- Franco, A.M.R., Momen, H., Naiff, R.D., Moreira, C.F.S., Deane, M. & Grimaldi Jr. G. 1996. Enzyme polymorphism in *Endotrypanum* and numerical analysis of isoenzyme data. *Parasitology*, 113: 39-48.
- Freitas, R.A., Barrett, T.V. & Naiff, R.D. 1989. *Lutzomyia reducta* Feliciangeli, et al 1988, a host of *Leishmania amazonensis*, sympatric with two other members of the *flaviscutellata* complex in Southern Amazonas Rondônia, Brazil. (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84:363-369.
- Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. www.fmt.am.gov.br (atualizado 2005).
- Gibson, W.C., Marshal T.F. & Godfrey D.G. 1980. Numerical analysis of enzyme polymorphism. *Adv. Parasitol.* 18: 175-245.
- Gomes R.F., Macedo A.M., Pena S.D., Melo M.N. 1995. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp. Parasitol.* 80:681 –687.
- Grimaldi, Jr, G. & Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(3): 230-250.
- Grimaldi, Jr, G., Kreutzer, R.D., Hashigushi, Y., Gomez, E.A., Mimory ,T. & Tesh, R.B.1992. Description of *Leishmania equatorensis* sp.n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87:221-228.
- Grimaldi, Jr. G., Momen, H., Naiff, R.D., McMahon-Pratt, D. & Barrett, T.B. 1991. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region, Brazil. *Am.J. Trop. Med.Hyg.* 44(6).

- Grimaldi, Jr., G., Tesh, R.B. & MacMahon-Pratt, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am.J. Trop.Med. Hyg.* 41: 687-725.
- Hashiguchi, Y., Gomez, E.A, Coronel, V.V., Mimori, T., Kawabata, M., Furuya, M., Nonaka, S., Takaoba, H., Alexander, J. B., Quizhpe, AM., Grimaldi Jr., G., Kreutzer, R.D. & Tesh, R.B. 1991. Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major* like parasites. *Am. J.Trop.Med. Hyg.* 44: 90-165.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-993.
- Hendricks, L.D., Wood, D.E. & Hadjuk, M.E. 1978. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76: 309-316.
- Hernandez, R., Rios, P., Valdes, A.M. & Pinero, D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41: 207-212.
- Hills, D.M.; Moritz, C. & Mable, B.K. 1996. Molecular Systematics. 2° Ed. *Sinauer Associates*, Sunderland, MA, U.S.A.
- Hyde, J.E. 1990. Molecular Parasitology. *Open University Press*, Buckingham, U.K.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsk, J.J. & White, T.J. 1990. PCR protocols: A Guide to Methods and application. *Academic*, San Diego, CA.
- Jaffe, C.L., Grimaldi Jr., G. & McMahon-Pratt, D. 1984. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel, C.M- (ed.), Genes and Antigens of Parasites. *A Laboratory Manual.* 2"d. Ed. Fundação Oswaldo Cruz, RJ, pp.47-91.
- Katakura, K.; Mimori, Furuya, M.; Uezato, H.; Nonaka, S.; Okamoto, M.; Gomez, L. E.A.& Hashiguchi, Y. 2003. Identification of *Endotrypanum* species from a sloth, a

- squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. *J.Vet.Med. Sci.* 65 (5): 649 - 53.
- Kreutzer, R.D., Corredor, A., Grimaldi, Jr. G, Groge, M., Rowton, E.D., Young, D.G., Morales, C., McMahon-Pratt D., Guzman, H. & Tesh, R.B. 1991. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp.n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) a new parasite infecting humans, animais, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 662-675.
- Kreutzer, R.D., Delgado, O., Castes, M. & White, Jr.A.C. 1993. *Leishmania colombiensis* in Venezuela. *Am. J. Trop Med. Hyg.* 48(11): 145-147.
- Kreutzer, R.D., Souraty, N. & Semko, M.E. 1987. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 22-32.
- Kuhls, K.; Mauricio, I. L.; Pralong, F.; Presber, W. & Shonian, G. 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 7 (11-12): 1224-1234.
- Lainson, R. 1988. Demographic Changes and their influence on the Epidemiology on the American ; Leishmaniasis. Demography and Vector-Borne Diseases. (Ed MW Service): *CRC Press, Inc Boca Ratow Florida Chap 6*: 85-106 .
- Lainson, R., Braga, R.R., Souza, A.A., Povia, M.M., Ishikawa ,E.A.Y. & Silveira, F.T. 1989. *Leishmania (Viannia) shawi* sp A parasite of monkeys sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64: 200-207.
- Lainson, R. & Shaw, J.J. 1979. The role of animais in the epidemiology of the South American leishmaniasis. In: Lumsdem HR, Evans DA eds. *Biology of the Kinetoplastida* vol 2. Acad. Press Itd London p 1-116.

- Lainson, R. & Shaw, J.J. 1987. Evolution, Classification and geographical distribution. In: Peters W., Killick-Kendrick R eds .The Leishmaniasis in Biology and Epidemiology Vol1 London *Acad. Press* 1-120.
- Lainson, R. & Shaw, J.J. 1989. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. A parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64: 3-9.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., Braga, R.R. & Ishikawa, E.A.Y. 1990. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw 1989. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65: 282-194.
- Li, W.H. & Graur, D. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. *Sinauer Associates*, Sunderland, MA, U.S.A. Li, W.H. & Graur, D. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. *Sinauer Associates*, Sunderland, MA, U.S.A.
- Machado, G. 1999. *Estudo da heterogeneidade populacional de parasitas dos gêneros Endotrypanum e Leishmania através do perfil de RAPD*. Monografia, especialização em Saúde Pública.
- Magill, A.J.; Grogl, M.; Gasser, R.A.; Sun, W. & Oster, C.N. 1993. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N. Engl. J. Med.* 328: 1383-1387.
- Marfurt, J.; Niederwieser, I.; Makia, N.D.; Beck, H.P. & Felger, I. 2003. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 46, 115-124.
- Matioli, S.R. (ed.) 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, S.P., Ed. Holos. 202 p.
- Maurício, I.; Stothard, J.R. & Miles, M.A. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, 16: 188-189.

- Mayr, E. 1977. Populações, espécies e evolução. São Paulo, S.P., Ed. Companhia Editora Nacional/EDUSP. 485 p.
- Mayrink, A.N. 2000. *Caracterização de antígenos de Endotrypanum e inquérito soropidemiológico da infecção em reservatórios naturais*. Tese de Mestrado, Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Momen, H. 1984. Parasite characterization by zymodeme analysis. In: Morel CM, ed. Genes and antigens of Parasites. A laboratory manual. Rio de Janeiro *UNDP/World Bank/WHO-FINEP,CNPq,FIOCRUZ* p.111-120.
- Murray, P.R., Rosenthal,K.S., Kobayashi, G.S. & Pfaller, M.A. 2000. Microbiologia Médica. 3ª edição. Rio de Janeiro, R.J., Ed. Guanabara Koogan. 604 p.
- Mendoza-Leon, A; Luis, L.; Fernandes, O.; Cupolillo, E. & Garcia, L. 2002. Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 Suppl. 1:S65-70.
- Naiff, R.D., Barrett, T.V., Naiff, M.F., Ferreira, L.C.L. & Arias, J.R. 1996. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. *Rev.Inst.Med. Trop. São Paulo.* 38: 273-277.
- Naiff, R.D., Freitas, R.A., Naiff, M.F., Arias, J.R., Barrett, T.V., Momen, H. & Grimaldi, Jr. G. 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* (Lainson & Shaw 1989). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 529-530.
- Naiff, M.F. 1998. *Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região*. Tese de mestrado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, IOC, FIOCRUZ,60 p.
- Naiff, M.F., Cupolillo, E., Naiff, R.D., Momen, H.,Barrett, T. & Grimaldi Jr. G. 1999. Leishmaniose tegumentar na Amazônia: Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 243.

- Naiff, M.F., Naiff, R.D. & Barrett, T.V. 1998. Vetores selváticos de doença de Chagas na área urbana de Manaus (AM): atividade de vôo nas estações secas e chuvosas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 31: 103-105.
- Odum, E. P. 1988. Ecologia. Rio de Janeiro, R.J. Ed. Guanabara Koogan. 434p.
- Organização Mundial da Saúde. www.who.int/health-topics/leishmaniasis.htm (2005).
- Pajot, F.X., Le Pont, F., Gentile, B. & Besnard, R. 1982. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 1: 112-113.
- Pascalis, H.; Lavergne, A.; Bourreau, E.; Prévot-Linguet, G.; Kariminia, A.; Pradinaud, R.; Rafati, S. & Launois, P. 2003. Th1 cell development induced by cysteine proteinases A and B in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect. Immun.* 71(5): 2924-2926.
- Ready, P.D., Lainson, R., Shaw, J.J. & Ward, R. 1986. The ecology of *Lutzomyia umbratilis* Ward e Fraiha (Diptera: Psychodidae), the major vector to man of *Leishmania braziliensis guyanensis* in north-eastern Amazônia Brazil. *Bull. Ent. Res.*, 76: 21-40.
- Rioux, J.Á., Lanotte, G., Serres, E.; Pratlong, F., Bastián, P. & Perieres, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Using of isoenzyme. Suggestion for a new classification. *Ann. Parasitol. Comp.* 65(3): 111-115.
- Rey, L. Parasitologia 2001 Rio de Janeiro, R.J. Ed. Guanabara Koogan, 3ª Ed., 856 p.
- Rodriguez-Bonfante, C.; Bonfante-Garrido, R.; Grimaldi Jr, G.; Momen, H. & Cupolillo, E. 2003. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect. Genet. Evol.* 3 (2): 119-124.
- Romero, G.A.S.; Ishikawa, E.; Cupolillo, E.; Toaldo, C.B.; Guerra, M.V.F.; Paes, M.G.; Macedo, V.O. & Shaw, J.J. 2002. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 96(2): 131-136.

- Salati, E., Shubart, H.O.R., Junk, W. & Oliveira, A.E. 1983. Amazônia: desenvolvimento, integração e ecologia. São Paulo, S.P., Ed. Brasiliense/CNPq. 327 p.
- Sanger, F., Nicken, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS (USA)* 74: 5463-5467.
- Schneider, H. 2003. Métodos de Análise Filogenética. 2ª ed., Holos Ed. e Soc. Bras. Entomol., Ribeirão Preto, SP.
- Schonian, G. Nasereddin, A.; Dinse, N.; Schweynoch, C.; Schallig H.; Presber, W. & Jaffe, C. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 349-358.
- Shaw, J.J. 1982. Taxonomy of the genus *Leishmania*: Traditionalist's view and modern concepts. In: Chance ML, Walton BC (eds). Biochemical characterization of *Leishmania*. Geneva *UNDP/WORLD BANK/WHO* p 9-24.
- Shaw, J.J., Ishikawa, E.A.Y., Lainson, R., Braga, R.R. & Silveira FT 1991. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, dSouza, Povoas, Ishikawa, Silveira 1989. in Pará State, Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 66: 243-246.
- Shaw, J.J., Lainson, R., McMahon-Pratt, D. & David, Jr. D. 1986. Serodeme of the *Leishmania braziliensis* complex. In: Rioux JA ed. *Leishmania Taxonomy and Phylogeny* Montpellier *IMEEE* 179-183.
- Shaw, J.J. 1985. The hemoflagellates of sloths, vermilingues (anteaters), and armadillos. In: The evolution and ecology of armadillos, sloths and vermilingues. Montgomery, G.G. (ed.) Smithsonian Institution, Washington, D.C., pp.279-292.
- Silveira, F.T., Shaw, J.J., Braga, R.R. & Ishikawa, E 1987. Dermal leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. n. a new parasite from the State of Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 289-291.

- Silveira, F.T.; Ishikawa, E.A.; de Souza, A.A. 7 Lainson, R. 2002 . An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belem , Para State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon Region. *Parasite* 9(1): 43-50.
- Sioli, H. 1983. Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. 3ª edição. Petrópolis, R.J., Ed. Vozes. 72p.
- Souza, I.S., Naiff, R.D., Guimarães, T.C., Naiff, M.F., Cupolillo, E. & Rodrigues, W..A. .1998. American Cutaneous leishmaniasis for *Leishmania (Viannia) guyanensis* opening clinic presentation of human immunodeficiency virus disease. *J. Eur. Acad. Dermat. and Venerol.* World Health Organization. 1990. Control of Leishmaniasis. WHO Tech Rep Ser 793.
- Terborgh, J. 1992. Diversity and the rain forest. New York, U.S.A. Ed. Freeman & Co. 232p.
- Uliana S.R.B., Nelson K., Beverley S.S., Camargo E.P., Floeter-Winter L.M. 1994. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41:324 – 330.
- Van Eys G.J.J.M., Schoone G.J., Kroon N.C.M., Ebeling S.B. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Biochem. Parasitol.* 51:133 – 142.
- Volpini A.C., Passos V.M.A., Oliveira G.C., Romanha A.J. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 90:31 – 37.
- Wallace, B. 1978. A humanidade, suas necessidades, ambiente, ecologia. Rio de Janeiro, R. J., Ed. Livros Técnicos e Científicos/EDUSP. 277 p.

- Walton, B.C.; Shaw, J.J. & Lainson, R. 1977. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania brasiliensis*. *J. Parasitol.* 63: 118-119.
- Wilson, M.E. & Pearson, R.D. 1988. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 56: 363-369.
- Zeledon, R., Ponce, C. & Murillo, J. 1979. *Leishmania herreri* sp.n. from sloths and sandflies of Costa Rica. *J. Parasitol.* 65: 275-279.

9 – Apêndice

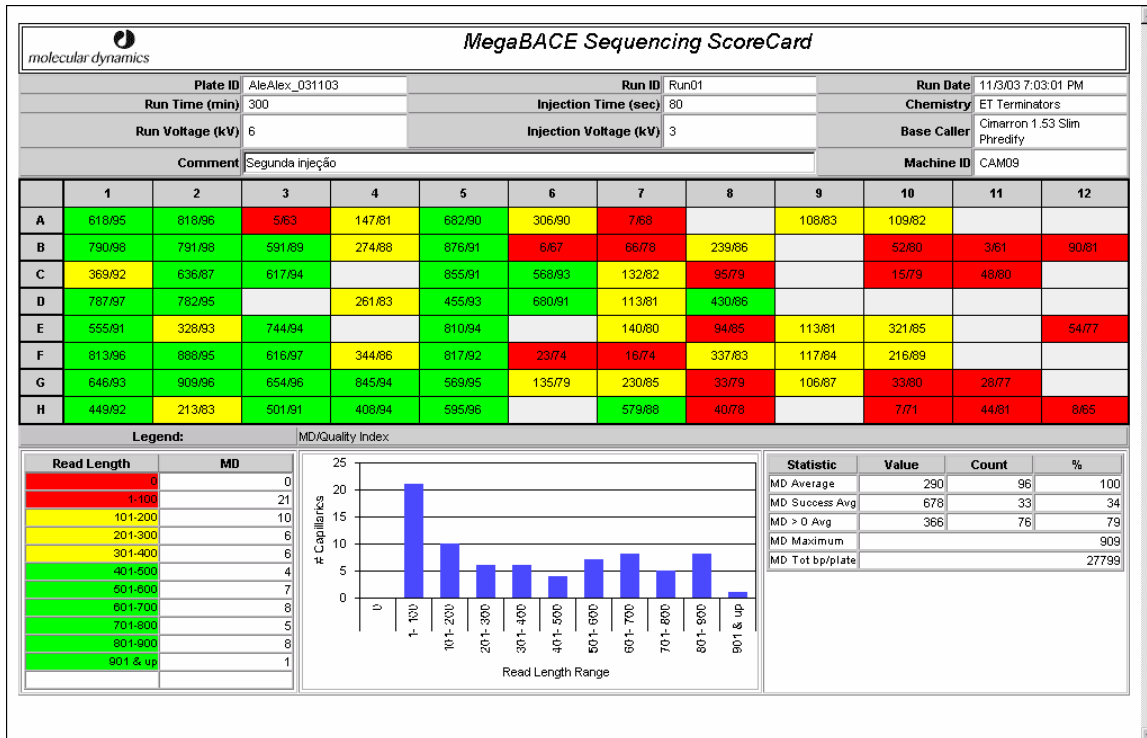


Ilustração 1 : Cartão de qualificação das seqüências obtidas na leitura do sequenciador automático.

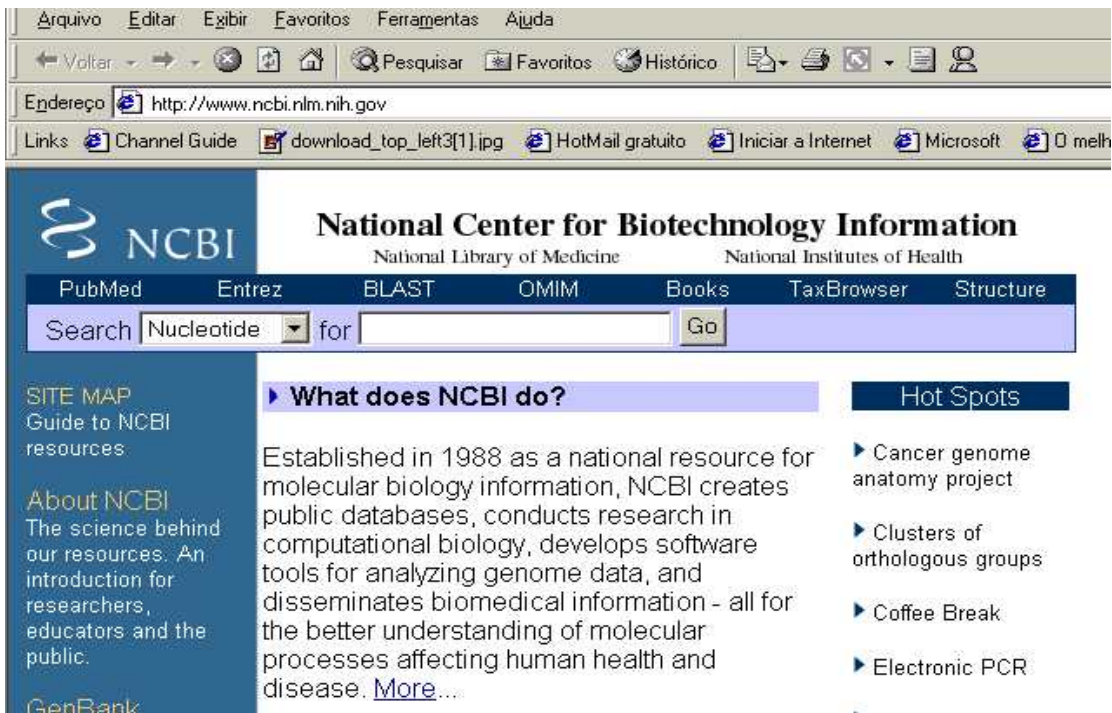


Ilustração 2 : Página inicial do banco de dados Genbank de acesso a seqüências nucleotídicas e dados de bioinformática.

Neighbour-Joining
Kimura 2-parameter
1000 bootstrap pseudoreplicates
872 sites

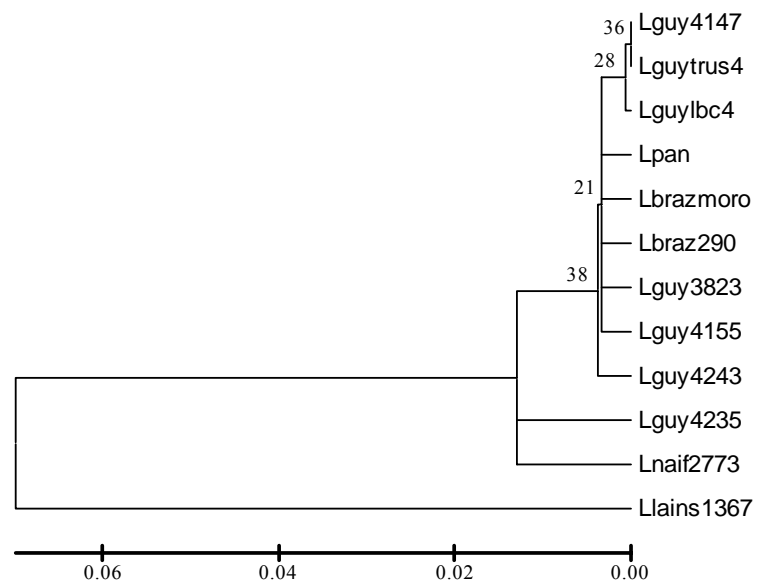


Ilustração 3 - Árvore Filogenética com o método NJ com 1000 "bootstrap" pseudoréplicas.

Max parsimony

872 sites

Consensus of 450 parsimonious trees

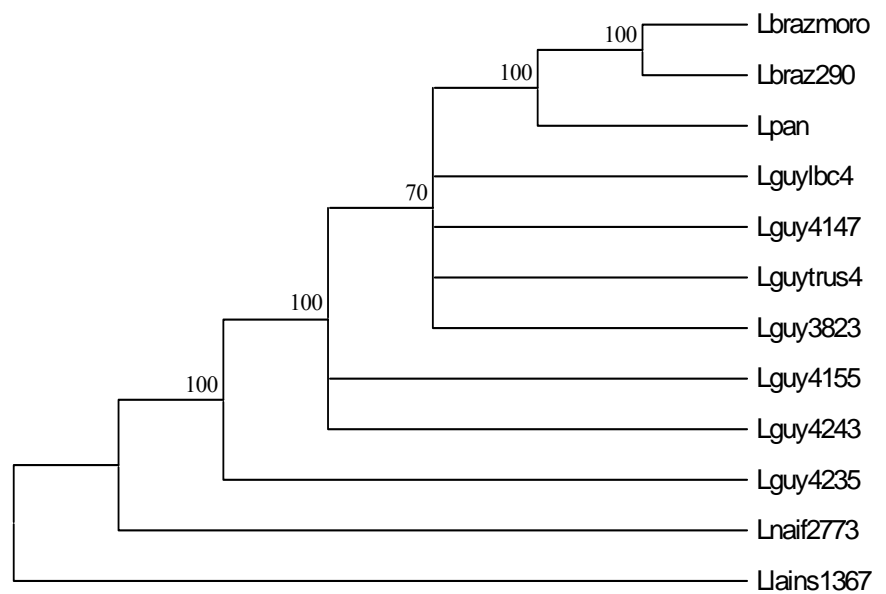


Ilustração 3 - Arvore Filogenética obtida com Máxima Parcimônia. Os números indicam a quantidade de árvores que apresentam essa distribuição.

Lguy4147	1	CTGGATCATT	TTCCGATGAT	TACACCAAAA	AACATACAAC	TCCGGGGAG-	GCTTGTGTTT
Lguytrus4	1	CTGGATCATT	TTCCGATGAT	TACACCAAAA	AACATACAAC	TCCGGGGAG-	GCTTGTGTTT
Lguy1bc40	1	CTGGATCATT	TTCCGATGAT	TACACCAAAA	AACATACAAC	TCCGGGGAG-	GCTTGTGTTT
Lpan	1	CTGGATCATT	TTCCGATGAT	TACACCAAAA	AACATACAAC	TCCGGGGAG-	GCTTGTGTTT
Lbrazmoro	1	CTGGATCATT	T-CCGATGAT	TACACCAAAA	AACACACAAC	TCCGGGGAG-	GCTTGTGTTT
Lbraz2905	1	CTGGTTCATT	T-CCGATGAT	TACACCAAAA	AACACACAAC	TCCGGGGAG-	GCTTGTGTTT
Lnaif2773	1	CTGGATCATT	TTCCGATGAT	TACACCAAAA	AACATACAAC	TCCGGGGAGT	GCTTGTGTTT
Llains1367	1	ctggatcatt	ttccgatgat	tacaccaaaa	aacatacaac	tccggggagg	cttgtgtttt
Clustal Co	1	**** *	*****	*****	**** *	*****	*****
			70	80	90	100	110
	
Lguy4243	60	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	AT--GTATAT
Lguy4155	60	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	AT--GTATAT
Lguy4235	60	TCTAGCAA-G	CCTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	AT--GTATAT
Lguy3823	60	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	AT--GTATAT
Lguy4147	60	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	AT--GTATAT
Lguytrus4	60	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	ATATGTATAT
Lguy1bc40	60	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	ATATGTATAT
Lpan	60	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	AT----ATAT	ATATNTATAT
Lbrazmoro	59	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	ATGTGTATAT	ATATATATAT
Lbraz2905	59	TCTAGCAA-G	CCTTTCCAC	AGATACGAA	TACAATCTAT	ATGTGTATAT	ATATATATAT
Lnaif2773	61	TCTAGCAATG	CCTC-CCCC	CGATACTCAG	TACA-TCGAT	AT----ATAT	AT--GTATAT
Llains1367	61	ctagcaagcc	tttcccaagc	atagcgaata	caatctatat	atataatatnt	atataagacac
Clustal Co	57	***** *	*** ** *	***** **	**** * **	** ** **	** ** **
			130	140	150	160	170
	
Lguy4243	113	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lguy4155	113	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lguy4235	113	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lguy3823	113	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lguy4147	113	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lguytrus4	115	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lguy1bc40	115	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lpan	115	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lbrazmoro	118	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lbraz2905	118	AGACACAACA	TACAGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACAACAA
Lnaif2773	113	CGACCCATC-	TACCGTAGAA	AAAGGCCGAT	C-GACGTTAA	CATATCGC-G	TATACCACAA
Llains1367	121	aacatacagt	agaaaaagcc	cgatcgacgt	taacatatcg	cgtatacaac	aaaaaagttc
Clustal Co	100	*** ** *	*** *****	***** **	* *****	***** *	***** **
			190	200	210	220	230
	
Lguy4243	171	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lguy4155	171	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lguy4235	171	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lguy3823	171	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lguy4147	171	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lguytrus4	173	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lguy1bc40	173	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT--TTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lpan	173	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lbrazmoro	176	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lbraz2905	176	AAAAGTTC-G	TTCTACGG-C	TTT-TTTTT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTCACATAA
Lnaif2773	170	AAAAGTTC-G	TTCTACGGG	TTTTTTTAT	GGCGGCGTGC	GTGGATAACG	GCTC-CATAA
Llains1367	181	gttctacggc	ttttttttg	gcgcggtgcg	tggataacgg	ctcacataac	gtgtcgcgat
Clustal Co	153	***** *	***** *	*** ** *	***** **	***** **	***** **

		250	260	270	280	290	300
Lguy4243	228
Lguy4155	228	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lguy4235	228	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lguy3823	228	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lguy4147	228	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lguytrus4	230	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lguy1bc40	229	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AAAACGCAGT	---AAAGTGC
Lpan	230	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lbrazmoro	233	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lbraz2905	233	CGTGTGCGGA	TGGAT-GACT	TGG-CTTCCT	ATTTTCGTTGA	AGAACGCAGT	---AAAGTGC
Lnaif2773	228	CGTGTGCGGA	TGGATAGACT	TGGTCTTCCT	ATTTTCGTTGA	AAAACCCCTT	TAAAAGTTGC
Llains1367	241	ggatgacttg	gCTCGACTAG	TTACAAGTAG	-CCGCA-TAA	GGTG-GCT-A	TTCACACTA
Clustal Co	207	*****	**** *	*** *****	***** *	* * * * *	** * * *

		310	320	330	340	350	360
Lguy4243	283
Lguy4155	283	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lguy4235	283	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lguy3823	283	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lguy4147	283	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lguytrus4	285	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lguy1bc40	284	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lpan	285	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAAT-ATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lbrazmoro	288	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lbraz2905	288	GATAA-GTGG	TATCAATT-G	CAGAATCATT	CAATT-ACCG	AATCTTT-GA	ACGCAAACGG
Lnaif2773	288	GATAAAGTGG	TATCCATTGC	CAGAATCATT	CAATTTACCG	AATCTTTTGA	ACGCAAACGG
Llains1367	297	A-GCAGAATC	AATTCGGAAT	GTACCGAAAT	CATCTTGAAG	CGCAAACGG	CGCATGGGGA
Clustal Co	255	*****	**** *	***** *	***** *	***** *	***** *

		370	380	390	400	410	420
Lguy4243	339
Lguy4155	339	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lguy4235	339	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATT-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lguy3823	339	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lguy4147	339	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lguytrus4	341	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lguy1bc40	340	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	TTCTCAGT-G
Lpan	340	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lbrazmoro	344	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lbraz2905	344	CGCATGGGAG	AA-GCTCTAT	T-GT-GTCAT	CCCCGT--GC	ATG-CCATAT	T-CTCAGT-G
Lnaif2773	348	C-CATGGGAA	AAAGCTCTAT	TTGTTGTCAT	CCCCGTTTCC	ATTTCCATAT	TTCTCAGTTG
Llains1367	356	GAAGCGTCTA	CTGTGNTGGT	AAATCA-CAC	CGTGCATGGA	CACATAGTGT	ACTCAGTGTN
Clustal Co	308	* *****	** *****	* ** *****	***** *	** *****	* ***** *

		430	440	450	460	470	480
Lguy4243	391
Lguy4155	391	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTCG	-ATATAT-GT
Lguy4235	391	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTCT	-ATATAT-GT
Lguy3823	391	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTCT	-ATATAT-GT
Lguy4147	391	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTCT	-ATATAT-GT
Lguytrus4	393	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTCT	-ATATAT-GT
Lguy1bc40	393	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTCT	-ATATAT-GT
Lpan	392	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTCT	-ATATAT-GT
Lbrazmoro	396	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTAT	-GTATAT-GT
Lbraz2905	396	TCGAACAAAA	AAC--AACA-	CAGCCGC--	---CTCCT-C	TCTTCTCTAT	-ATATAT-GT
Lnaif2773	407	TCGAACAAAA	AAACAAACAA	CAGCCGCTT	CCTTCTCTC	TTCTCTCTCT	TATATATTGT
Llains1367	415	TGTACACGAC	CCAAGACAAC	ACGGCACNCC	TCGCTCGTCT	TCTCGTATAT	ATATGTATGA
Clustal Co	356	* *****	** ****	*****	* * *	* * *****	***** *

		490	500	510	520	530	540
Lguy4243	439	--ATAA-TAT	ATATT---GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lguy4155	439	--ATAA-TAT	ATATT---GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lguy4235	439	--ATAA-TAT	ATATT---GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lguy3823	439	--ATAA-TAT	ATATT---GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lguy4147	439	--ATAA-TAT	ATAT----GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lguytrus4	441	--ATAA-TAT	ATAT----GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lguy1bc40	441	--ATAA-TAT	ATAT----GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lpan	440	--ATAA-TAT	ATAT----GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lbrazmorero	444	--ATAA-TAT	ATAT----GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lbraz2905	444	--ATAA-TAT	ATAT----GT	GGGAGCC---	-AGAGGAGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Lnaif2773	467	TAATAACTAT	ATATTTTGT	GGGAACCCAG	AAGGGAGGGC	GTGTGTTTGT	GTTGTGCGCA
Llains1367	475	TATTATATAT	GGGAGCCAG	AGGACGGCGC	TGTCGGATTG	TGCTTAGTGC	CGCAATATTA
Clustal Co	394	*** **	**** **	***** *	** * **	***** **	***** **

		550	560	570	580	590	600
Lguy4243	490	TATATATATA	TATA--CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAA-T	ACACACCTGC
Lguy4155	490	TATATATATA	TATA--CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAA-T	ACACACCTGC
Lguy4235	490	TATATATATA	TATA--CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAA-T	ACACACCTGC
Lguy3823	490	TATATATATA	TATA--CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAA-T	ACACACCTGC
Lguy4147	489	TATATATATA	TATA--CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAAAT	ACACACCTGC
Lguytrus4	491	TATATATATA	TATATACGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAAAT	ACACACCTGC
Lguy1bc40	491	TATATATATA	TATA--CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAAAT	ACACACCTGC
Lpan	490	TATATATA--	-----CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGCAAAAACT	ACACACCTGC
Lbrazmorero	493	TATATATATA	TATATACGCA	CACGTANACA	NGTCAGAGTT	GGACAAAAAT	ACACACCTGC
Lbraz2905	494	TATATATATA	TATATAGAGA	GAGAGATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAAAT	ACACACCTGC
Lnaif2773	527	TATATATATA	TATA--CGCA	CACGTATACA	AGTCAGAGTT	GGACAAAAAT	ACACACCTGC
Llains1367	535	TAATCGTATA	TATATATACT	GCACACGTAT	AGCAAGTCAG	ACATCGCACA	AAATACACAC
Clustal Co	439	*****	*	* * **	*****	** **** *	*****

		610	620	630	640	650	660
Lguy4243	547	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	GGTGTGGAAA	A-CTCCTC-T	CTGGTGATTG	CAAAGCAGTC
Lguy4155	547	ACTCCCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	A-CTCCTC-T	CTGGTGATTG	CAAAGCAGTC
Lguy4235	547	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	A-CTCCTC-T	CTGGTGATTG	CAAAGCAGTC
Lguy3823	547	ACTCCCTCTT	TCGAGATTTG	CGTGTGGAAA	A---CCTC-T	CTGGTTATTG	CAAAGCAGTC
Lguy4147	547	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	A---CCTC-T	CTGGTGATTG	CAAAGCAGTC
Lguytrus4	551	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	AACTCCTC-T	CTGGTGATTG	CAAAGCAGTC
Lguy1bc40	549	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	A---CCTC-T	CTGGTGATTG	CAAAGCAGTC
Lpan	542	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	AACTCCTC-T	CTGGTGGTTG	CAAAGCAGTC
Lbrazmorero	553	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	AACTCCTC-T	CTGGTGGTTG	CAAAGCAGTC
Lbraz2905	554	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	AACTCCTC-T	CTGGTGGTTG	CAAAGCAGTC
Lnaif2773	585	ACTCTCT-TT	TCGAGATGTG	CGTGTGGAAA	AACTCCTC-T	CTGGTGATTG	CAAAGCAGTC
Llains1367	595	GGACACTTCT	TTTCGAGATG	ATGTGCGGTG	GGAAAAACTC	CTGTATGCTC	GCATCGGCAA
Clustal Co	479	**** * *	***** *	***** **	***** *	***** **	**** * **

		670	680	690	700	710	720
Lguy4243	604	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lguy4155	604	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lguy4235	604	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lguy3823	603	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lguy4147	602	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lguytrus4	609	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lguy1bc40	604	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lpan	600	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCT--C	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lbrazmorero	611	TCTCTCTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lbraz2905	612	TCTCTCTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAGA
Lnaif2773	643	TCT--CTCTC	CTCTCTCCTC	TCTA-TTCTC	TCTTCTCCTC	TCACTTTAAG	AGGGGGGAAA
Llains1367	655	TGCAGTCTCT	CTCTCACTCT	CTCCTCATAC	CTATTCTGTC	TTCTCGGTCT	CACATACTAC
Clustal Co	524	** *****	***** **	***** **	***** *	***** **	***** *

		730	740	750	760	770	780
Lguy4243	661	GGAGAGGTTT	TATATAGAGA	AGAGAGGTGT	G---GGGGGA	GGC-TGTGAC	CAGGATAAAT
Lguy4155	661	GGAGAGGTTT	-ATATAGAGA	AGAGAGGTGT	G---GGGGGA	GGC-TGTGAC	CAGGATAAAT
Lguy4235	661	GGAGAGGTTT	-ATATAGAGA	AGAGAGGTGT	G---GGGGGA	GGC-TGTGAC	CAGGATAAAT
Lguy3823	660	GGAGAGGTTT	TATATAGAGA	AGAGAGGTGT	G---GGGGGA	GGC-TGTGAC	CAGGATAAAT
Lguy4147	659	GGAGAGGTTT	TATATAGAGA	AGAGAGGTGT	G---GGGGGA	GGC-TGTGAC	CAGGATAAAT
Lguytrus4	666	GGAGAGGTTT	TATATAGAGA	AGAGAGGTGT	G---GGGGGA	GGC-TGTGAC	CAGGATAAAT
Lguy1bc40	661	GGAGAGGTTT	TATATAGAGA	AGAGAGGTGT	G---GGGGGA	GGC-TGTGAC	CAGGATAAAT

