

**CARINA ALEXANDRA MARQUES ESTEVES**

**CLONAGEM FUNCIONAL COMO METODOLOGIA NA  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE  
*LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS***

**LISBOA, 2008**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**CLONAGEM FUNCIONAL COMO METODOLOGIA NA  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE  
*LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS***

**CARINA ALEXANDRA MARQUES ESTEVES**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Professora Lenea Campino, Directora da Unidade de Ensino e Investigação de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa.

**LISBOA, 2008**



Este estudo foi realizado na Unidade de Ensino e Investigação de Leishmanioses, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal e no Laboratório “Leishmaniasis I” (AgClos) no “Bernhard-Noth-Institute for Tropical Medicine”, Hamburgo, Alemanha. Foi inserido no projecto financiado pela União Europeia “Control Strategies for Visceral Leishmaniasis (VL) and Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL) in South America: Applications of Molecular Epidemiology” coordenado pelo Doutor Michael Milles, Professor da “London School of Hygiene and Tropical Medicine”, Londres, Reino Unido.



# ÍNDICE

|                                                                        |       |
|------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b>                                                  | XV    |
| <b>APRESENTAÇÕES</b>                                                   | XIX   |
| <b>SUMÁRIO</b>                                                         | XXI   |
| <b>SUMMARY</b>                                                         | XXIII |
| <b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b>                                         | 1     |
| <b>1. Leishmaniose.</b>                                                | 3     |
| <b>2. Epidemiologia.</b>                                               | 4     |
| 2.1. <i>Leishmaniose visceral.</i>                                     | 4     |
| 2.2. <i>Leishmaniose cutânea.</i>                                      | 5     |
| 2.3. <i>Leishmaniose mucocutânea.</i>                                  | 8     |
| <b>3. Leishmaniose tegumentar americana.</b>                           | 8     |
| <b>4. O hospedeiro.</b>                                                | 11    |
| 4.1. <i>Hospedeiro invertebrado: o vector.</i>                         | 11    |
| 4.2. <i>Hospedeiro vertebrado: o reservatório.</i>                     | 11    |
| <b>5. O parasita.</b>                                                  | 12    |
| 5.1. <i>Morfologia.</i>                                                | 12    |
| 5.2. <i>Ciclo de vida.</i>                                             | 14    |
| 5.3. <i>Genoma.</i>                                                    | 15    |
| 5.4. <i>Virulência.</i>                                                | 17    |
| <b>6. Modelo animal.</b>                                               | 19    |
| <b>7. Abordagens genómicas.</b>                                        | 22    |
| <b>8. Objectivo.</b>                                                   | 24    |
| <b>CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS</b>                               | 25    |
| <b>1. Cultura de parasitas.</b>                                        | 27    |
| <b>2. Construção da biblioteca genómica de <i>L. braziliensis</i>.</b> | 27    |

|                                                                                                                                              |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 3. Transfecção e selecção <i>in vitro</i> .                                                                                                  | 28     |
| 4. Selecção de genes de virulência.                                                                                                          | 29     |
| 4.1. Infecção experimental <i>in vivo</i> .                                                                                                  | 29     |
| 4.2. Recolha de material biológico.                                                                                                          | 31     |
| 4.3. Diagnóstico laboratorial.                                                                                                               | 31     |
| 5. Extracção de DNA cosmídico da cultura de <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos [PER104] isolada após passagem em modelo animal. | 32     |
| 6. Transformação de células ultra-competentes com o DNA cosmídico.                                                                           | 32     |
| 7. Electroforese de campo invertido.                                                                                                         | 33     |
| 8. Sequenciação.                                                                                                                             | 34     |
| <br>CAPÍTULO III – RESULTADOS                                                                                                                | <br>37 |
| 1. Selecção <i>in vitro</i> de parasitas recombinantes.                                                                                      | 39     |
| 2. Selecção de virulência <i>in vivo</i> .                                                                                                   | 39     |
| 2.1. Observações clínicas.                                                                                                                   | 39     |
| 2.2. Exame parasitológico cultural.                                                                                                          | 41     |
| 3. Isolamento de DNA cosmídico.                                                                                                              | 43     |
| 4. Análise dos insertos cosmídicos.                                                                                                          | 46     |
| <br>CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO                                                                                                                  | <br>49 |
| <br>CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS                                                                                           | <br>57 |
| <br>CAPÍTULO VI – BIBLIOGRAFIA                                                                                                               | <br>61 |
| <br>CAPÍTULO VII – ANEXOS                                                                                                                    | <br>77 |
| 1. Meios de Cultura.                                                                                                                         | 79     |
| 1.1. Meio de Cultura “Schneider’s insect”.                                                                                                   | 79     |
| 1.2. Meio de Cultura Nicolle, Novy e McNeal.                                                                                                 | 79     |
| 1.3. Meio de Cultura Agar Luria Broth.                                                                                                       | 79     |
| 1.4. Meio de Cultura Luria Broth.                                                                                                            | 80     |
| 2. Padrões de restrição dos clones cosmídicos após electroforese de campo invertido.                                                         | 81     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica de leishmaniose visceral.                                                                                                                                                  | 4  |
| <b>Figura 2</b> – Distribuição geográfica de leishmaniose cutânea.                                                                                                                                                   | 6  |
| <b>Figura 3</b> – “Huacos” peruanos, vasos de cerâmica com reprodução de figuras humanas sadias e mutiladas por diferentes moléstias.                                                                                | 9  |
| <b>Figura 4</b> – Distribuição geográfica de espécies de <i>Leishmania</i> no Perú.                                                                                                                                  | 10 |
| <b>Figura 5</b> – Flebótomo fêmea sobre a pele do hospedeiro vertebrado.                                                                                                                                             | 11 |
| <b>Figura 6</b> – Representação esquemática da forma (A.) promastigota e (B.) amastigota de <i>Leishmania</i> .                                                                                                      | 12 |
| <b>Figura 7</b> – Formas (A.) promastigotas e (B.) amastigotas de <i>Leishmania</i> .                                                                                                                                | 13 |
| <b>Figura 8</b> – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .                                                                                                                                                               | 14 |
| <b>Figura 9</b> – Mapa circular do vector cosmídico pcosTL.                                                                                                                                                          | 28 |
| <b>Figura 10</b> – Condições de alojamento dos animais em estudo no Biotério do IHMT/UNL.                                                                                                                            | 30 |
| <b>Figura 11</b> – 1. Aspecto do nariz de um hamster no qual não foi realizada qualquer inoculação; 2. Hamsters três semanas p.i.                                                                                    | 40 |
| <b>Figura 12</b> – a. Medição da lesão ulcerativa de um hamster com um cutímetro; b. Evolução do diâmetro das lesões ulcerativas nos animais infectados com <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104]. | 40 |
| <b>Figura 13</b> – Hamsters 24 semanas p.i.                                                                                                                                                                          | 41 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 14</b> – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados da população recombinante <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada dos gânglios do animal necropsiado às três semanas p.i.                                                                                                                                     | 43 |
| <b>Figura 15</b> – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados da população recombinante <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada do tecido cutâneo do local de inoculação às 24 semanas p.i.                                                                                                                                 | 44 |
| <b>Figura 16</b> – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados da população recombinante <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada dos gânglios às 24 semanas p.i.                                                                                                                                                             | 45 |
| <b>Figura 17</b> – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados das populações recombinantes <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isoladas às 24 semanas p.i que partilham fragmentos de restrição; comparação dos padrões dos fragmentos de restrição <i>EcoRV/XbaI</i> , usando electroforese de campo invertido.                | 45 |
| <b>Figura 18</b> – Identificação dos cosmídeos isolados das populações recombinantes <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isoladas dos gânglios às a. três e b. 24 semanas p.i que partilham fragmentos de restrição; comparação dos padrões dos fragmentos de restrição <i>EcoRV/XbaI</i> , usando electroforese de campo invertido. | 46 |
| <b>Figura 19</b> - Inseto de DNA genómico de <i>L. braziliensis</i> identificado após sequenciação do cosmídeo dominante pcosLN3-3.                                                                                                                                                                                                                      | 47 |
| <b>Figura 20</b> - Inseto de DNA genómico de <i>L. braziliensis</i> identificado após sequenciação do cosmídeo dominante pcosLN24-1.                                                                                                                                                                                                                     | 47 |
| <b>Figura 21</b> – Padrões dos fragmentos de restrição <i>EcoRV/XbaI</i> dos cosmídeos isolados da população recombinante <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada do tecido cutâneo do local de inoculação três semanas p.i.                                                                                                     | 81 |

**Figura 22** - Padrões dos fragmentos de restrição *EcoRV/XbaI* dos cosmídeos isolados da população recombinante *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada dos gânglios três semanas p.i. 82

**Figura 23** - Padrões dos fragmentos de restrição *EcoRV/XbaI* dos cosmídeos isolados da população recombinante *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada do tecido cutâneo do local de inoculação 24 semanas p.i. 83

**Figura 24** - Padrões dos fragmentos de restrição *EcoRV/XbaI* dos cosmídeos isolados da população recombinante *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada dos gânglios 24 semanas p.i. 84



## ÍNDICE DE QUADROS

|                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> – Principais espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de leishmaniose cutânea no Novo Mundo, principais vectores e reservatórios. | 7  |
| <b>Quadro 2</b> – Condições experimentais da infecção de hamsters dourados.                                                                       | 30 |
| <b>Quadro 3</b> - Reagentes utilizados na restrição do cosmídeo recombinante e respectivos volumes.                                               | 33 |
| <b>Quadro 4</b> – Electroforese de Campo Invertido: Programa multi-fase Kat-M.                                                                    | 34 |
| <b>Quadro 5</b> – Resultados das culturas dos hamsters em estudo, necropsiados três, 12 e 24 semanas p.i.                                         | 42 |



## AGRADECIMENTOS

Tenho tantos nomes na memória que, no final, receio que alguém fique esquecido nestas páginas.

Mestrado... Mais uma etapa, mais um desafio, mais uma pedra no caminho que é a vida! Desenganem-se os que pensam que é fácil... Não é! Como sempre, existem alturas que, por qualquer razão, nos parece que o mundo está contra nós! Porque o que é suposto dar não deu, porque as nossas “amigas” bactérias e leveduras tendem a querer ter uma participação activa no nosso trabalho, porque há uma tese a escrever e falta inspiração. São nessas alturas, em que colocamos tudo em causa, que olhamos à nossa volta e que eu percebi que sou uma das pessoas mais sortudas do planeta!!! ☺

Professora Doutora Lenea Campino, obrigada! À professora devo o início do meu percurso na área da Parasitologia quando me acolheu na Unidade de Leishmanioses para realização da tese de licenciatura. A si, devo a oportunidade de ter participado num projecto internacional, e de nele, poder ter continuado o meu trabalho, apresentado-o agora nesta tese de mestrado. Obrigada por toda a sua orientação na realização deste trabalho, por todos os conhecimentos científicos que me transmitiu e por todas as oportunidades de valorização e formação científica que me proporcionou.

Doutor Joachim Clos, do “Bernhard-Noth-Institute for Tropical Medicine”, “vielen dank”! Por ter permitido a minha “passagem” pelo seu laboratório e de, juntamente com a Andrea, ter partilhado comigo um pouco do seu vasto conhecimento sobre clonagem funcional e genética de *Leishmania*. Andrea, obrigada pela constante disponibilidade “on line”, por todas as dúvidas esclarecidas e por todos os conhecimentos transmitidos na área da clonagem funcional, imprescindíveis à realização desta tese! Não posso deixar de referir os técnicos, Manfred e Doro, e os estudantes de doutoramento, Mareike e Gabi, e de mestrado, Andreas, que me acolheram de braços abertos no grupo de investigação e, que de uma ou outra forma, me transmitiram um pouco da cultura alemã! “Kickers”!

À minha chefinha, eleita pela minha pessoa, “vice-orientadora” (se é que existe), que, apesar que feito “atchim... E puf, apareceu o Gui”, foi uma pessoa muito importante na realização deste mestrado! Chefinha, muito obrigada, por todos os conhecimentos que me transmitiste com toda a calma, e por toda a paciência que tiveste para com esta tua “escrava de bancada”. Obrigada pela co-correcção desta tese!

Carla Maia, a veterinária “de serviço”. Sim, sem ela as experiências *in vivo* teriam sido bem mais complicadas. Nem quero imaginar! Pobres animais nas minhas mãos e pobre da minha pessoa com eles nas mãos... Pensemos positivo, desta vez foi sem desmaios! Obrigada Carla, por todo o apoio prestado nas necrópsias dos animais e fora delas!

E depois... O que posso dizer? A Unidade contava já com alguns membros que, de alguma maneira, deixaram a sua marca! Doutor Nuno Rolão, futuras Doutoradas Sofia Cortes, Carla Maia, Olívia Rodrigues e, a longo prazo, Cláudia Marques, Mestre Mónica Nunes, licenciadas Marta Clemente e Ana Farinha (“escrava mestranda”) e ex-escravos Mónica, Sofia e Manel: OBRIGADA! Pelos sorrisos, pelas lágrimas, pelas gargalhadas e pelos atrofios! Pelos almoços, pelos TGIFs e pelas “stouts”! Pelas danças e pelas caminhadas! Por serem quem são e existirem na minha vida! Por se terem tornado na minha “Leish family”...

Sr. João, tome juízo! Zé Manel, força!!! O Zé Manel consegue!!! D. Arminda. Obrigada a todos pelo apoio prestado.

E apesar do pouco tempo que sobra para “eventos sociais” com pessoas extra-laboratório e porque tenho a imensa sorte de ter pessoas que me olham como quem diz: “Não percebo nada do que estás para aí a dizer! Mas continua a falar que um dia talvez te entenda!”

Obrigada Tanase, Anita e Leo, por todo o apoio e amizade (faculdade também não é fácil!!! São muitas noites sem dormir!) e pelas pouquíssimas tardes ao sol de Sesimbra.

Obrigada Dupla! Sempre me ouviste, quando não resolvias “baldar-te” ao ginásio! Sempre me apoiaste sem nunca perceber muito bem o que andava eu a fazer. E sempre me desencaminhaste para um gelado ou um café quando já ia longa a noite!

Lu! Mesmo a 1500 km de distância, não te cansas de me “bater na tola”? “Y porque no estas escribindo?” Obrigada, amiga!

Pita, Ru... Obrigada por terem estado sempre lá!

Miguel, o livrinho para crianças está pronto! Tinhas razão, acabou por ser mais fácil! Também porque... “Pára! Não olhes para o computador! Explica-me! Vês, até sabes! Agora escreve o que me acabaste de dizer!” Obrigada...

Aos MELHORES pais do mundo, os meus! Muito obrigada, D. Benvinda e Sr. Joaquim, por... Por... Por... Por serem os meus melhores amigos! Por acreditarem em mim e sempre me apoiarem! Por mesmo com lágrimas nos olhos me verem partir e, com lágrimas nos olhos me verem chegar.

E... A todos os outros que me esqueci!

A todos simplesmente,

OBRIGADA!



## APRESENTAÇÕES

### Apresentações relacionadas com o presente estudo:

- Cortes S., **Esteves C.**, Rolão N., Maia C., Campino L. Comparative virulence of *L. braziliensis* and *L. peruviana* strains and hybrids in animal experimental infection. *4<sup>th</sup> World Congress on Leishmaniasis 2009*, Lucknow, Índia, 3-7 de Fevereiro de 2009. (Submetido).
- **Esteves C.**, Nühs A., Cortes S., Maia C., Campino L., Clos J. Screening for Virulence Factors of *Leishmania braziliensis*. *4<sup>th</sup> World Congress on Leishmaniasis 2009*, Lucknow, Índia, 3-7 de Fevereiro de 2009. (Submetido).
- **Esteves C.** Functional Cloning as a tool for the identification of Virulence Markers of *L. (V.) braziliensis*. *Aula no módulo de leishmanioses no âmbito do VIII curso de mestrado em parasitologia médica*, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Portugal. 20 de Maio de 2008.
- **Esteves C.** Functional Cloning as a tool for the identification of Virulence Markers of *L. (V.) braziliensis*. *Journal Club Sessions*, Bernhard-Noth-Institute for Tropical Medicine, Hamburgo, Alemanha. 4 de Fevereiro de 2008.



## SUMÁRIO

*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *L. (V.) peruviana* são duas espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *braziliensis*, caracterizadas por causar diferentes quadros clínicos. Em estudos anteriores de infecção experimental em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), os parasitas de *L. braziliensis* causaram o aparecimento de lesões ulcerativas logo após a inoculação, enquanto que, os parasitas de *L. peruviana* apresentaram ligeiros sinais de infecção numa fase mais tardia da infecção. As infecções provocadas pelas estirpes híbridas de *L. braziliensis* e *L. peruviana* mostraram sinais evidentes de infecção sugerindo que a virulência é uma característica dominante.

Diversas tecnologias têm sido utilizadas na identificação dos caracteres genéticos da virulência em *Leishmania*. No nosso estudo, pesquisámos características no genoma de *L. braziliensis* que poderão estar associadas à virulência da estirpe, recorrendo ao método de clonagem funcional. Construiu-se uma população híbrida artificial, transfectando-se uma biblioteca de DNA genómico de *L. braziliensis* em parasitas de *L. peruviana*. A população de parasitas recombinantes de *L. peruviana*, possuindo vários fragmentos diferentes do DNA genómico de *L. braziliensis* foi sujeita a selecção *in vivo*, sendo inoculada em hamsters dourados e monitorizada semanalmente a evolução clínica dos animais até às 24 semanas.

As populações de parasitas recombinantes isoladas dos hamsters, três e 24 semanas após a infecção revelaram grande homogeneidade, observando-se a presença de dois clones cosmídicos em grande parte das populações (56% na população isolada às três semanas após a infecção a partir do gânglio e 65,2 e 86% nas populações isoladas às 24 semanas após a infecção a partir do tecido cutâneo do local de inoculação e dos gânglios, respectivamente). Os clones cosmídicos identificados possuem segmentos comuns aos cromossomas seis e 26 de *L. braziliensis*. Dos segmentos identificados, apenas um gene possui informação na base de dados de *L. braziliensis* como codificante para uma ATP-NAD-cinase.

Estes resultados sugerem que os possíveis genes identificados poderão desempenhar um importante papel na virulência e patogenicidade de *Leishmania*, podendo constituir novos alvos de pesquisa no desenvolvimento de candidatos terapêuticos e vacinas anti-*Leishmania*.



## SUMMARY

*Leishmania Viannia braziliensis* and *L. (V.) peruviana* are two species of the *Leishmania braziliensis* complex, characterized by causing very different pathogenicities. In previous studies of golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) experimental infections, *L. braziliensis* parasites cause ulcerative lesions early after inoculation while *L. peruviana* parasites present late lesions with slight clinical signs. Infections caused by *L. braziliensis* and *L. peruviana* hybrid strains showed clear signs of infection suggesting that virulence is a dominant characteristic.

Several approaches have been used in the identification of virulence genetic characters in *Leishmania*. In our study, we searched characteristics in *L. braziliensis* genome which may be associated to virulence by applying the method of functional cloning. We created an artificial hybrid population, by transfecting *L. peruviana* parasites with the DNA of a *L. braziliensis* genomic DNA library. The population of *L. peruviana* parasites, possessing several different fragments of *L. braziliensis* DNA was subjected to *in vivo* selection, through inoculation in hamsters and the clinical evolution of the animals followed weekly, for 24 weeks.

Recombinant parasite populations isolated from hamsters at three and 24 weeks post-infection, showed great homogeneity, having observed the presence of two cosmid clones in almost all the populations (56% in the population isolated from the lymph nodes at three weeks post-infection and 65,2% and 86% in the population isolated from the cutaneous tissue of the inoculation site and from the lymph nodes at 24 weeks post-infection). The cosmid clones identified possess segments from chromosome six and 26 of *L. braziliensis*. From the identified segments, just one gene has information in *L. braziliensis* database codifying for an ATP-NAD-kinase.

These results suggest that the hypothetic genes identified could have an important role in *Leishmania*'s virulence and pathogenicity, being new targets for research in the development of anti-*Leishmania* therapies and vaccines.



## CAPITULO I

---

### INTRODUÇÃO



## 1. Leishmaniose.

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários intracelulares flagelados do género *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae. É transmitida através da picada de insectos hematófagos da família Psychodidae, géneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo<sup>1</sup>, e *Lutzomyia* no Novo Mundo<sup>2</sup> (Desjeux, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose afecta cerca de 350 milhões de indivíduos em todo o Mundo, com uma incidência anual de novos casos estimada em 1,5 milhões dos quais 0,5 milhões são devidos à leishmaniose visceral e 1 milhão à leishmaniose cutânea. Esta parasitose encontra-se geográfica e ecologicamente distribuída, com um carácter focalizado, pelos quatro continentes, Europa, África, Ásia e América (Dedet & Pratlong, 2003). Contudo, o maior factor que determina o tropismo e a patologia da infecção por *Leishmania* é a espécie de *Leishmania* (Herwaldt, 1999; Murray *et al.*, 2005).

Em muitos países, o aumento de factores de risco, como as alterações ecológicas e demográficas (desflorestação, migração massiva ou urbanização), a ausência ou ineficácia de programas de controlo, o aumento do número de casos de co-infecção *Leishmania*/HIV ou a resistência dos parasitas a fármacos, fazem da leishmaniose um grande problema para a Saúde Pública (Dedet, 2002).

Desde a descoberta do parasita, tem-se observado um aumento do número de espécies, contando-se actualmente com mais de 20 espécies patogénicas para o Homem. A sua grande homogeneidade estrutural, independentemente do seu estadio biológico, e a semelhança morfológica impedem a identificação das espécies com base neste tipo de características. Inicialmente, a caracterização das espécies era baseada em factores extrínsecos, nomeadamente, na distribuição geográfica, padrões clínicos, características epidemiológicas, reservatórios, comportamento nos vectores e ciclo de vida do parasita. Posteriormente, surgiram novos métodos de identificação, baseados em características intrínsecas ao parasita. Actualmente, a tipagem isoenzimática é o método de identificação mais utilizado e universalmente aceite para a caracterização subgenérica e de sub-espécie de *Leishmania*. Esta técnica, baseia-se na mobilidade electroforética de isoenzimas do parasita e origina grupos com

---

<sup>1</sup> Termo generalizado que define o Mundo conhecido pelos europeus até ao séc. XV, ou seja, os continentes europeu, africano e asiático e ilhas adjacentes.

<sup>2</sup> Designação atribuída ao continente americano pelos europeus na época do seu descobrimento.

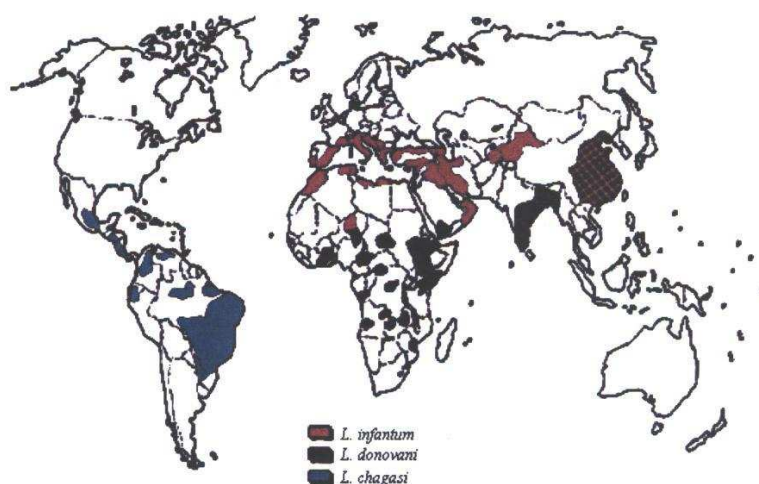
perfis isoenzimáticos diferentes a que se dá o nome de zimodemos. O reagrupamento de estirpes de *Leishmania* em zimodemos, assinalados como unidades taxonómicas operacionais, permite o cálculo de índices de similaridade e proximidade filogenéticas. Estas técnicas vieram complementar os factores extrínsecos e ajudar numa melhor e mais exacta classificação taxonómica. De acordo com a classificação actual, o género *Leishmania* inclui dois subgéneros, o subgénero *Leishmania* (L.) Safjanova, 1982, presente no Velho Mundo e o subgénero *Viannia* (V.) Laison & Shaw, 1987, presente no Novo Mundo.

## 2. Epidemiologia.

Em todos os países da Europa Meridional, Ásia Ocidental e China Oriental, bem como, nos continentes africano e americano existem diferentes espécies viscerotrópicas e dermatrópicas de *Leishmania*. Dependendo das inúmeras e complexas interacções entre o parasita e o hospedeiro, tais como, as características virulentas do parasita e a resposta imune por ele provocada, são conhecidas diferentes formas clínicas da doença, nomeadamente, leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea (Alvar *et al.*, 1997; Dedet, 2000).

### 2.1. Leishmaniose visceral.

As principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose visceral são *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo (Figura 1). De acordo com a espécie de *Leishmania*, a transmissão pode ser antroponótica ou zoonótica.



**Figura 1** – Distribuição geográfica de leishmaniose visceral (adaptado de Manson-Bahr & Bell, 1991).

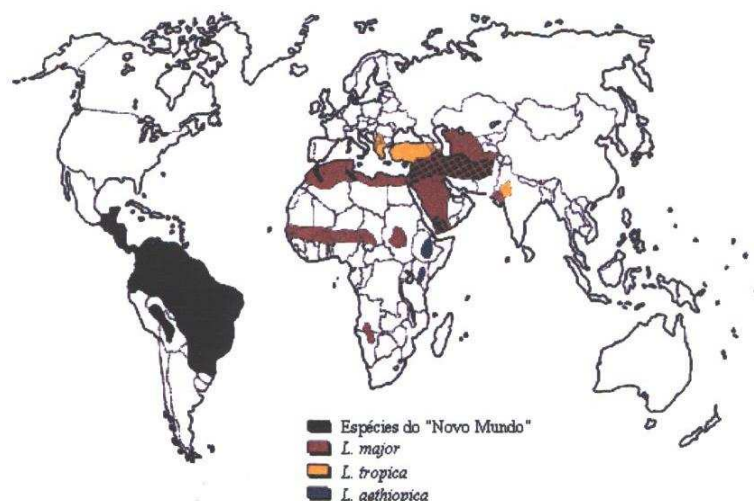
*L. donovani*, uma espécie de *Leishmania* de transmissão antroponótica, possui como vector *Phlebotomus* spp. Esta espécie é responsável pela forma visceral da leishmaniose na Índia, em algumas regiões da China e em diferentes países do continente africano, como o Sudão, a Somália ou a Etiópia. Na Bacia Mediterrânica, na Ásia Ocidental, na China Oriental e no Norte de África, a leishmaniose visceral é, geralmente, uma zoonose causada pela espécie *L. infantum*. Nestes casos, o principal reservatório do parasita é o cão; no entanto, está também descrito que a infecção pode ocorrer em cães selvagens no Médio Oriente, raposas no Sul da Europa (Abranches *et al.*, 1986) e Norte de África (Manson-Bahr & Bell, 1991), e chacais na Ásia (Hamidi *et al.*, 1982). Esta espécie tem como principais vectores nos países do sudoeste europeu, *Phlebotomus perniciosus* e *Ph. ariasi* (Pires, 1984).

*L. chagasi* é a espécie causadora de leishmaniose visceral no Novo Mundo. A maior área endémica situa-se no Nordeste Brasileiro, onde a transmissão pelo vector *Lutzomia longipalpis* é rural e peridoméstica. Estudos enzimáticos de isolados de pacientes infectados com leishmaniose visceral nas Honduras, não conseguiram distinguir *L. chagasi* e *L. infantum* (Lanotte, 1975). Estudos genéticos realizados posteriormente revelaram que *L. chagasi* e *L. infantum* correspondem à mesma espécie (Maurício *et al.*, 2000, 2001; Kuhls *et al.*, 2005, 2007).

Na leishmaniose visceral o parasita invade as células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente o baço, o fígado, a medula e os gânglios linfáticos. Clinicamente, é caracterizada pela presença de febre, hepatoesplenomegalia, hiperproteinemia e palidez mucocutânea. A anemia e a leucopenia são parâmetros biológicos frequentes. A evolução da doença é progressiva, podendo ser fatal caso não seja tratada; os indivíduos que sobrevivem adquirem imunidade que pode, no entanto, ser transitória (Botish & Cheng, 1998).

## 2.2. Leishmaniose cutânea.

As principais espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea no Velho Mundo são *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*. *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi* são espécies responsáveis pela forma cutânea de leishmaniose no Novo Mundo (Figura 2).



**Figura 2** – Distribuição geográfica de leishmaniose cutânea (adaptado de Manson-Bahr & Bell, 1991).

No Velho Mundo, a forma cutânea da leishmaniose pode ser uma zoonose ou uma antroponose dependendo da espécie causadora. *L. major* é uma espécie de transmissão zoonótica cujo vector principal é *Ph. papatasi*. Esta é responsável por esta forma da doença em países no Norte de África, Médio Oriente e Península Arábica. A leishmaniose causada por *L. tropica* é considerada uma antroponose na Bacia Mediterrânea e tem como principal vector *Ph. sergenti*.

Pela sua prevalência e mau prognóstico de algumas formas clínicas, *L. braziliensis* é a espécie mais importante presente no Novo Mundo. É endêmica em países da América Central e do Sul, onde a sua transmissão ocorre através de diferentes vectores, tais como, *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia* (Desjeux, 1992; Killick-Kendrick, 2002; Dedet & Pratlong, 2003; Gontijo & Carvalho, 2003). *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. panamensis* são igualmente reponsáveis pela forma cutânea na América Central e do Sul. Em alguns países da América do Sul é encontrada *L. guyanensis*. No Brasil encontram-se também *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. lainsoni*. Para além de *L. lainsoni*, *L. peruviana* é também responsável pela leishmaniose cutânea no Perú. Uma grande variedade de animais domésticos e selvagens são descritos como principais reservatórios destas espécies (Quadro 1).

Clinicamente, a leishmaniose cutânea apresenta diversas características, podendo apresentar-se sob duas formas principais: leishmaniose cutânea localizada e leishmaniose cutânea difusa.

Na leishmaniose cutânea localizada, a evolução da doença é caracterizada pela existência de um nódulo local provavelmente provocado pela picada do insecto vector, que ulcera e cura espontaneamente, originando cicatrizes indeléveis e despigmentação da pele. No entanto, em

situações de epidemia, a doença tende a ser mais grave, com lesões múltiplas que podem provocar cicatrizes desfigurantes. O período de incubação varia entre uma a duas semanas até vários meses ou mesmo anos (Botish & Cheng, 1998).

A leishmaniose cutânea difusa é uma forma rara e de cura difícil. Pode ser encontrada em doentes infectados com *L. amazonensis* e, mais raramente, *L. aethiopica*. É caracterizada por uma não ulceração das lesões iniciais, mas, após um período de meses ou anos, dissemina-se através da corrente sanguínea para outros locais da pele, principalmente membros e face, produzindo nódulos isolados que contêm no seu interior macrófagos infectados; estes podem confluir, formando placas que podem causar lesões deformantes. Esta forma de doença progride ao longo de muitos anos sendo rara a cura espontânea.

**Quadro 1** – Principais espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose cutânea no Novo Mundo, principais vectores e reservatórios (Desjeux, 1992; Killick-Kendrick, 2002; Dedet & Pratlong, 2003; Gontijo & Carvalho, 2003).

| Espécies                     | Principais vectores        | Reservatórios                                          |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>L. (L.) mexicana</i>      | <i>Lu. olmeca</i>          | Roedores, Canídeos                                     |
| <i>L. (L.) amazonensis</i>   | <i>Lu. flaviscutellata</i> | Roedores, Marsupiais                                   |
|                              | <i>Lu. olmeca</i>          |                                                        |
| <i>L. (L.) venezuelensis</i> | <i>Lu. rangelliana</i>     | Equinos, Felinos                                       |
| <i>L. (V.) peruviana</i>     | <i>Lu. peruensis</i>       | Canídeos, Roedores                                     |
|                              | <i>Lu. verrucarum</i>      |                                                        |
| <i>L. (V.) lainsoni</i>      | <i>Lu. ubiquitalis</i>     | Roedores                                               |
|                              | <i>Lu. ayrozai</i>         |                                                        |
| <i>L. (V.) naiffi</i>        | <i>Lu. paraensis</i>       | Desdentados                                            |
|                              | <i>Lu. squamiventris</i>   |                                                        |
| <i>L. (V.) shawi</i>         | <i>Lu. whitmani</i>        | Primatas, Preguiças                                    |
|                              | <i>Lu. umbratilis</i>      |                                                        |
| <i>L. (V.) guyanensis</i>    | <i>Lu. anduzei</i>         | Preguiças, Roedores, Marsupiais                        |
|                              | <i>Lu. whitmani</i>        |                                                        |
|                              | <i>Lu. panamensis</i>      |                                                        |
| <i>L. (V.) panamensis</i>    | <i>Lu. trapidoi</i>        | Preguiças, Primatas, Marsupiais,<br>Roedores, Canídeos |
|                              | <i>Lu. gomezi</i>          |                                                        |
|                              | <i>Lu. wellcomei</i>       |                                                        |
| <i>L. (V.) braziliensis</i>  | <i>Lu. whitmani</i>        | Canídeos, Equinos, Roedores                            |
|                              | <i>Lu. intermedia</i>      |                                                        |

### 2.3. *Leishmaniose mucocutânea.*

Referidas como espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea, os parasitas *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e, principalmente, *L. braziliensis*, podem causar também uma forma mais agressiva da doença, a forma mucocutânea. Esta forma clínica é característica do Novo Mundo sendo de transmissão zoonótica.

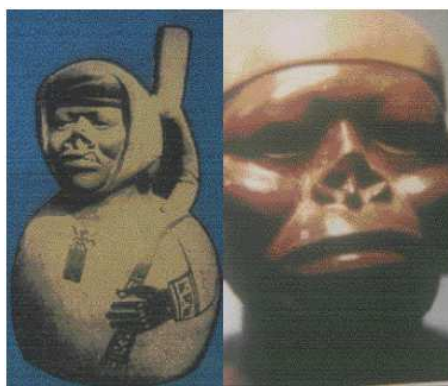
Clinicamente, a leishmaniose mucocutânea evolui em dois estadios sucessivos. O primeiro, muito semelhante à fase cutânea localizada, é caracterizado por um nódulo local que ulcera e cura espontaneamente. O segundo estado provoca lesões mais agressivas, sendo caracterizado por apresentar uma imunidade celular exarcebada e causar lesões graves como a destruição total ou parcial das mucosas membranares das cavidades oronasais e faríngeas por metastização secundária (Dedet & Pratlong, 2003).

### 3. **Leishmaniose tegumentar americana.**

Em 1925, a leishmaniose tegumentar americana foi definida como sendo a forma clínica que causa lesões cutâneas e mucocutâneas de diversas morfologias, permitindo a sua distinção da forma visceral da leishmaniose (Vale & Furtado, 2005).

Estudos biológicos e etno-históricos (Figura 3) revelaram que a leishmaniose tegumentar surgiu na Amazônia em tempos arqueológicos disseminando-se, mais tarde, em direcção às regiões de florestas altas e à região andina, mantendo-se a endemia durante o império inca e o período de colonização espanhola, devido ao fluxo humano de migração (Vale & Furtado, 2005).

As primeiras descrições clínicas da doença datam do século XVI, durante a época da conquista espanhola. Estas descrevem a leishmaniose como uma doença que afectava os indígenas numa das encostas da cordilheira dos Andes e em vales quentes e húmidos, destruindo-lhes as cavidades nasais. Em 1764 e em 1777, foi identificado o papel dos flebótomos na transmissão da leishmaniose. A leishmaniose é então descrita como uma doença corrosiva localizada, especialmente, na cara, de cura difícil e originada por um insecto (revisto por Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004).



**Figura 3** – “Huacos” peruanos: vasos de cerâmica com reprodução de figuras humanas saudáveis e mutiladas por diferentes moléstias (Adaptado de Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004).

Em 1910, a terapia com antimonialis é sugerida como uma terapia eficaz no tratamento da leishmaniose no Brasil e em 1911, é diagnosticada a forma mucocutânea de doença e obtendo-se culturas positivas a partir de lesões das mucosas. Neste mesmo ano, foi proposta a denominação de *Leishmania braziliensis* para o agente específico causador de leishmaniose tegumentar, diferenciando-a de *L. tropica*. Em 1977, um grupo de investigadores caracterizou como *L. braziliensis* spp. uma cultura isolada de um paciente peruano com a forma mucocutânea da doença. Em 1985, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram identificadas como os agentes causadores da forma mucocutânea da leishmaniose (revisto por Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004).

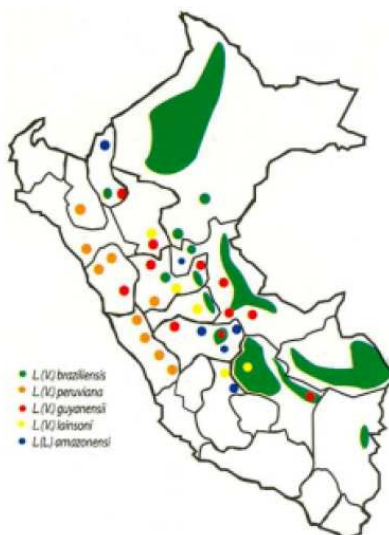
Actualmente, a leishmaniose tegumentar americana ocorre no continente americano, desde o Sul dos Estados Unidos até ao Norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com excepção do Uruguai e do Chile.

Mundialmente, do total de casos de leishmaniose cutânea registados, 90% ocorrem em seis países sendo dois do Novo Mundo, Brasil e Perú (revisto por Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004; Vale & Furtado, 2005) onde as espécies prevalentes pertencem ao subgénero *Viannia*, como a *L. braziliensis* (Davies *et al.*, 2000).

A incidência de leishmaniose tegumentar americana no Brasil tem aumentado nos últimos 20 anos em praticamente todos os estados. Têm ocorridos surtos epidémicos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazónica, relacionados com o processo da colonização (Vale & Furtado, 2005).

Até ao momento, seis espécies de *Leishmania*, pertencentes ao subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, foram identificadas no Brasil como causadoras de leishmaniose tegumentar humana: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis*.

No Perú, a leishmaniose é a segunda epidemia tropical existente neste país. A zona endêmica compreende cerca de 74% da área total do país (Davies *et al.*, 2000; revisto por Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004). Até este momento foram identificadas cinco espécies de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* (Figura 4).



**Figura 4** – Distribuição geográfica de espécies de *Leishmania* no Perú (Adaptado de Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004).

A importância da leishmaniose tanto no Brasil como no Perú constitui uma epidemia do tipo tropical que produz um impacto negativo social e económico na população economicamente deprimida. As sequelas destrutivas que origina, particularmente a forma mucocutânea, provocam graves prejuízos físicos e psicológicos no indivíduo, provocando na maioria das vezes o seu afastamento da sociedade.

## 4. O hospedeiro.

### 4.1. Hospedeiro invertebrado: o vector.

A transmissão do parasita *Leishmania* ocorre através de um díptero da família Psychodidae do género *Phlebotomus* no Velho Mundo e do género *Lutzomia* no Novo Mundo.

Os flebótomos são insectos pequenos de 2 – 3 mm, caracterizados por asas estreitas e erectas, corpo delgado, patas compridas, olhos negros e mandíbulas longas (Sládová, 1999) (Figura 5).



**Figura 5** – Flebótomo fêmea sobre a pele do hospedeiro vertebrado (In: <http://whippetp.no.sapo.pt/imagens/Leishmaniose7.jpg>).

Os machos e as fêmeas alimentam-se de néctares de plantas, mas apenas as fêmeas são hematófagas, uma vez que necessitam de refeições sanguíneas para a maturação dos seus ovos (Sládová, 1999). A saliva infectada possui substâncias que provocam um efeito vasodilatador, que dificultam a agregação plaquetária e, como consequência, impedem a formação do coágulo (Theodos, 1991).

Os flebotomos não são insectos voadores exímios. A distância de voo é limitada a umas escassas dezenas de metros, pelo que o hospedeiro tem de invadir ou viver próximo do habitat do vector para ser infectado (Strauss-Alyali & Baneth, 2001). A picada é normalmente restrita a períodos nocturnos e crepusculares em dias quentes e pouco ventosos.

### 4.2. Hospedeiro vertebrado: o reservatório.

De acordo com Ashford (1996), são considerados reservatórios as várias espécies de mamíferos responsáveis pela manutenção, a longo prazo, de parasitas na natureza. A maioria das leishmanioses são zoonoses de animais silváticos ou domésticos. O Homem apenas é infectado acidentalmente quando exposto ao ciclo natural de transmissão.

Os reservatórios de leishmaniose visceral são, na sua maioria, canídeos (cães e raposas). Originariamente, a leishmaniose visceral era uma zoonose de animais silváticos. A partir do momento em que o Homem e o cão invadiram as zonas endémicas para caçar, e os animais

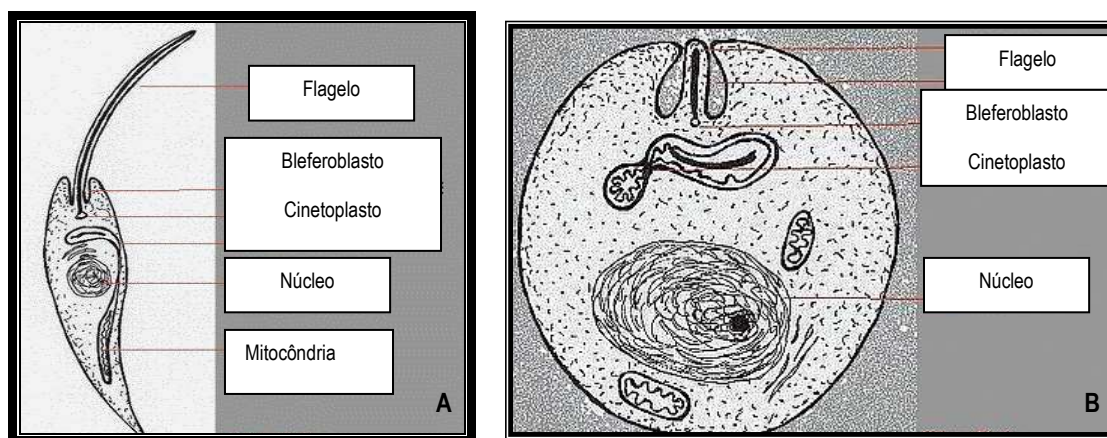
silváticos entraram nos povoados à procura de alimento, o cão tornou-se o reservatório doméstico das espécies que causam leishmaniose visceral humana. A doença no cão tem uma evolução crónica que favorece a transmissão ao Homem (Abranches *et al.*, 1998).

No Novo Mundo, uma grande variedade de animais domésticos e selvagens são descritos como reservatórios das espécies dermatrópicas (Quadro 1). Cavalos, cães e roedores são considerados os principais reservatórios de *L. braziliensis*. As preguiças, os primatas e os roedores são os reservatórios das espécies *L. guyanensis* e *L. panamensis*. Os primatas e os marsupiais são também reservatórios de *L. panamensis*. Roedores e marsupiais são os reservatórios de *L. amazonensis*. Na região dos Andes, Perú, México e Argentina, o cão e alguns roedores são os reservatórios de *L. peruviana* e *L. mexicana* (revisto por Sanchez-Saldaña *et al.*, 2004). No Brasil, os primatas e as preguiças são os reservatórios de *L. shawi* e, os desdentados, de *L. naiffi*. Na Venezuela, os cavalos e os gatos são os reservatórios de *L. venezuelensis* (Gontijo & Carvalho, 2003).

## 5. O parasita.

### 5.1. Morfologia.

*Leishmania* é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae que ao longo do seu ciclo biológico se apresenta sob duas formas distintas: a forma amastigota, não flagelada, no insecto vector, e a forma promastigota, flagelada, no hospedeiro (Figura 6).



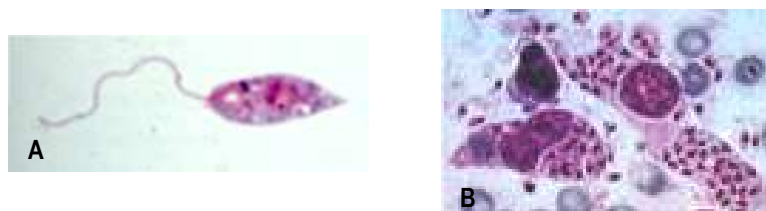
**Figura 6** – Representação esquemática da forma (A.) promastigota e (B.) amastigota de *Leishmania*. (In: [http://www.leishmania.it/?page\\_id=6](http://www.leishmania.it/?page_id=6)).

Os promastigotas são formas móveis, cujo desenvolvimento ocorre no tubo digestivo do vector podendo também ser encontrados em culturas *in vitro*. Medem aproximadamente 10 – 20  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 – 3,0  $\mu\text{m}$  de largura. Possuem um núcleo central e um cinetoplasto, estrutura que contém grande quantidade de DNA e que prolonga a única mitocôndria celular, associado ao corpo basal do qual é originado um flagelo que emerge livremente na extremidade anterior da célula dando-lhe mobilidade (Figura 6.A.).

No decorrer do processo de desenvolvimento, o parasita na forma promastigota multiplica-se extracelularmente podendo ser observadas duas formas distintas: os promastigotas procíclicos, com formas curtas e elipsóides, normalmente maiores que as formas amastigotas, e os promastigotas metacíclicos, de corpo mais alongado e estreito com um longo flagelo, duas a três vezes mais comprido que o corpo celular e que lhe confere grande mobilidade. Aparentemente, esta forma constitui a fase final do desenvolvimento sequencial do promastigota que ocorre no vector e aquele que é inoculado no hospedeiro.

Os amastigotas são formas esféricas ou ovóides. Medem aproximadamente 2,5 – 6,8  $\mu\text{m}$  de comprimento, possuem um flagelo localizado intracelularmente e vivem em células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado (Figura 6.B.).

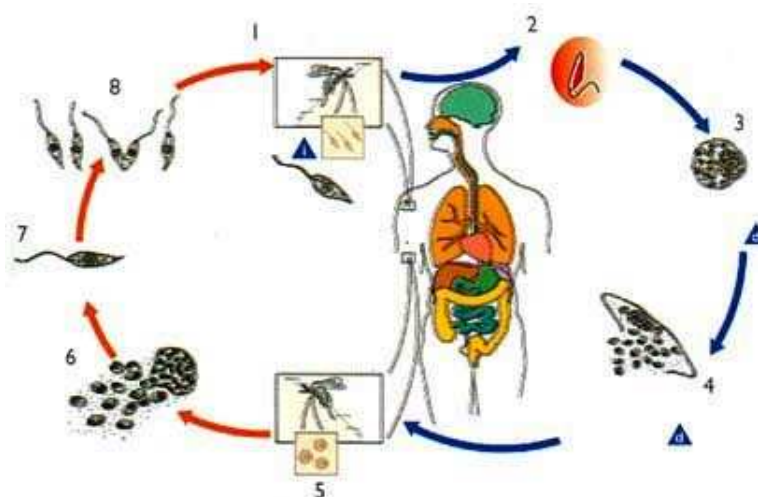
Em preparações coradas pelo do método de Giemsa distingue-se o citoplasma azul pálido, limitado por uma membrana. Neste são observados dois organelos corados de vermelho: o núcleo e o cinetoplasto, em posição anterior relativamente ao núcleo e mais pequeno e em forma de bastonete (Figura 7).



**Figura 7** – Formas (A.) promastigotas e (B.) amastigotas de *Leishmania* (In: <http://143.106.62.16/administrativo/departamentos/parasitologia/departamento/imagens/prancha2.doc>)

### 5.2. Ciclo de vida.

O ciclo de vida do parasita (Figura 8) no vector é um processo complexo que envolve alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas. Trata-se de um processo semelhante para todas as espécies de *Leishmania*.



**Figura 8** – Ciclo de vida de *Leishmania*. O vector inocula o promastigota no hospedeiro vertebrado (1,2). Os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos, transformando-se em amastigotas (3). Estes multiplicam-se no interior das células infectadas, que ao lisarem permitem que estes invadam células de outros tecidos (4). O insecto fica infectado ao ingerir macrófagos com amastigotas durante a refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado (5,6). No tubo digestivo do vector, o parasita diferencia-se em promastigota (7), que se multiplica, completando-se o ciclo com a introdução dos promastigotas infecciosos no hospedeiro vertebrado pelo vector (adaptado de Sánchez-Saldña *et al.*, 2004).

O ciclo começa quando a fêmea flebotomínea efectua a refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo macrófagos infectados com amastigotas existentes na pele ou no sangue periférico. Os parasitas ingeridos passam directamente para o intestino médio do vector onde são envolvidos pela membrana peritrófica. Esta membrana encontra-se completamente formada 24h após a ingestão do sangue e, em resposta ao estímulo sanguíneo, protege o epitélio do intestino do conteúdo da refeição sanguínea (Blackburn *et al.*, 1988). Com o progredir da digestão, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas. Primeiramente no estado não infeccioso, os promastigotas procíclicos transformam-se em promastigotas longos designados nectomonas. A membrana peritrófica começa então a desintegrar-se, libertando os promastigotas livres para o intestino posterior, no caso dos flébotomos vectores do subgénero *Viannia*, ou para o intestino médio, no caso dos flébotomos vectores do subgénero *Leishmania*.

As formas nectomonas fixam-se ao epitélio intestinal através do flagelo, dando-se início a uma fase de multiplicação logarítmica em que os parasitas não são infecciosos (Sacks & Perkins, 1984). Após quatro a cinco dias da ingestão, estas formas transformam-se em promastigotas metacíclicos infecciosos. Cerca de nove dias depois estes migram para a zona proximal do tubo digestivo (válvula estomodeal), prontos a serem inoculados no hospedeiro vertebrado durante a próxima refeição sanguínea. O flebotomo-fêmea ao proceder à sua refeição sanguínea inocula no hospedeiro os promastigotas metacíclicos (Lambson & Barker, 2002). Estes são depositados na derme do hospedeiro juntamente com a saliva do vector sendo rapidamente fagocitados pelos macrófagos.

Os promastigotas metacíclicos fagocitados pelos macrófagos da pele, transformam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão longitudinal binária. A membrana dos macrófagos sofre uma ruptura provocando a libertação dos amastigotas que são fagocitados por outros macrófagos (Lambson & Barker, 2002). Os parasitas fagocitados podem permanecer no tecido subcutâneo, dando origem às formas clínicas de leishmaniose cutânea, ou invadir as células do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, fígado, medula, gânglios linfáticos e outros órgãos linfóides (Bryceson, 1996), causando leishmaniose visceral. Se a infecção for bem sucedida, o ciclo completa-se quando o vector faz uma nova refeição sanguínea, ingerindo macrófagos infectados (Bogitsh & Cheng, 1998). O ciclo pode ter uma duração de quatro a 17 dias após a refeição sanguínea, dependendo da espécie de *Leishmania* (Molyneux & Killick-Kendrick, 1987).

### 5.3. Genoma.

O parasita *Leishmania* possui dois genomas, um representado pelo DNA nuclear e o outro pelo DNA cinetoplastideal.

Com base no projecto de sequenciação do genoma de *Leishmania*, os cariótipos de *L. major* e *L. infantum* possuem 36 cromossomas, e o cariótipo de *L. braziliensis* 35 cromossomas (Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007). Cada cromossoma possui uma região central de sequências conservadas de baixo número de cópias e longas sequências repetitivas teloméricas e sub-teloméricas.

O cinetoplasto contém uma importante quantidade de DNA que consiste num disco microscopicamente visível com 1 – 2 µm de diâmetro, contendo aproximadamente 10<sup>7</sup> pares de

bases de DNA mitocondrial. Este é constituído por 50 – 100 maxicírculos que possuem genes que codificam para proteínas mitocondriais e RNA ribossomal (rRNA), e aproximadamente  $10^4$  a  $2 \times 10^4$  minicírculos.

A função dos minicírculos foi desconhecida durante muitos anos. Aparentemente, nenhuma das suas sequências conhecidas contém um perfil conservado característico de codificação “open reading frame” (ORF). Apesar de não aparentarem possuir qualquer função codificante de proteínas, alguns minicírculos são transcritos em cadeias de RNA (Roher *et al.*, 1987). Sturm & Simpson (1999) sugeriram que uma das principais funções dos minicírculos é a codificação de “RNA guia” (gRNA), cadeias de RNA indispensáveis para a edição do RNA mensageiro (mRNA), um mecanismo essencial para a expressão dos genes mitocôndriais dos tripanossomatídeos denominado edição de RNA (revisto por Sloof & Benne, 1993). Pensa-se que a função do mecanismo de edição de RNA é a produção de diferentes cadeias de mRNA em diferentes situações envolventes, podendo ser visto como um mecanismo primitivo de alteração da expressão génica. Esta hipótese é suportada pelo facto de os tripanossomatídeos serem organismos eucariotas unicelulares muito antigos, que desde muito cedo divergiram da linha evolutiva que conduziu às plantas e aos animais, e por se considerar que as próprias mitocôndrias contêm um sistema genético primitivo (Sollner-Webb, 1991).

Apesar dos parasitas *Leishmania* apresentarem uma propagação clonal, a recombinação genética pode ocorrer, reforçando a hipótese de existência, embora rara, de reprodução sexual nestes parasitas (Tibayrenc & Ayala, 1999). A ocorrência de estirpes híbridas de diferentes espécies de *Leishmania* tem sido descrita em diferentes regiões endémicas, ocorrendo essencialmente entre espécies geneticamente próximas. No Velho Mundo, foi descrita a presença de híbridos entre as espécies *L. major* e *L. arabica*. No Novo Mundo, têm sido observados híbridos de *L. braziliensis* e *L. panamensis* isolados a partir do hospedeiro humano na Nicarágua (Noyes *et al.*, 1996) e híbridos de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* na Venezuela. No Perú foram também isolados híbridos em casos humanos de *L. braziliensis* e *L. peruviana* (Dujardin *et al.*, 1993). Mais recentemente, foi descrita a existência, em Portugal, de estirpes híbridas entre duas espécies filogenética e epidemiologicamente distantes, *L. major* e *L. infantum* (Ravel *et al.*, 2006).

#### 5.4. Virulência.

O estabelecimento de infecções parasitárias é um processo complexo determinado pela interacção de múltiplos factores relacionados com o hospedeiro e o parasita. Um desses factores está relacionado com o grau de virulência do parasita. Define-se virulência como o grau de patogenecidade de um microrganismo geneticamente dotado com essa capacidade, manifestada através da invasão de tecidos do hospedeiro com o sistema imunitário intacto sob condições normais, multiplicação e produção de efeitos tóxicos (Chang *et al.*, 2003).

Assim, as manifestações clínicas da leishmaniose resultam, por um lado, dos determinantes invasivos do parasita, nomeadamente das moléculas de superfície e intracelulares, que são um pré-requisito para a virulência de *Leishmania*, e, dos determinantes imunitários do hospedeiro (Chang, 1993). A evolução da infecção depende da capacidade do hospedeiro a reagir a esses determinantes (Sádlová, 1999).

A virulência é característica de cada espécie de *Leishmania* (Semprevivo *et al.*, 1981; Nollan & Herman, 1985). De acordo com Chang (1993), os agentes causativos das formas clínicas viscerais são geralmente considerados mais virulentos que os das formas cutâneas, provocando uma doença potencialmente fatal nos hospedeiros mais susceptíveis.

Por outro lado, infecções experimentais caninas, anteriormente realizadas, têm admitido que as formas amastigotas são mais virulentas que as formas promastigotas de cultura (Abranches *et al.*, 1991; Campino *et al.*, 2000). Segundo Semprevivo *et al.* (1981), apenas passagens por hospedeiros vertebrados ou passagens alternativas através de culturas e hospedeiro podem originar parasitas *Leishmania* que sofreram transformações morfológicas e fisiológicas semelhantes às que ocorrem no seu ciclo de vida natural.

Na inoculação experimental com as formas promastigotas de cultura *in vitro* é muito importante atender às condições físico-químicas de crescimento dos parasitas e à fase da curva de crescimento utilizada para inoculação (Giannini, 1974). Apenas as formas promastigotas do tipo metacíclico, existentes em maior proporção na fase estacionária de crescimento, são infecciosas para o hospedeiro vertebrado (Almeida *et al.*, 1993; Bates & Tetley, 1993; Bates *et al.*, 1997).

Das moléculas parasitárias identificadas como responsáveis pela virulência, a glicoproteína de 63 kDa (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG), são consideradas as mais importantes. Localizadas na

membrana citoplasmática estão implicadas na activação da fracção C3 do complemento, actuando na fase crucial da interacção parasita-hospedeiro, estimulam a ligação ao macrófago e a sua protecção dentro dos fagolisossomas, influenciando ainda a migração dos monócitos (Sádlová, 1999).

A gp63 é uma das proteínas mais abundantes da superfície da membrana celular de *Leishmania*, quer na forma promastigota, quer na forma amastigota, embora nesta se apresente em menor quantidade (Bahr *et al.*, 1993). A expressão da gp63 é mais intensa quando os promastigotas de cultura entram na fase estacionária de crescimento, sendo mais infecciosos, como foi verificado com *L. braziliensis* (Kweider *et al.*, 1987, Murray *et al.*, 1990, Ramamoorthy *et al.*, 1992). Nas formas promastigotas atenuadas de *L. major*, *L. mexicana* e *L. infantum* MON-1 a expressão da gp63 é reduzida, o que não acontece nas formas promastigotas virulentas das mesmas espécies (Chaudhuri *et al.*, 1989; Santos-Gomes, 1995).

O LPG é um glicoconjugado componente da superfície do parasita, que está presente com abundância em todos os estadios dos promastigotas, especialmente na fase metacíclica. Contudo, os promastigotas mantidos *in vitro* durante períodos de tempo relativamente longos, apresentam diminuição da quantidade de LPG expressa à superfície celular (Sacks *et al.*, 1990; Killick-Kendrick & Rioux, 1991). O LPG favorece a ligação do parasita ao epitélio do intestino médio do vector (Killick-Kendrick & Rioux, 1991; Pimenta *et al.*, 1991, 1994) e a interacção parasita-macrófago, contribuindo para a inibição da actividade macrofágica (Handman & Goding, 1985; Chang & Chaudhuri, 1990). Este glicoconjugado parece também estar implicado na inibição da resposta linfoproliferativa e na activação das células T supressoras do hospedeiro (Turco, 1988). As formas amastigotas geralmente não expressam LPG, com excepção da espécie *L. major*. Contudo, LPG dos amastigotas *L. major* apresentam-se estrutural e antigenicamente diferente do LPG dos promastigotas (Moody, 1993).

Outros autores também consideram importantes, em relação à virulência, algumas proteínas de choque térmico como o Hsp 100 (Hübel *et al.*, 1997, Reiling *et al.*, 2006) e a Hsp 70 (Kantengwa *et al.*, 1995).

Genes específicos de espécies de *Leishmania* podem também desempenhar um importante papel na virulência e patologia da infecção por este parasita (Zhang *et al.*, 2008). Ghedin *et al.* (1997) identificaram genes associados à visceralização da infecção pelo parasita *Leishmania*. Os genes identificados encontram-se presente no genoma de espécies de *Leishmania* que causam a forma visceral, como *L. infantum* e *L. donovani*, mas, não se encontra presente na maioria dos

genomas de espécies responsáveis por leishmaniose cutânea, incluindo os genomas de *L. major* e *L. tropica*.

Para além dos determinantes de virulência mencionados, outros factores, não relacionados directamente com o parasita ou com o hospedeiro também intervêm no estabelecimento da infecção. É o caso da saliva do vector que parece desempenhar um papel relevante na capacidade infecciosa do parasita. Segundo Titus & Ribeiro (1988), a saliva do vector contém substâncias farmacologicamente activas que aumentam a infecciosidade das formas promastigotas de *Leishmania*. Estas substâncias são dotadas de propriedades fisiopatológicas que intervêm localmente na coagulação do sangue e na imunidade. Em relação à coagulação, têm um efeito anti-agregação plaquetária e promovem a vasodilatação. Adicionalmente, interferem ao nível da imunidade, inibindo a produção do interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), a proliferação celular e a apresentação antigénica, facilitando a infecção do hospedeiro.

## **6. Modelo animal.**

As principais funções da infecção experimental de leishmaniose em modelo animal são: (1.) a manutenção *in vivo* de estirpes virulentas do parasita, (2.) a possibilidade do estudo da patogénese e da resposta imunológica, e (3.) a avaliação da eficácia de novos fármacos. Espera-se, ainda, que os modelos simulem as características patológicas e imunológicas das infecções naturais.

A evolução da infecção experimental em diferentes animais de laboratório está dependente de uma série de factores, nomeadamente, da espécie de *Leishmania*, da virulência do parasita, do inóculo (forma e número de parasitas) e da via de inoculação. A condição de susceptibilidade ou de resistência em cada animal é controlada por factores genéticos próprios do animal, mas também esta associada à espécie de *Leishmania* (Hommel *et al.*, 1995).

A maior diferença entre as infecções naturais e experimentais está relacionada com o inóculo do parasita. Em condições naturais, o flebótomo inocula entre dez e 100 promastigotas metacíclicos na derme do hospedeiro, enquanto que nas infecções experimentais são geralmente inoculados milhões de promastigotas de cultura ou amastigotas recuperados de animais infectados. Alguns estudos têm sido realizados nos quais se procura uma aproximação à infecção natural, procedendo-se à inoculação de menor número de promastigotas após purificação das formas

metacíclicas (Belkaid *et al.*, 1998; Compton & Farrell, 2002), ou mesmo a inoculação de parasitas juntamente com extractos salivares do vector (Titus & Ribeiro, 1988; Samuelson *et al.*, 1991; Theodos *et al.*, 1991; Warburg *et al.*, 1994; Lima & Titus, 1996). Também a via de inoculação utilizada tem influência na evolução da infecção, sendo frequentemente utilizadas em infecções experimentais as vias intradérmica, subcutânea, intracardíaca, intraperitonal e endovenosa (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Nabors *et al.*, 1995; Leclercq *et al.*, 1996; Wilson & Weinstock, 1996; Bories *et al.*, 1998; Melby *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2003; Rolão, 2004; Rolão *et al.*, 2004).

Primatas, cães, murganhos e hamsters têm sido utilizados como modelos experimentais de leishmaniose (Hommel *et al.*, 1995).

O murganho (*Mus musculus*) é o modelo mais utilizado no estudo da leishmaniose. As principais vantagens deste modelo são: (1.) permitir uma fácil manipulação e acomodação dos animais; (2.) permitir trabalhar com estirpes “inbred”, reduzindo as variações genéticas entre animais do mesmo grupo experimental; (3.) possibilitar a manipulação genética, criando estirpes resistentes ou susceptíveis à infecção, ou mesmo estirpes “knock-out” (KO) para determinados genes; (4.) disponibilidade de um elevado número de reagentes imunológicos comercializados.

A maioria dos estudos efectuados neste modelo representam infecções experimentais com *L. major*, por este modelo apresentar fenótipos de infecção característicos e reprodutíveis. A infecção por *L. major* tem sido estudada por vários autores e tem contribuído fortemente para o conhecimento mais aprofundado da leishmaniose, nomeadamente dos mecanismos adoptados pelo parasita para a invasão do hospedeiro e o tipo de resposta imunitária desenvolvida por hospedeiros susceptíveis e resistentes (Liew & O'Donnell, 1993; Reiner & Locksley, 1995; Launois *et al.*, 1998).

Apesar de *L. major* ser a espécie mais estudada em modelo murino, o estudo das restantes espécies de *Leishmania* não tem sido negligenciado. Estudos de infecção experimental de *L. braziliensis* em BALB/c revelaram o desenvolvimento de pequenas lesões que cicatrizaram sem recurso a fármacos (DeKrey *et al.*, 1998). Contrastando com a aparente baixa virulência de *L. braziliensis*, estudos com parasitas pertencentes ao complexo de *L. mexicana* revelaram elevado grau de virulência, semelhante ao observado nos estudos realizados com *L. major*. Por exemplo, tanto os parasitas *L. major* como *L. amazonensis* produzem lesões progressivas incuráveis em

infecção em murganhos BALC/c (Almeida *et al.*, 1996; Guevara-Mendoza *et al.*, 1997). Contudo, a infecção experimental de *L. major* em murganhos C57BL/10 produz lesões que cicatrizam naturalmente ao contrário da infecção com parasitas *L. amazonensis* na qual se observou pequenas lesões não curáveis (Afonso & Scott, 1993).

Apesar de nunca terem sido encontrados naturalmente infectados, os hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) constituem um modelo laboratorial muito utilizado em infecções experimentais por espécies de *Leishmania* do subgénero *Viannia*, nomeadamente, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Rey *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1991). Vários trabalhos mostraram que os hamsters apresentam elevada susceptibilidade à infecção por espécies viscerotrópicas de *Leishmania*, seja por *L. donovani* (Duarte *et al.*, 1988; Gifawesen & Farrell, 1989; Ghose *et al.*, 1999), seja por *L. infantum* (Santos-Gomes, 1995; Bories *et al.*, 1998; Requena *et al.*, 2000; Riça-Capela *et al.*, 2003). Neste modelo, observa-se caracteristicamente uma associação entre parasitismo elevado, títulos elevados de anticorpos e ausência de respostas linfoproliferativas (Evans *et al.*, 1990; Requena *et al.*, 2000; Melby *et al.*, 2001; Riça-Capela *et al.*, 2003).

A utilização de hamsters no estudo de leishmaniose é vantajosa por os animais serem de fácil criação e manutenção num biotério, constituindo, de acordo com alguns autores, o único modelo animal de porte pequeno que desenvolve a doença de um modo semelhante à observada em humanos (Kaye, 2002; Requena *et al.*, 2000). Pensa-se que a susceptibilidade à infecção nestes animais é devida a uma deficiência na fase efectora da resposta imune, nomeadamente uma deficiente indução da óxido sintase induzível (iNOS). É possível que o promotor do gene do hamster que codifica a iNOS tenha características estruturais semelhantes ao da iNOS humana, tornando-a menos susceptível à activação pelo IFN- $\gamma$  (Melby *et al.*, 2001).

Contudo o estabelecimento de um modelo experimental com hamsters é dificultado pelo baixo número de imunoreagentes disponíveis no mercado e pela imprevisibilidade da infecção. Em estudos com hamsters infectados com número variável de promastigotas de *L. infantum* (Requena *et al.*, 2000) verificaram a existência de uma correlação entre a quantidade de parasitas inoculados, os sinais clínicos e os parâmetros imunológicos. Contudo, alguns animais desenvolveram infecções subclínicas, mantendo-se assintomáticos, enquanto que outros, inoculados com igual número de parasitas, desenvolveram infecções sintomáticas, com sinais imunológicos e clínicos evidentes.

Os hamsters são, ainda, muito utilizados para a manutenção *in vivo* de estirpes virulentas de *Leishmania*.

### 7. Abordagens genómicas.

Nos últimos anos, diversas metodologias genéticas foram desenvolvidas permitindo, nos nossos dias, a manipulação e análise do genoma de tripanossomatídeos, nomeadamente do genoma de *Leishmania* (Clayton, 1999; Swindle & Tait, 1996). As novas metodologias incluem diferentes vectores de expressão, marcadores de selecção positiva e de selecção negativa, genes reporteres, métodos para substituição do gene e complementação funcional, e transposições baseados em mutagénesis (Cruz *et al.*, 1991; LeBowitz *et al.*, 1992, 1993; Ryan *et al.*, 1993; Ha *et al.*, 1996; Gueiros-Filho & Beverley, 1997; Roy *et al.*, 2000; Tosi & Beverly, 2000; Augusto *et al.*, 2004; Denise *et al.*, 2004).

A existência de novos métodos e estratégias para a avaliação genética dos tripanossomatídeos e a sua importância médica fizeram com que a OMS/Programa Especial para Pesquisa e Treino em Doenças Tropicais propusessem um projecto de colaboração entre os diversos grupos de pesquisa com o objectivo de sequenciar por completo o genoma de *Leishmania*. A estirpe de *Leishmania* escolhida como referência para o projecto foi *L. major* Friedlin, cuja sequenciação já se encontra completa (Ivens *et al.*, 2005). Tanto o genoma de *L. infantum* como o genoma de *L. braziliensis* também já se encontram sequenciados (Peacock *et al.*, 2007).

Um estudo piloto no qual foi realizada a comparação entre os genomas de *L. major* e de *L. braziliensis*, revelou a existência de diferenças entre eles (Laurentino *et al.*, 2004), demonstrando a enorme relevância que a análise funcional e comparativa dos genomas das diferentes espécies de *Leishmania*, responsáveis por diferentes patologias, pode ter na identificação das diferenças genéticas (Zhang *et al.*, 2008).

Devido ao elevado número de genes cuja função é ainda desconhecida tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos que permitem o conhecimento da função do gene. Redes de investigadores estão a ser estabelecidas para a análise pós-genómica dos genomas de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. Estes estudos incluem o uso de sequenciação em larga escala e construção de bases de dados, análise de “microarrays”,

transcritomas, proteomas e a continuação do desenvolvimento de novas metodologias para a genética reversa e inversa (Beverley, 2003).

O uso de bibliotecas genómicas, utilizando vectores cosmídicos, tornou-se numa metodologia bastante vantajosa na identificação de genes em *Leishmania*. Uma biblioteca genómica a partir de um clone de *Leishmania* com a característica desejada é usada, após amplificação, para transfectar um clone que não possui essa característica. Posteriormente, a população parasitária recombinante é sujeita a um processo de selecção para a característica desejada (Clos & Choudhury, 2006).

A vantagem deste método está relacionada com a fácil recuperação e identificação do gene ou genes responsáveis pela característica em estudo. Os episomas cosmídicos ou plasmídicos existentes numa população recombinante de *Leishmania* podem ser isolados através de lise alcalina, muito semelhante ao isolamento de plasmídeos ou cosmídeos em *Escherichia coli*. O DNA isolado pode ser utilizado na transformação de estirpes laboratoriais de *E.coli*.

A caracterização dos cosmídeos é feita por hidrólise com enzimas de restrição e electroforese de campo invertido. De acordo com os padrões de fragmentos obtidos, os clones cosmídicos são agrupados em protótipos, e a sua prevalência relativa é estudada. Representantes dos protótipos são parcialmente sequenciados em ambos os sentidos do inserto de DNA genómico. Por alinhamento com as sequências de *Leishmania* constantes nas bases de dados, o *loci* do gene incluído no cosmídeo é sujeito a mapeamento génico.

As bibliotecas genómicas que utilizam como vectores os cosmídeos são preferíveis relativamente às “tradicionais” bibliotecas de cDNA usados em outros modelos eucarióticos devido a várias razões: (1) o elevado conteúdo GC existente nos genes de *Leishmania* dificulta a função da transcriptase reversa tornando-se um obstáculo para a geração de moléculas de cDNA; (2) os genes de *Leishmania* possuem falta de intrões tornando-se suficientemente compactos para serem clonados como DNA genómico; (3) a presença de longos insertos de DNA genómico num cosmídeo permite o estudo da função do gene no seu contexto genómico natural, incluindo as sequências reguladoras flanqueantes; (4) nos cosmídeos, o genoma completo de *Leishmania* pode estar representado em 2000 clones sem qualquer influência da abundância de mRNA existente (Clos & Choudhury, 2006).

## 8. Objectivo.

O objectivo principal do presente estudo foi a identificação de potenciais marcadores de virulência da espécie *L. (V.) braziliensis*, utilizando como metodologia, a clonagem funcional.

## **CAPITULO II**

---

### **MATERIAL E MÉTODOS**



A clonagem funcional ou complementação genética é, actualmente, um método muito utilizado na análise da virulência de microrganismos. Em *Leishmania* spp. a utilização desta metodologia permite a manutenção estável de epissomas de bibliotecas genómicas em cosmídeos. Este método permite não só a selecção de genes que medeiam características específicas como também a elucidação da função dos vários genes.

A construção da biblioteca genómica de *L. braziliensis*, a transfecção e a selecção *in vitro* foram efectuados no “Bernhard-Notch-Institute for Tropical Medicine”, Hamburgo, Alemanha, no âmbito de um estágio de aprendizagem desta tecnologia sob a orientação do Doutor Joachim Clos.

### **1. Cultura de parasitas.**

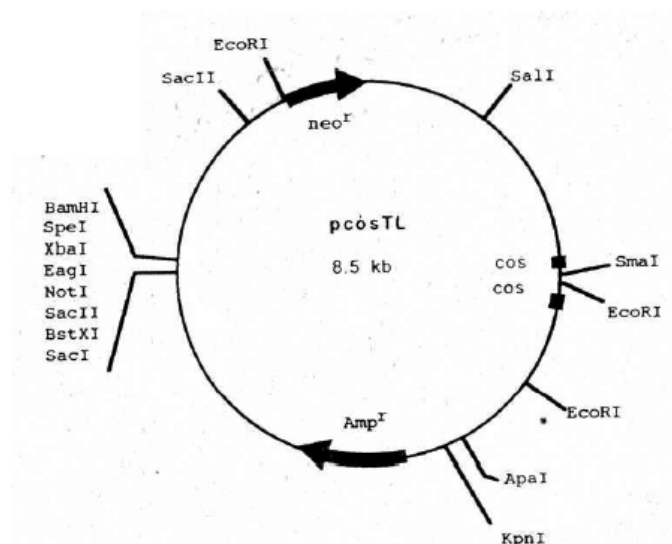
Neste estudo foi utilizado um clone (clone 2) da estirpe *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* LC2452 como estirpe dadora da biblioteca genómica e o clone 5 da estirpe *L. (V.) peruviana* LC2434 como receptor. Ambos os clones, são provenientes do criobanco da “London School of Hygiene and Tropical Medicine”, tendo sido gentilmente cedidos pela Doutora Isabel Maurício.

Os parasitas foram cultivados em meio líquido “Schneider’s Insect” (Sigma, St. Louis, USA) (anexo 1), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FCS) (BioWhittaker, Walkersville, USA) previamente inactivado a 56°C. As culturas foram incubadas em estufa refrigerada a 24°C ± 1°C (W.C. Hearaeus GmbH, Hanau Alemanha), procedendo-se duas vezes por semana, à adição do meio de cultura para obtenção da concentração parasitária desejada (10<sup>7</sup> promastigotas/ml). Todo o processamento de culturas foi efectuado em câmara de fluxo laminar (ADS Laminair, França).

### **2. Construção da biblioteca genómica de *L. braziliensis***

A construção de uma biblioteca genómica de DNA de *Leishmania* no vector cosmídico pcosTL (Figura 9) foi anteriormente descrita por Hoyer *et al.* (2001). Resumindo, a biblioteca genómica de *L. braziliensis* foi preparada por restrição enzimática do vector cosmídico pcosTL com a endonuclease *Sma*I (New England Biolabs, Ipswich, USA) para separação dos locais cos, extremidades coesivas de  $\lambda$ , existentes no vector cosmídico e com a endonuclease *Bam*HI (New England Biolabs), cuja sequência de reconhecimento é 5' ... G<sup>↓</sup>GATCC ... 3', para posterior ligação com os produtos da hidrólise do DNA genómico da estirpe de *L. braziliensis* LC2452 clone 2 resultantes da restrição parcial com a enzima *Sau*3AI (New England Biolabs), com

sequência de reconhecimento 5' ...  $\downarrow$ GATC ... 3'. Após, a inserção dos segmentos de genoma de *L. braziliensis* no vector cosmídico pcosTL, usando o kit "Gigapack Gold II" (Stratagene, La Jolla, USA), a complexidade da biblioteca foi testada e a biblioteca foi amplificada e conservada a -80°C.



**Figura 9** – Mapa circular do vector cosmídico pcosTL (8,5 kb). O vector foi construído a partir dos plasmídeos pBcos2 e Ptgap. As sequências flaqueantes gGADPH de *Trypanosoma cruzi*, localizadas em ambos os lados do gene *neo<sup>r</sup>* asseguram a expressão de RNA funcional que permite ao vector conferir resistência às células transfectadas ao antibiótico G418 (adaptado de Kelly *et al.*, 1994).

### 3. Transfecção e selecção *in vitro*.

A transfecção dos parasitas de *Leishmania*, isto é, a inserção de DNA genómico de *L. braziliensis* em parasitas de *L. peruviana*, foi efectuada como anteriormente descrita por Krobisch *et al.* (1998). Resumidamente, os promastigotas foram colectados no final da fase logarítmica de crescimento, lavados duas vezes em solução de tampão fosfato (PBS) (Sigma) a 4°C, uma vez em tampão de electroporação a 4°C e suspensos em tampão de electroporação de modo a obter uma concentração final de  $1 \times 10^7$  promastigotas/ml. Numa cuvete de electroporação previamente arrefecida, o DNA circular (biblioteca de *L. braziliensis*) foi adicionado a 400  $\mu$ l de cultura de *L. peruviana* LC2434 clone 5. A mistura foi imediatamente sujeita a electroporação utilizando um aparelho "Bio-Rad Gene Pulser" (Bio-Rad, Hercules, USA). A transfecção do DNA foi efectuada com três pulsos a 3,750 V/cm e 25  $\mu$ F numa cuvete de electroporação de 4 mm. A transfecção de *Leishmania* controlo negativo foi efectuada de forma idêntica, mas sem a adição da biblioteca de *L. braziliensis*, de modo a obter estirpes para

selecção do antibiótico. Após a electroporação, os parasitas foram mantidos em gelo durante 10 minutos antes de serem transferidos para 10 ml de meio de cultura “Schneider’s insect” suplementado com 10% de FCS. O antibiótico de selecção genética G418 (GIBCO, Invitrogen Corporation, Reino Unido) foi adicionado 24 horas após a electroporação, para selecção dos parasitas de *L. peruviana* recombinantes.

O número de células transfectadas obtido foi determinado por electroporação através da técnica de diluição limite. Resumidamente, 24 horas após a realização da electroporação, as células resultantes de uma electroporação, foram centrifugadas (centrífuga 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e ressuspensas em 2 ml de meio “Schneider’s Insect” suplementado com 10% FCS ao qual previamente foi adicionado G418. Numa microplaca de 96 poços de fundo em U (Nunc, Roskilde, Alemanha) distribuíram-se 100 µl de meio “Schneider’s Insect”, 10% FCS e G418, por poço. Em seguida foram distribuídos 100 µl da suspensão celular por cada poço da primeira coluna da microplaca contendo o meio. Das suspensões celulares da primeira coluna da microplaca foram retirados 100 µl e colocados nos poços da coluna seguinte, repetindo este procedimento até à última coluna, desprezando o último volume. Após a morte das células existentes na cultura de *Leishmania* controlo negativo, procedeu-se à determinação do número total de células transfectadas por electroporação.

#### **4. Selecção de genes de virulência.**

##### *4.1. Infecção experimental in vivo.*

Neste estudo utilizou-se como modelo animal o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*). Foram utilizados sete hamsters machos com 14 semanas de vida. Os animais foram individualmente alojados em caixas Mac tipo II (490 cm<sup>2</sup> x 18 cm) com cama de farelo de milho em atmosfera ventilada com condições de humidade e temperatura controladas, 60 ± 15 % e de 22 ± 1°C, respectivamente e ciclo luz/escuro 12:12 (Figura 10). Diariamente foram fornecidas comida e água *ad libitum*. A experiência teve a duração de 24 semanas.

Todos os animais utilizados foram criados e mantidos no Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) / Universidade Nova de Lisboa (UNL) de acordo com as Boas Práticas de Bem-estar Animal aprovado pela Comissão de Ética do IHMT/UNL e seguiram as recomendações da Legislação Portuguesa de Protecção dos Animais Utilizados para Fins Experimentais (portaria 1005/92 de 23 de Outubro).



**Figura 10** – Condições de alojamento dos animais em estudo no Biotério do IHMT/UNL.

Os parasitas recombinantes resultantes da transfecção foram cultivados em meio “Schneider’s insect” suplementado com 10% de FCS ao qual foi adicionado geneticina G418 para uma concentração final de 50 µg/ml. O pH do meio foi ajustado a 5,5 utilizando ácido clorídrico (HCl) 1M (Sigma) de modo a obter promastigotas metacíclicos, a forma infecciosa do parasita. As formas metacíclicas são caracterizadas por possuírem corpo pequeno e estreito e, um flagelo duas a três vezes superior ao tamanho de corpo (Almeida *et al.*, 1993; Bates & Tetley, 1993; Zakai *et al.*, 1998). A concentração de parasitas foi determinada por contagem, em duplicado, dos promastigotas metacíclicos em hemacitómetro de Neubauer (Sigma) ao microscópio óptico (Olympus CH2, USA).

Foi efectuada a inoculação de  $2 \times 10^7$  promastigotas metacíclicos dos parasitas recombinantes, via intradérmica, no nariz dos animais num volume total de inóculo de 50µl (Quadro 2). A inoculação foi efectuada após tranquilização dos hamsters com xilasina (Rompun®, Bayer, Canadá) e anestesia geral com quetamina (Imalgene®, Rhône Merieux, Toulouse, França) por via intraperitoneal.

**Quadro 2** – Condições experimentais da infecção de hamsters dourados.

| População Recombinante                                     | Número de Animais Infectados | Inóculo                             | Local de Inoculação |
|------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| <i>L. braziliensis</i> LC2452cl4 TF[13] (2)<br>pcosTL      | 2                            | 2 x 10 <sup>7</sup> prom /<br>50 µl | Nariz               |
| <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[14] (2)<br>pcosTL         | 2                            |                                     |                     |
| <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7)<br>pcos[PER104] | 3                            |                                     |                     |

Semanalmente, procedeu-se à observação clínica de todos os animais, registando-se eventuais sinais de doença, nomeadamente, edema, úlcera e outras lesões no local de inoculação. O diâmetro das lesões foi medido com um cutímetro (Cienceware, USA), de precisão 0,01 mm. Mensalmente procedeu-se à pesagem de todos os animais em estudo.

#### *4.2. Recolha de material biológico.*

Às três e 24 semanas após a inoculação (p.i.), efectuou-se a necrópsia de três animais e às 12 semanas p.i. a necrópsia de um animal, dos quais foram recolhidas amostras de diferentes tecidos para detecção do parasita. Os hamsters foram eutanasiados via intraperitoneal com pentobarbital de sódio (Eutasil®, Bayer).

A observação clínica dos animais bem como as necrópsias foram realizadas com a colaboração de uma médica veterinária da UEI de Leishmanioses, IHMT/UNL, a Dra. Carla Maia.

#### *4.3. Diagnóstico laboratorial.*

O diagnóstico laboratorial da infecção realizou-se através de exame parasitológico cultural efectuado a partir do material biológico recolhido. Apesar de este ser um método moroso, é um método útil no isolamento de parasitas.

Pequenos fragmentos de tecido, aproximadamente de 25 a 50 mg, recolhidos durante a necrópsia (baço, fígado, gânglios regionais, tecido cutâneo do local de inoculação (nariz)) foram lavados em soro fisiológico a 0,9 % (v/v) (Merck, Darmstad, Alemanha) contendo penicilina G sódica (600 U/ml) (Labesfal, Campo de Besteiros, Portugal) e macerados por fricção em rede metálica para separação das células. Adicionou-se aproximadamente 1 ml de meio “Schneider’s Insect” suplementado com FCS e ao qual foi previamente adicionado antibiótico geneticina G418 na concentração de 50 µg/ml e inoculou-se em meio de cultura bifásico Nicolle, Novy e MacNeal (NNN) (anexo 1), utilizado para o isolamento de parasitas *Leishmania*.

A medula óssea foi retirada do interior do fémur com uma agulha de 25 G montada em seringa com meio “Schneider’s Insect” suplementado com 10% de FCS e com o antibiótico G418. A suspensão celular foi homogeneizada e inoculada em meio NNN.

As culturas foram incubadas em estufa refrigerada a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Semanalmente, foram observadas ao microscópico óptico e transferidas para novo meio de cultura. As culturas negativas foram mantidas durante quatro semanas antes de serem abandonadas.

Os parasitas recombinantes de *Leishmania* foram isolados do meio de cultura NNN e transferidos para meio “Schneider’s Insect” suplementado com FCS e G418. As culturas em meio líquido foram observadas duas vezes por semana e foi acrescentado meio de cultura de modo a obter-se a concentração parasitária desejada para as diferentes populações de *Leishmania*.

### **5. Extracção do DNA cosmídico da cultura de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada após passagem em modelo animal.**

O DNA cosmídico foi isolado dos parasitas de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolados após passagem em modelo animal. Procedeu-se à lise alcalina, de acordo com o protocolo de maxi-preparações de DNA plasmídico (Sambrook *et al.*, 1989). A exposição da suspensão celular a um detergente fortemente aniónico a elevado pH rompe a parede celular, desnatura o DNA cromossómico e as proteínas libertando o DNA cosmídico para o sobrenadante. Após a extracção por fenol (Merck) / clorofórmio (Merck) / álcool isoamílico (Merck) (25:24:1), o DNA cosmídico foi precipitado com isopropanol (Sigma), lavado uma vez em etanol 70% (Sigma) e dissolvido em tampão TE (Tris- HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

### **6. Transformação de células ultra-competentes com o DNA cosmídico.**

Aproximadamente 100 ng de DNA cosmídico, cuja concentração foi previamente determinada (BioMate 3 UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, USA), foi misturado com células ultra-competentes de *Escherichia coli*, DH5 $\alpha$  (Library Efficiency DH5 $\alpha$  Competent Cells, Invitrogen, Reino Unido). A transformação foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, pipetou-se 100  $\mu\text{l}$  de uma linha celular de células ultra-competentes de *E. coli* para tubos de polipropileno de 2 ml a  $4^{\circ}\text{C}$ , adicionando-se 10  $\mu\text{l}$  de DNA cosmídico. Em seguida, provocou-se um choque térmico colocando a células ultra-competentes e o DNA cosmídico a  $42^{\circ}\text{C}$ , sem agitação, durante 45 segundos e imediatamente no gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 900  $\mu\text{l}$  de meio SOC (0,5% extracto de levedura, 2% triptona, 10 mM cloreto de sódio (NaCl), 2,5 mM cloreto de potássio (KCl), 10mM cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ),

10 mM sulfato de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) e 20 mM glucose, Invitrogen) e incubou-se 1 hora a 37°C, em agitação, 20 g. De seguida centrifugou-se 3 minutos, a 18506 g à temperatura ambiente, removendo-se o excesso de sobrenadante, deixando 100 µl em que se ressuspendeu o sedimento. Por fim, inoculou-se os 100 µl da cultura transformada em meio de Agar Luria Broth (LB) (anexo 1) em placas de petri, sob a selecção de ampicilina (Sigma). Deixou-se secar e incubou-se a 37°C durante 10-12 horas.

Conservaram-se as culturas a 4°C. Por fim, repicou-se uma colónia e inoculou-se em meio líquido LB (anexo 1) com ampicilina e colocou-se em agitação, 13 g, durante 10-12 horas.

O DNA cosmídico recombinante foi isolado de um mínimo de 50 colónias de *E. coli* e sujeito a restrição enzimática com as endonucleases *EcoRV*, com sequência de reconhecimento 5' ... GAT↓ATC ... 3', e *XbaI*, com sequência de reconhecimento 5' ... T↓CTAGA ... 3' (New England Biolabs). Na solução da reacção utilizou-se uma concentração de 6 U de cada enzima e água ultra pura para perfazer um volume total de 15µl (Quadro 3).

**Quadro 3** - Reagentes utilizados na restrição do cosmídeo recombinante e respectivos volumes.

| Reacção de Restrição | Volume (µl) |
|----------------------|-------------|
| Água ultra pura      | 9,75        |
| Tampão da Enzima     | 1,50        |
| BSA                  | 0,15        |
| <i>EcoRV</i>         | 0,30        |
| <i>XbaI</i>          | 0,30        |

BSA, soro albumina de bovino; *EcoRV* e *XbaI*, enzimas de restrição.

Após a preparação da mistura reaccional, as amostras foram incubadas a 37°C durante 3 horas.

## 7. Electroforese de campo invertido.

Os produtos de restrição obtidos foram analisados por electroforese de campo invertido. Esta técnica permite a análise de fragmentos cujo tamanho seja superior a 8 kb.

Preparou-se o gel por dissolução de 3g de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma) em 300 ml de tampão Tris/Borato/EDTA 1X (TBE, Bio-rad). Após polimerização, o gel foi colocado em tina de electroforese de campo invertido com tampão TBE 1X. Aplicou-se no gel todo o produto resultante da restrição ao qual se adicionou previamente 15 µl de tampão de aplicação 6X DNA (10mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xylene cyanol, 60% glicerol, 60 mM EDTA) (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemanha). Paralelamente, foram utilizados marcadores moleculares lambda DNA/*Hind*III e 1 kb (Fermentas).

Aplicou-se uma corrente de acordo com o programa multi-fase descrito no quadro 4 durante 16 horas. Seguidamente, o gel foi transferido para uma tina com TBE 1X sob agitação, à qual foi adicionada 30 µl de Brometo de Etídeo (Sigma) durante aproximadamente uma hora, seguida de duas lavagens com água ultra pura. A visualização dos produtos de restrição no gel efectuou-se sob iluminação ultravioleta, sendo em seguida fotografados (UVIDOC, Alfagene, Portugal).

**Quadro 4** – Electroforese de Campo Invertido:  
Programa multi-fase Kat-M

| Kat-1    |                         | Kat-2       |
|----------|-------------------------|-------------|
| 200 V    | <b>Voltagem</b>         | 200 V       |
| 10 '     | <b>Corrida no Tempo</b> | -           |
| 8 horas  | <b>Tempo de Corrida</b> | 8 horas     |
| 1 – 20 ' | <b>Pulsos no Tempo</b>  | 0,8 – 1,5 ' |
| Reverse  | <b>Modo</b>             | Reverse     |
| 3:1      | <b>“Fir Ratio”</b>      | 3:1         |

## 8. Sequenciação

Os cosmídeos considerados dominantes foram purificados com o kit “Plasmid DNA Purification” (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados em ambos os sentidos pelos serviços AGOWA genomics (AGOWA GmbH, Berlim, Alemanha), utilizando a montante da região pretendida a sequência iniciadora universal *M13rev* e a jusante da região pretendida a sequência iniciadora *CH-2* (5'... CCG TGT GAT ATC AGA TGC CC...3'). O sequenciador utilizado foi “ABI 3730xl” (Applied Biosystems, USA).

A análise das sequências, o desenho dos insertos de DNA e a identificação das “open reading frames” (ORFs) foi realizado com o software de análise MAC Vector e por pesquisa da base de dados do genoma de *L. braziliensis* (<http://www.genedb.org/genedb/lbraziliensis/>). Análises de homologia foram feitas utilizando o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).



## **CAPITULO III**

---

### **RESULTADOS**



## 1. Selecção *in vitro* de parasitas recombinantes.

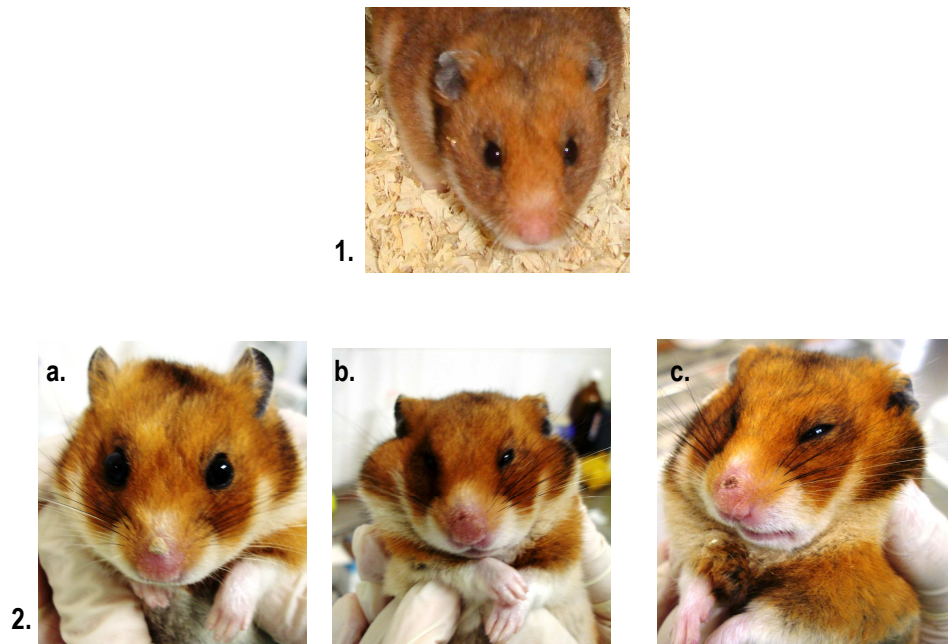
Depois dos promastigotas de cultura de *L. peruviana* terem sido transfectados com uma biblioteca genómica de DNA de *L. braziliensis*, através da técnica de electroporação, os parasitas recombinantes foram seleccionados sob a acção do antibiótico geneticina G418. O número de células transfectadas foi de 3840.

## 2. Selecção de virulência *in vivo*.

A população recombinante designada por *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104], foi cultivada no meio “Schneider’s insect” com o antibiótico de selecção, até obtenção da concentração  $2 \times 10^7$  promastigotas metacíclicos/50  $\mu$ l e inoculada no nariz de hamsters dourados. As populações recombinantes de controlo contendo o vector cosmídico parental, *L. braziliensis* LC2452cl4 TF[13] (2) pcosTL e *L. peruviana* LC2434cl5 TF[14] (2) pcosTL, foram sujeitas às mesmas condições de selecção e cultivo dos parasitas da população recombinante *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] e inoculadas em hamsters.

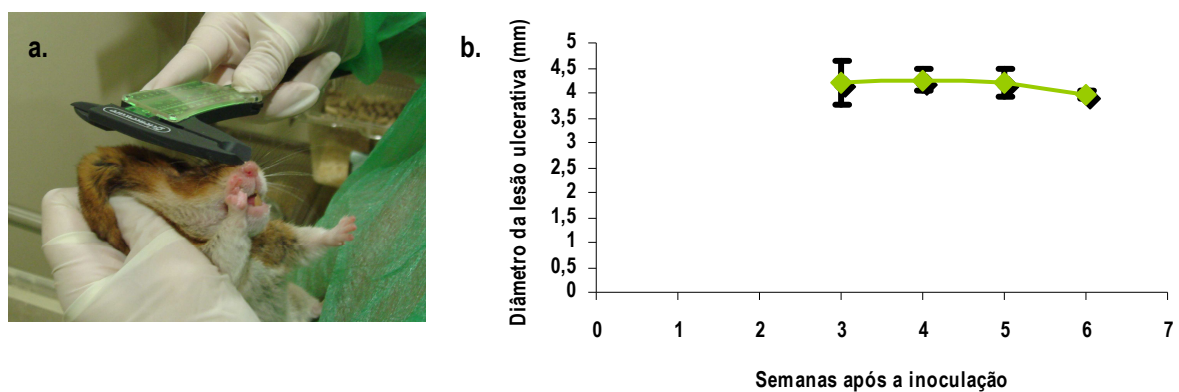
### 2.1. Observações Clínicas

Os primeiros sinais de infecção, nomeadamente inflamação e lesões ulcerativas, no local de inoculação, foram observados três semanas após a inoculação (p.i.). As lesões ulcerativas foram observadas num animal inoculado com *L. braziliensis* LC2452cl4 TF[13] (2) pcosTL, num animal inoculado com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[14] (2) pcosTL e em dois animais inoculados com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] (Figura 11).



**Figura 11** – 1. Aspecto do nariz de um hamster no qual não foi realizada qualquer inoculação; 2. Hamsters três semanas p.i.: a. Lesão ulcerativa no nariz de um hamster infectado com *L. braziliensis* LC2452cl4 TF[13] (2) pcosTL, b. Lesão ulcerativa no nariz de um hamster infectado com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[14] (2) pcosTL, c. Lesão ulcerativa no nariz de um hamster infectado com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104].

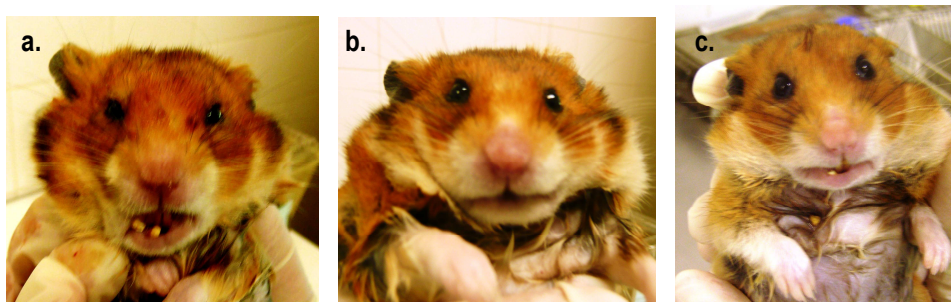
Nos restantes animais inoculados com *L. braziliensis* LC2452cl4 TF[13] (2) pcosTL e *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] foram observadas lesões ulcerativas às 4 semanas p.i.. A evolução da infecção foi acompanhada semanalmente procedendo-se à medição do diâmetro das lesões úlcéricas com um cutímetro (Figura 12).



**Figura 12** – a. Medição da lesão ulcerativa de um hamster com um cutímetro; b. evolução do diâmetro das lesões ulcerativas nos animais infectados com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104]

À sétima semana observou-se uma regressão completa das lesões ulcerativas em todos os animais, com persistência de edema no local de inoculação até à 12ª semana. À 19ª semana observou-se novamente o aparecimento de sinais inflamatórios no local de inoculação, em todos os animais em estudo. À 21ª semana observou-se também alopecia no hamster inoculado com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104].

Os sinais inflamatórios e a alopecia persistiram até ao final da infecção, às 24 semanas p.i. (Figura 13).



**Figura 13** – Hamsters 24 semanas p.i.: a. Hamster infectado com *L. braziliensis* LC2452cl4 TF[13] (2) pcosTL, b. Hamster infectado com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[14] (2) pcosTL, c. Hamster infectado com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104].

### 3.2.2. Exame parasitológico cultural

Às três, 12 e 24 semanas p.i. foram realizadas necrópsias dos animais dos quais foram recolhidos diferentes tecidos, nomeadamente tecido cutâneo do local de inoculação (nariz), tecidos viscerais (baço e fígado), gânglios e medula óssea (fémur), para detecção do parasita. Esta foi realizada através de exame parasitológico cultural em meio NNN.

No exame parasitológico cultural não foram observados parasitas *Leishmania* nas culturas NNN inoculadas com os tecidos viscerais (baço e fígado) e medula óssea recolhidos nas necrópsias realizadas (Quadro 5).

Foram observados parasitas *Leishmania*, nas quatro culturas isoladas a partir dos gânglios e do tecido cutâneo do local de inoculação dos hamsters inoculados com *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104], permitindo o isolamento do DNA cosmídico.

**Quadro 5** – Resultados das culturas dos hamsters em estudo necropsiados 3, 12 e 24 semanas p.i..

|                                                         | Baço |    |    | Fígado |    |    | Gânglios |       |    | Tecido conjuntivo do local de inoculação |       |    | Medula óssea |    |    |
|---------------------------------------------------------|------|----|----|--------|----|----|----------|-------|----|------------------------------------------|-------|----|--------------|----|----|
|                                                         | 3    | 12 | 24 | 3      | 12 | 24 | 3        | 12    | 24 | 3                                        | 12    | 24 | 3            | 12 | 24 |
| <i>L. braziliensis</i> LC2452cl4 TF[13] (2) pcos TL     | N    | -  | N  | N      | -  | N  | P        | -     | N  | N                                        | -     | N  | N            | -  | N  |
| <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[14] (2) pcos TL        | N    | -  | N  | N      | -  | N  | P        | -     | N  | N                                        | -     | N  | N            | -  | N  |
| <i>L. peruviana</i> LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos PER104] | N    | N  | N  | N      | N  | N  | P        | cont. | P  | P                                        | cont. | P  | N            | N  | N  |

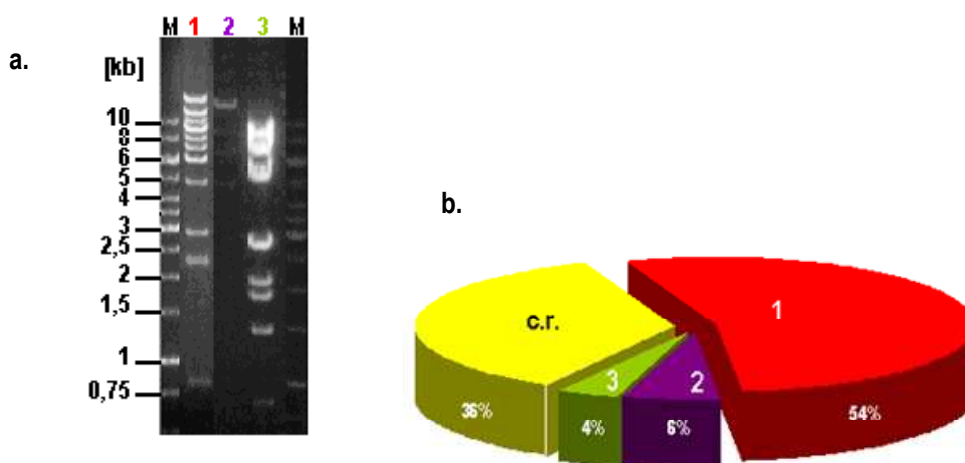
**P**, culturas NNIN nas quais foi observada a presença de *Leishmania*; **N**, culturas NNIN nas quais não foi observada a presença de *Leishmania*; -, não executado, cont., cultura contaminada com leveduras.

### 3. Isolamento de DNA cosmídico.

Os cosmídeos isolados foram purificados e utilizados na transformação de células ultra-competentes de *E. coli*, DH5 $\alpha$ . O DNA cosmídico foi isolado a partir de cada um dos clones de *E. coli* num total de 50 a 66, sujeito a restrição com as endonucleases *EcoRV* e *XbaI* e submetido a electroforese de campo invertido. Todos os padrões de restrição obtidos para os diferentes clones encontram-se em anexo (anexo 2).

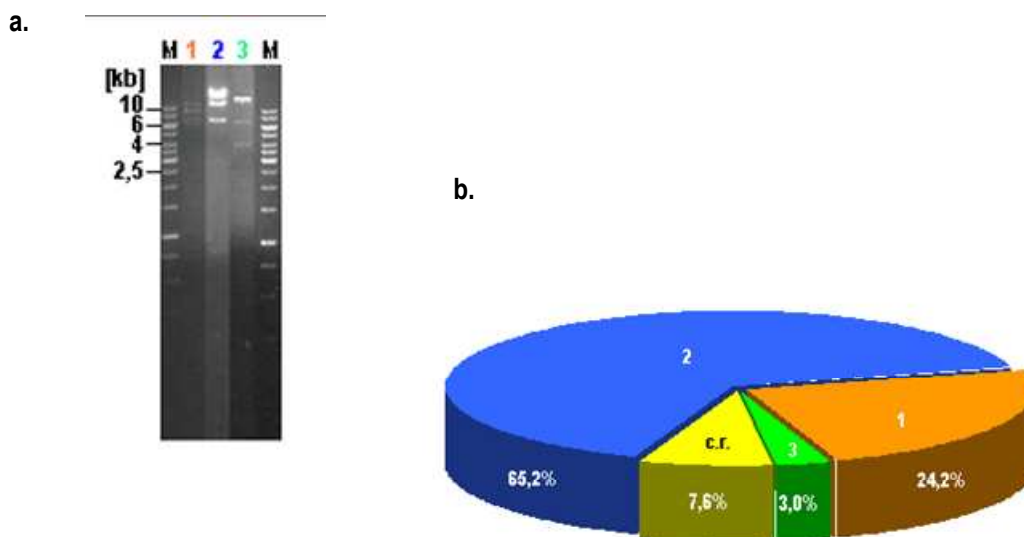
Por comparação dos padrões dos fragmentos de restrição dos cosmídeos isolados a partir das quatro populações recombinantes, *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isoladas dos gânglios e do tecido cutâneo do local de inoculação às três e 24 semanas p.i., observou-se que, a população recombinante de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada dos gânglios às três semanas p.i., dos gânglios às 24 semanas p.i. e do tecido cutâneo do local de inoculação às 24 semanas p.i., apresentam diferentes cosmídeos dominantes. Foram considerados cosmídeos dominantes aqueles que se encontram em maior percentagem numa mesma população recombinante, após isolamento em cultura a partir do hamster.

Na população recombinante de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada em cultura dos gânglios às três semanas p.i., observou-se que 64 % dos cosmídeos clonados pertencem aos protótipos designados por pcosLN3-3 (54%), pcosLN3-18 (6%) e pcosLN3-17 (4%). Os restantes 36% correspondem a cosmídeos cujo padrão de restrição é diferente para cada um. Estes cosmídeos são designados por cosmídeos residuais (Figura 14).



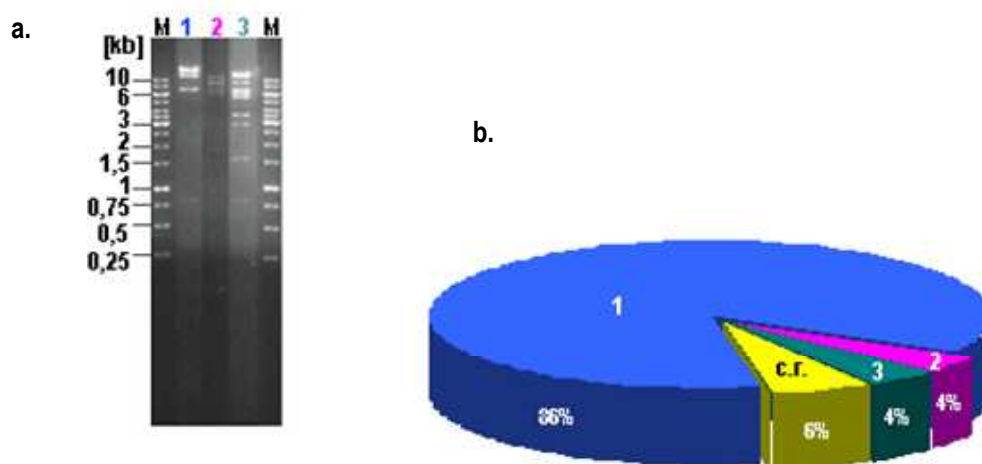
**Figura 14** – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados da população recombinante *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada dos gânglios do animal necropsiado às três semanas p.i.. a. Comparação dos padrões dos fragmentos de restrição *EcoRV/XbaI* dos cosmídeos dominantes, usando electroforese de campo invertido. M, marcador molecular de 1 kb, 1, pcosLN3-3, 2, pcosLN-17, 3, pcosLN3-18; b. Percentagem de cosmídeos, c.r., cosmídeos residuais.

Na população recombinante de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada em cultura do tecido cutâneo do local de inoculação às 24 semanas p.i., 92,4% dos cosmídeos clonados pertencem aos protótipos pcosIS24-8 (65,2%), pcosIS24-2 (24,2%) e pcosIS24-68 (3%). Os restantes 7,6% correspondem a cosmídeos residuais (Figura 15).



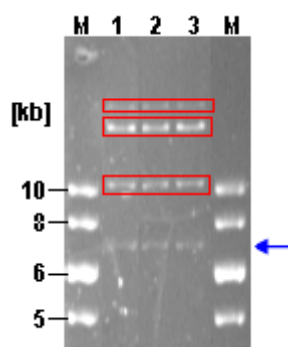
**Figura 15** – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados das populações recombinantes *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada do tecido cutâneo do local de inoculação às 24 semanas p.i.. a. Comparação dos padrões dos fragmentos de restrição *EcoRV/XbaI* dos cosmídeos dominantes, usando electroforese de campo invertido. M, marcador molecular de 1 kb, 1, pcosIS24-2, 2, pcosIS24-8, 3, pcosIS24-68; b. Percentagem de cosmídeos ●, protótipo pcosIS24-8, ●, protótipo pcosIS24-2, ●, protótipo pcosIS24-68, c.r., cosmídeos residuais.

Na população recombinante de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isolada em cultura isolada dos gânglios às 24 semanas p.i., 94% dos cosmídeos clonados pertencem aos protótipos pcosLN24-1 (86%), pcosLN24-13 (4%) e pcosLN24-17 (4%). Os restantes 6% correspondem a cosmídeos residuais (Figura 16).



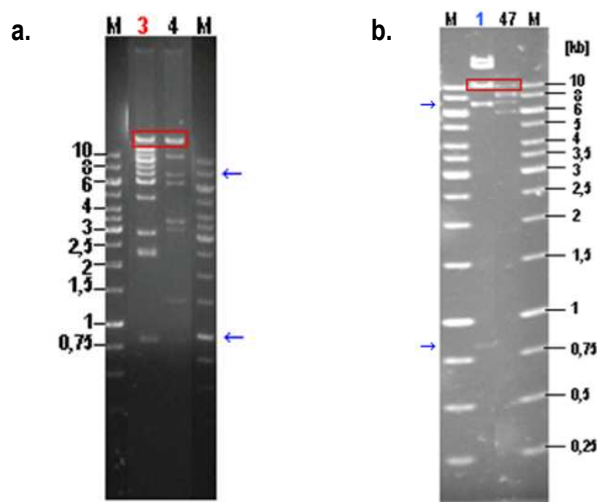
**Figura 16** – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados das populações recombinantes *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isoladas dos gânglios às 24 semanas p.i.. a. Comparação dos padrões dos fragmentos de restrição *EcoRV/XbaI* dos cosmídeos dominantes, usando electroforese de campo invertido. **M**, marcador molecular de 1 kb, **1**, pcosLN24-1, **2**, pcosLN24-13, **3**, pcosLN24-17; b. Percentagem de cosmídeos ●, protótipo pcosLN24-1, ●, protótipo pcosLN24-13, ●, protótipo pcosLN24-17, **c.r.**, cosmídeos residuais.

Nas populações recombinantes de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isoladas dos gânglios e do tecido cutâneo do local de inoculação às 24 semanas p.i., observou-se, por electroforese de campo invertido, que os protótipos pcosS24-8 e pcosLN24-1, correspondentes aos cosmídeos dominantes, têm o mesmo padrão de restrição (Figura 17), encontrando-se em maior percentagem na população isolada dos gânglios (86%).



**Figura 17** – Identificação dos cosmídeos dominantes isolados das populações recombinantes de *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isoladas às 24 semanas p.i que partilham fragmentos de restrição; comparação dos padrões dos fragmentos de restrição *EcoRV/XbaI*, usando electroforese de campo invertido. **M**, marcador molecular de 1 kb, **1**, pcosLN24-1, **2**, pcosS24-8, **3**, pcosS24-20, **□**, fragmento comum, **→**, vector cosmídico pcosTL.

Observou-se também que o protótipo pcosLN3-4, inserido no grupo dos cosmídeos residuais, e o pcosLN3-3 do grupo dos cosmídeos dominantes possuem um fragmento aparentemente comum (Figura 18.a.). O mesmo se verifica com o protótipo pcosLN24-1, cosmídeo dominante, e pcosLN24-47, cosmídeo residual (Figura 18.b.).



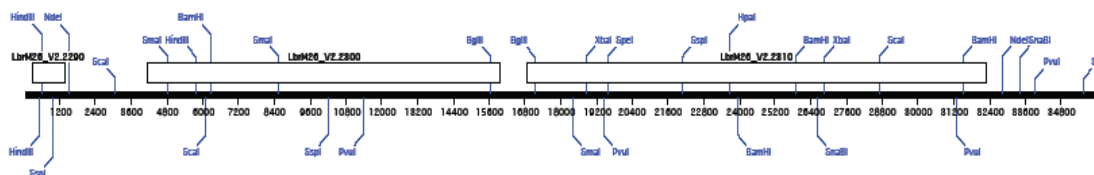
**Figura 18** – Identificação dos cosmídeos isolados das populações recombinantes *L. peruviana* LC2434cl5 TF[18] (2-7) pcos[PER104] isoladas dos gânglios regionais às a. três e b. 24 semanas p.i. que partilham fragmentos de restrição; comparação dos padrões dos fragmentos de restrição EcoRV/XbaI, usando electroforese de campo invertido. a. **M**, marcador molecular de 1 kb, **3**, pcosLN3-3, **4**, pcosLN3-4, **□**, fragmento comum, **→**, vector cosmídico pcosTL. b. **M**, marcador molecular de 1 kb, **1**, pcosLN24-1, **47**, pcosLN24-47, **□**, fragmento comum, **→**, vector cosmídico pcosTL.

#### 4. Análise dos insertos cosmídicos

Os cosmídeos pcosLN3-3, pcosLN3-4, pcosLN24-1, e pcosLN24-47 foram parcialmente sequenciados, usando sequências iniciadoras que flanqueiam o local de inserção do DNA genómico. Após o alinhamento das sequências obtidas com o genoma de *L. braziliensis* observou-se que o cosmídeo dominante pcosLN3-3 foi identificado como pertencente à região do cromossoma 26 enquanto que o cosmídeo residual pcosLN3-4 foi identificado com uma região do cromossoma 27 do genoma de *L. braziliensis*. O mesmo acontece com os cosmídeos

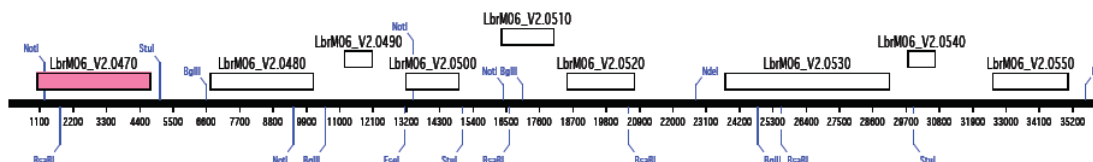
pcosLN24-1 e pcosLN24-47, que se observou pertencerem a regiões cromossômicas diferentes: cromossoma seis e cromossoma 20, respectivamente.

O cosmídeo pcosLN3-3 possui três “open reading frames” (ORFs) (Figura 19), duas das quais codificam proteínas de elevado peso molecular, LbrM26\_V2.2300 com 420,1 kDa e LbrM26\_V2.2310 com 563,2 kDa. A nenhuma das proteínas é identificada qualquer função.



**Figura 19** - Inserto de DNA genômico de *L. braziliensis* identificado após sequenciação do cosmídeo dominante pcosLN3-3. □, representam as ORFs.

O cosmídeo pcosLN24-1 é identificado numa região do cromossoma seis do genoma de *L. braziliensis*. Nesta região existem nove ORFs (Figura 20), porém apenas uma possui identificação na base de dados de *L. braziliensis*, a LbrM06\_V2.0470. Esta ORF codifica uma ATP-NAD-cinase cujo peso molecular é 134,4 kDa.



**Figura 20** - Inserto de DNA genômico de *L. braziliensis* identificado após sequenciação do cosmídeo dominante pcosLN24-1. □, representam as ORFs, ■, orf cuja proteína apresenta função de acordo com a base de dados de *L. braziliensis*.



## CAPITULO IV

---

### DISCUSSÃO



Nos últimos anos têm sido desenvolvidas diversas abordagens na área da genética permitindo a manipulação do genoma de parasitas, como por exemplo, *Leishmania*. As novas ferramentas permitem a identificação do gene ou da variação genética responsável pela característica em estudo e da sua função (Beverley, 2001).

O estudo das propriedades fenotípicas do complexo *Leishmania braziliensis*, e mais concretamente de *L. braziliensis* e de *L. peruviana*, pode dar-nos uma visão da base genética das características biológicas do parasita, nomeadamente, da sua virulência, patogenicidade e dinâmica de transmissão (Torrico *et al.*, 1999). Os marcadores de virulência podem ser considerados determinantes genéticos para a patogenicidade do parasita, contribuindo para o conhecimento de mecanismos através dos quais estes parasitas poderão ter sucesso dentro do hospedeiro vertebrado. Um dos métodos de identificação destes marcadores é a clonagem funcional, também designada por complementação genética. Com esta abordagem poderão utilizar-se bibliotecas de DNA genómico utilizando vectores cosmídicos, sendo esta uma ferramenta comprovadamente eficaz em *Leishmania* na análise de genes de resistência a fármacos (Hoyer *et al.*, 2001; Hoyer *et al.*, 2004; Choudhury *et al.*, 2008)

Neste estudo construiu-se uma população híbrida artificial, transfectando-se parasitas de *L. peruviana* com uma biblioteca de DNA de *L. braziliensis*. Os parasitas recombinantes de *L. peruviana*, expressando genes de *L. braziliensis*, foram inoculados em hamsters dourados, sendo observado o seu comportamento *in vivo* durante cerca de 24 semanas. As observações da infecção experimental sugerem que a expressão de genes de *L. braziliensis* aumenta a infecciosidade do parasita *L. peruviana* em hamsters dourados. Nos animais infectados com *L. peruviana* transfectada, os sinais clínicos, nomeadamente, inflamação e lesões ulcerativas no local de inoculação, foram semelhantes ou ligeiramente superiores aos da infecção nos animais infectados com *L. braziliensis* mas no grupo dos animais inoculados com *L. peruviana* apenas um desenvolveu uma úlcera, de tamanho inferior às dos restantes animais. O estabelecimento da infecção foi comprovado pela disseminação dos parasitas para os gânglios, próximos ao local de inoculação, no animal inoculado com *L. peruviana* transfectada. Estas observações estão de acordo com outros estudos experimentais realizados com estas duas espécies, em que *L. braziliensis* demonstrou ser mais infecciosa que *L. peruviana*, observando-se infecções mais agressivas com rápido aparecimento de lesões ulcerativas (Cortes *et al.*, 2007; Gamboa *et al.*, 2007a), tal como se verifica na infecção humana em que as espécies *L. braziliensis* e *L. peruviana*, são caracterizadas por causar leishmaniose cutânea, podendo em alguns casos,

quando causada por *L. braziliensis*, evoluir para leishmaniose mucocutânea. Estudos *in vivo* realizados na UEI de Leishmanioses/IHMT sugerem que híbridos *L. braziliensis* / *L. peruviana* possuem um comportamento intermédio relativamente às espécies parentais, *L. peruviana* e *L. braziliensis* (Cortes *et al.*, 2007). Contudo, em infecções experimentais *in vivo*, com longos períodos de observação, observou-se que a partir das 37 semanas, clones de híbridos *L. braziliensis* / *L. peruviana* causaram recaídas mostrando serem mais infecciosos que as estirpes parentais (resultados para publicação). Nos animais infectados verificou-se visceralização dos parasitas *L. braziliensis* e híbridos *L. braziliensis*/*L. peruviana*, uma vez que, para além de existir disseminação dos parasitas para os gânglios regionais, detectou-se a presença do parasita nos órgãos internos, mais concretamente, no baço e no fígado (resultados para publicação). A detecção dos parasitas *Leishmania* nestes órgãos foi efectuada pela técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR), que demonstrou ser uma técnica mais sensível relativamente ao exame parasitológico cultural que foi negativo enquanto que a PCR foi positiva. Contudo, no presente estudo não se verificou visceralização da infecção mas o parasita apenas foi pesquisado por exame cultural.

A selecção de genes, potenciais marcadores de virulência foi efectuada a partir de culturas de parasitas recombinantes isolados dos gânglios regionais, isto é, aferentes e proximais ao local de inoculação, recolhidos nas necrópsias dos hamsters realizadas às três e 24 semanas p.i.. Das referidas culturas o número limitado de clones cosmídicos obtidos, indica a existência de uma forte pressão selectiva sob a qual só os parasitas com determinados cosmídeos são capazes de sobreviver.

Diferentes protótipos de cosmídeos podem possuir um mesmo fragmento do cromossoma, isto é, que parte de diferentes insertos cosmídicos têm em comum a mesma região cromossómica (Choudhury *et al.*, 2008). Na análise de restrição dos clones cosmídicos observou-se um fragmento de DNA de igual tamanho nos dois animais infectados com os parasitas transfectados, o que sugere a partilha de DNA cromossómico em ambos os insertos. No entanto, após sequenciação parcial, tal hipótese não se confirmou tendo sido identificadas diferentes regiões cromossómicas correspondentes a potenciais genes codificantes de diferentes proteínas.

Na cultura de parasitas recombinantes isolados às três semanas p.i. observou-se a presença de um cosmídeo em 54% da população recombinante de *L. peruviana* transfectada. Este possui um fragmento do cromossoma 26 do DNA genómico de *L. braziliensis*, no qual, de acordo com a

informação contida na base de dados do genoma de *L. braziliensis*, foram identificadas três ORFs, às quais não está atribuída qualquer função. Surpreendentemente, e sem qualquer selecção prévia de virulência dos parasitas, na cultura isolada às 24 semanas p.i. a partir do gânglio, observou-se uma grande homogeneidade da população recombinante identificando-se um clone cosmídico em 86% da população. O mesmo clone cosmídico, foi também identificado em grande percentagem (65,2%) no tecido cutâneo isolado do local de inoculação. Estas observações sugerem que a pele poderá desempenhar um importante papel como barreira de protecção contra os parasitas, uma vez que apenas as populações parasitárias mais resistentes parecem ultrapassá-la. Estudos de infecção *in vivo* com *L. major* referem que as células dendríticas existentes na pele são responsáveis pela resposta imunitária protectora (Ritter & Osterloh, 2006).

O cosmídeo dominante identificado nas populações isoladas 24 semanas p.i. contém o fragmento do cromossoma seis do DNA genómico de *L. braziliensis*, no qual é prevista a existência de nove ORFs, oito das quais não está atribuído qualquer tipo de função. De acordo com a informação existente na base de dados, a ORF identificada como LbrM06\_V2.2310, poderá codificar uma ATP-NAD-cinase ou uma proteína com função homóloga. Genes que codificam proteínas correspondentes, isto é, proteínas com a mesma função, foram identificados nos genomas de *L. infantum*, *L. major*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* ([http://www.genedb.org/genedb/Search?name=LbrM06\\_V2.0470&organism=l braziliensis](http://www.genedb.org/genedb/Search?name=LbrM06_V2.0470&organism=l braziliensis)).

As cinases são proteínas importantes que regulam diferentes processos celulares como o controlo da transcrição, o do ciclo celular e da diferenciação e que têm despertado a atenção dos investigadores como possíveis alvos para novas moléculas envolvidas no tratamento de doenças coronárias ou cancerígenas (Naula *et al.*, 2005). Um grande número de cinases foram identificadas no genoma de *L. major* (179), *T. brucei* (156) e *T. cruzi* (171) (Naula *et al.*, 2005), algumas das quais são exclusivamente expressas em diferentes fases do ciclo de vida dos parasitas. As NAD-cinases são proteínas que catalizam a fosforilação do NAD na presença de moléculas de ATP, ATP-NAD-cinases, ou de polifosfato inorgânico como doador de grupos fosforil, poli(P)-NAD-cinases (revisto por Ochiai *et al.*, 2004).

A expressão génica em *Leishmania* é conhecida pela sua variação durante o ciclo de vida dos parasitas (Almeida *et al.*, 2004) e apenas o acompanhamento das diferentes fases permitirá a identificação e compreensão das mudanças moleculares associadas às fases infecciosas do parasita, promastigotas metacíclicos e amastigotas (Gamboa *et al.*, 2007b). Estudos

recentemente efectuados por Gamboa *et al.* (2007b), sobre a caracterização de transcriptos de mRNA expressos durante as diferentes fases de *L. braziliensis*, permitiram a identificação de quatro marcadores moleculares de virulência, a proteína específica Meta-1, maioritariamente expressa em promastigotas metacíclicos, a proteína oligopeptidase b, expressa em amastigotas e as proteínas glucose-6-fosfato desidrogenase e serina / treonina cinase demonstraram níveis de expressão semelhantes em ambas as fases infecciosas do parasita. Estas observações poderão indicar que marcadores de virulência poderão, ainda que com diferentes níveis, ser expressos em ambas as fases infecciosas. Estudos anteriormente realizados em *L. major* demonstraram que a expressão génica de mais de 94% dos genes ocorre em ambas as fases do ciclo de vida do parasita (Leifso *et al.*, 2007). No referido estudo, de um total de 91 proteínas identificadas, 8% eram diferencialmente expressas durante a fase amastigota, 20% durante a fase promastigota e as restantes 72% constitutivamente expressas em ambas as fases.

No nosso estudo, os cosmídeos foram isolados a partir de culturas de parasitas recombinantes de *Leishmania* sob a forma promastigota.

Desde a sequenciação completa dos genomas de *L. major* (Ivens *et al.*, 2005), *L. infantum* e *L. braziliensis* (Peacock *et al.*, 2007) vários estudos com diferentes abordagens genéticas têm descrito genes identificados como possíveis marcadores de virulência de espécies de *Leishmania*.

Recentemente, Zhang *et al.* (2008) identificaram o gene Li1040 (LinfJ32\_V3.1040) que codifica uma potencial proteína envolvida no transporte proteico, que leva a um grande aumento da parasitemia no baço e fígado de murganhos BABL/c infectados com *L. major*. Para além de pertencer ao genoma de *L. major*, este gene encontra-se também presente nos genomas de *L. donovani*, *L. infantum* e, igualmente em *L. braziliensis*.

Os factores genéticos responsáveis pelo controlo do tropismo e da virulência encontram-se amplamente distribuídos nos genomas das várias espécies de *Leishmania*, envolvendo uma combinação de genes específicos da espécie, de genes responsáveis pela regulação pós-transcricional e de polimorfismos genéticos (Zhang *et al.*, 2008). Neste estudo foram identificadas regiões nos cromossomas seis e 26 do genoma *L. braziliensis*, as quais poderão conter possíveis marcadores de virulência desta espécie. O possível marcador de virulência LbrM06\_V2.2310 identificado neste estudo, bem como as restantes ORFs identificadas, poderão desempenhar um papel fundamental na virulência e tropismo de *Leishmania*. Ainda em fase de estudo,

devemos ter cuidado na interpretação do seu significado biológico. Este deve ser complementado com novos e alargados estudos funcionais e análise proteómica.



## **CAPITULO V**

---

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

#### **FUTURAS**



Neste estudo foram identificados como possíveis genes marcadores de virulência do parasita *Leishmania* do complexo *braziliensis*, *L. (V.) braziliensis*, 12 hipotéticos genes, três dos quais pertencentes ao cromossoma 26 e os restantes ao cromossoma seis.

Os parasitas *L. peruviana* transfectados com DNA de uma biblioteca genómica de *L. braziliensis* foram inoculados em modelo roedor, hamster dourado, para selecção de virulência *in vivo* dos parasitas recombinantes. A cultura de parasitas recombinantes isolados às três semanas p.i. revelou a presença de um clone cosmídico em cerca de metade da população. Este codifica para uma região do cromossoma 26 na qual existem três hipotéticos genes sem qualquer informação na base de dados. As culturas recombinantes isoladas às 24 semanas p.i. revelaram uma grande homogeneidade da população, observando-se a presença de um clone cosmídico que codifica uma região do cromossoma seis na qual estão referenciados nove hipotéticos genes, oito dos quais sem função aparente e um com codificação para uma ATP-NAD-cinase.

A clonagem funcional ou complementação genética demonstrou ser um método experimental eficiente para a investigação de marcadores de virulência em parasitas do género *Leishmania*.

A continuação *in vivo* deste estudo passará pela determinação específica dos genes associados à virulência de *L. braziliensis*. Para tal, serão novamente transfectados parasitas de *L. peruviana* com DNA genómico de *L. braziliensis* correspondente aos cosmídeos dominantes identificados. Os novos parasitas recombinantes, com os insertos dos potenciais genes serão sujeitos a selecção de virulência *in vivo*, em modelo roedor, isolados e analisados por electroforese de campo invertido e sequenciação parcial dos cosmídeos dominantes.

Como complemento deste estudo, seria igualmente interessante realizar estudos de isolamento do DNA cosmídico recombinante a partir de formas amastigotas, de modo a certificar que os genes identificados são expressos em ambas as fases do ciclo de vida do parasita.



## **CAPITULO VI**

---

### **BIBLIOGRAFIA**



- Abranches P., Conceição-Silva F.M., Silva-Pereira M.L.D.** (1986). La leishmaniose viscérale dans la région de Lisbonne. Identification enzymatique. Interpretation struturelle du foyer. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogenèse. Applications éco-épidémiologiques*, Rioux J-A (ed.), Montpellier, pp. 427-432.
- Abranches P., Santos-Gomes G., Rachamim N., Campino L., Schnur L.F., Jaffe C.L.** (1991). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, **13**: 537-550.
- Abranches P., Campino L., Santos-Gomes G.M.** (1998). Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. *Acta médica portuguesa*, **11** (10): 871-875.
- Afonso L & Scott P.** (1993). Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, **61**: 2952-2959.
- Ahmed, S., Colmenares, M., Soong, L., Goldsmith-Pestana, K., Munstermann, L., Molina, R., McMahon-Pratt, D.** (2003). Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **71**: 401-410.
- Almeida, M.C., Cuba, C.A., de Sa, C.M., Pharoah, M.M., Howard, K.M., Miles, M.A.** (1993). Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* *in vitro*: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87** (3): 325-329.
- Almeida, R.P., Barral-Netto, M., De Jesus, A.M., De Freitas, L.A., Carvalho, E.M., Barral, A.** (1996). Biological behaviour of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **54**: 178-184.
- Almeida, R., Gilmartin, B.J., McCann, S.H., Norrish, A., Ivens, A.C., Lawson, D., Levick, M.P., Smith, D.F., Dyal, S.D., Vetrie, D., Freeman, T.C., Coulson, R.M., Sampaio, I., Schneider, H. and Blackwell, J.M.** (2004). Expression profiling of *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **136**: 87-100.
- Alvar, J., Canavete, C., Gutierrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J.** (1997). *Leishmania* and Human Immunodeficiency Virus Coinfection: the First 10 Years. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 298-319.

**Ashford, R.W.** (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology*, **14**: 523-532.

**Augusto, M.J., Squina, F.M., Marchini, J.F., Dias, F.C., Tosi, L.R.** (2004). Specificity of modified *Drosophila* mariner transposons in the identification of *Leishmania* genes. *Experimental Parasitology*, **108** (3-4): 109-113.

**Bahr V., Stierhof Y.D., Ilg T., Demar M., Quinten M., Overath P.** (1993). Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Chemical Parasitology*, **58**: 107-122.

**Bates P. & Tetley L.** (1993). *Leishmania mexicana*: Induction of Metacyclogenesis by Cultivation of Promastigotes at Acidic pH. *Experimental Parasitology*, **76**: 412-423.

**Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., Sacks, D. L.** (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine*, **188**: 1941-1953.

**Beverley, S.M.** (2003). Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nature Reviews. Genetics*, **4** (1): 11-19.

**Blackburn K., Wallbanks K. R., Molyneux D. H., Lavin D. R., Winstanley S. L.** (1988). The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **82**: 613-619.

**Bogitsh, B. J. & Cheng, T. C.** (1998). Human Parasitology (2<sup>nd</sup> ed.). San Diego: Academic Press. pp. 95-112.

**Bories, C., Coffin, C., Mathieu, D., Bories, P. N., Scherman, E., Rivollet, D., Deniau, M.** (1998). Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **92**: 685-692.

**Brycesson, A. M. D.** (1996). Leishmaniasis. In: *Manson's Tropical Diseases*. Cook, GC & Zumba, A. Eds. WB Saunders. 20<sup>th</sup> ed, London, pp.1755.

**Campino L., Santos-Gomes G., Riça-Capela M.J., Cortes S., Abranches P.** (2000). Infectivity promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, **92**: 269-275.

**Chang, K.P. & Chaudhury, G.M.** (1990). Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annual Reviews of Microbiology*, **44**: 499-529.

**Chang K.P.** (1993). Evolution and regulation of *Leishmania* virulence. In: *Current Trends. In: Leishmania research*. Bhauri A.N., Basu M.K., Sen A.K., Kumar S. (Eds.) CSIR. Publications & Informations Directorate, New Delhi, Índia: 15-27.

**Chang K.P., Reed S.G., McGwire B.S., Soong L.** (2003). *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Tropica*, **85**: 375-390.

**Choudhury, K., Zander, D., Kube, M., Reinhardt, R., Clos, J.** (2008). Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and Sb<sup>III</sup>. *International Journal for Parasitology*, **38**: 1411-1423.

**Clayton, C.E.** (1999). Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitology Today*, **15** (9): 372- 378.

**Clos, J. & Choudhury, K.** (2006). Functional cloning as a means to identify *Leishmania* genes involved in drug resistance. *Mini Reviews in Medical Chemistry*, **6** (2): 123-129.

**Compton, H. L. & Farrell, J. P.** (2002). CD28 costimulation and parasite dose combine to influence the susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania major*. *Journal of Immunology*, **168**: 1302-1308.

**Cortes S., Maia C., Maurício I., Miles M., Campino L.** (2007). Evaluation of the Biological Behaviour of Parental and Hybrid Strains of *Leishmania* Subgenus *Viannia*: Hamsters' Experimental Infection. 5th European Conference on Tropical Medicine and International Health Amsterdão, Holanda, 24-28 Maio, 2007. *European Journal of Tropical Medicine and International Health*, **12** (S1):211.

**Cruickhank R.** (1973). Microbiologia Médica. *Fundação Calouste Gulbenkian*, 3ª edição, Lisboa, pp. 1128.

**Cruz, A., Coburn, C.M., Berverly, S.M.** (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88** (16): 7170-7174.

**Davies, C.R., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R., Rodriguez, N.** (2000). The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean Countries. *Cadernos de saúde pública*, **16**: 925-950.

**Dedet, J. P.** (2000). Les leishmanioses actualités. *La Press Médical*, **29**: 1019-1926.

**Dedet J. P.** (2002). Current Status of Epidemiology of Leishmaniasis. In: Farrel J. P., *World Classic Parasites Volume 4, Leishmania*, pp 1-10.

**Dedet, J. P. & Pratlong, F.** (2003). Leishmaniasis. In: *Manson's Tropical Diseases*. Cook GC & Zumba A Eds. WB Saunders. 21th ed. London, pp. 1338-1364.

**DeKrey, G.K., Lima, H.C., Titus, R.G.** (1998). Analysis of the immune response of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*. **66**: 827-829.

**Denise, H., Coombs, G.H., Mottram, J.C.** (2004). Generation of *Leishmania* mutants lacking antibiotic resistance genes using a versatile hot-and-run targeting strategy. *FEMS Microbiology Letters*, **235** (1):89-94.

**Desjeux, P.** (1992). Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Statistics Quarterly*, **45**: 267-275.

**Desjeux P.** (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **27**: 305-318.

**Duarte, M. I., Laurenti, M. D., Andrade Junior, H. F., Corbett, C. E.** (1988). Comparative study of the biological behaviour in hamster of two isolates of *Leishmania* characterized respectively as *L. major*-like and *L. donovani*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **30**: 21-27.

**Dujardin, J.C., Gagendran, N., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Guerra, H., Gomez, J., Arrayo, J., De Donker, S., Jacquet, D., Hammers, R.** (1993). Karyotype polymorphism and conserved characters in the *Leishmania* (Visceral) *braziliensis* complex explored with chromosome-derived probes. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **73** (2): 101-118.

Dujardin, J.C., Bañuls, A.L., Llanos-Cuentas A., Alvarez E., DeDonker, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Arevalo, J. and Tybayrenc M. (1995). Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*, **59** : 293-307.

Evans, T.G., Smith, D., Pearson, R.D. (1990). Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Journal of Parasitology*, **76**: 212-217.

Gamboa D., Torres K., Doncker S., Zimic M., Arevalo J., Dujardin J.-C. (2007a). Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*, **26**: 1-8.

Gamboa D., Van Eys G., Victoir K., Torres K., Adaut A., Arevalo J., Dujardin J.-C. (2007b). Putative markers of infective life stages in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Parasitology*, **134**: 1689-1698.

Gifawesen, C. & Farrell, J. P. (1989). Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infection and Immunity*, **57**: 3091-3096.

Giannini M.S. (1974). Effects of promastigotes growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in golden hamster. *Journal of Parasitology*, **21**: 521-527.

Ghedin E., Zhang W.W., Charest H., Sundar S., Kenney R.T., Matlashewski G. (1997). Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **4**: 530-535.

Gontijo, B. & Carvalho, M. L. R. (2003). Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **36** (1): 71-80

Gueiros-Filho, F.J. & Beverley, S.M. (1997). Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element mariner within the protozoan *Leishmania*. *Science*, **276** (5319): 1716-1719.

Guevara-Mendoza O, Une C., Franceschi Carreira P., Orn A., 1997. Experimental infection of BALB/C mice with *Leishmania panamensis* and *Leishmania mexicana*: induction of early IFN-gamma but not IL-4 is associated with the development of cutaneous lesions. *Scandinavian Journal of Immunology*, **46**: 35-40.

Ha, D.S., Schwarz, J.K., Turco S.J., Beverley S.M. (1996). Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **77** (1): 57-64.

Hamidi, A. N., Nadim, A., Edrissian, G. H. H., Tahvildar-Bidruni, G. H., Javadian, E. (1982). Visceral leishmaniasis of jackals and dogs in northern Iran. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **76**: 756-757.

Handman E. & Goding J.W. (1985). The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO Journal*, **4**: 329-336.

Herwaldt B. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* **354**: 1191-1199.

Hommel, M., Jaffe, C. L., Travi, B., Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89** (Suppl. 1): 55-73.

Hoyer C., Mellenthin K., Schilhabel M., Platzer M., Clos J. (2001). Use of genetic complementation to identify gene(s) which specify species-specific organ tropism of *Leishmania*. *Medical Microbiology and Immunology* **190**: 43-46.

Hoyer C, Zander D, Fleischer S, Schilhabel M, Kroener M, Platzer M, Clos J. (2004). A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest. *International journal for parasitology*, **34** (7): 803-811.

Hübel A., Krobitch S., Horauf A., Clos J. (1997). *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Molecular Cellular Biology*, **17**: 5987-5995.

Ivens AC, Peacock CS, Wortley EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream M-A, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RMR, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, Gaudenzi JD, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science*, **309**(5733): 436-442.

**Kantengwa S., Muller I., Louis J., Polla B.S.** (1995). Infection of human and murine macrophages with *Leishmania major* is associated with early parasite heat shock protein synthesis but fails to induce a host cell stress response. *Immunology and Cellular Biology*, **73**: 73-80.

**Kelly J.M., Das A., Tomás A.M.** (1994). An approach to functional complementation by introduction of large fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **65**: 51-62.

**Killick-Kendrick R. e Rioux J.A.** (1991). *Leishmania*: Cycle intravectoriel. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **66**: 71-74.

**Killick-Kendrick R.** (2002). Phlebotomine sand flies: biology and control. In *World Class Parasites Volume 4, Leishmania*. J. P. Farrell (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London. 193 pp.

**Kirkpatrick, C.E., Nolan, T.J., Farrell, J.P.** (1987). Rate of *Leishmania*-induced skin-lesions development in rodents depend on the site of inoculation. *Parasitology*, **94** (Pt3): 451-465.

**Krobitsch S., Brandau S., Hoyer C., Schmetz C., Hübel A., Clos J.** (1998). *Leishmania donovani* heat shock and function in amastigote stage differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**: 6488-6494

**Kuhls, K., Mauricio I. L., Pratlong, F., Presber, W., Schönian, G.** (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection*, **11-12**: 1224-1234.

**Kuhls, K., Keilonat, L., Ochsenreither, S., Schaar, M., Schweynoch, C., Presber, W., Schönian, G.** (2007). Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes and Infection*, **9**: 334-343.

**Kweider M., Lemersre J.P., Darcy F., Kusnierz J.P., Capron A., Santoro F.** (1987). Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing of expression of a 65,000-Dalton surface antigen. *Journal of Immunology*, **138**: 299-305.

**Lambson, B. & Barker, D. C.** (2002). Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**: S60-S75.

**Lanotte, G.** (1975). Le foyre de leishmaniose viscérale des Cévennes. Limites et structures. Essai méthodologique. *Tese de Doutoramento*. Faculté de Medicine de Montpellier.

**Launois, P., Conceicao-Silva, F., Himmerlich, H., Parra-Lopez, C., Tacchini-Cottier, F., Louis, J. A.** (1998). Setting in motion the immune mechanisms underlying genetically determined resistance and susceptibility to infection with *Leishmania major*. *Parasite Immunology*, **20**: 223-230.

**Laurentino, E.C., Ruiz, J.C., Fazelinia, G., Myler, P.J., Degrave, W., Alves-Ferreira, M., Ribeiro, J.M., Cruz, A.K.** (2004). A survey of *Leishmania braziliensis* genoma by shotgun sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **137** (1): 81-86.

**LeBowitz, J.H., Cruz, A., Beverley, S.M.** (1992). Thymide kinase as a negative selectable marker in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **51** (2): 321-325.

**LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverley, S.M.** (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes & Development*, **7** (6): 996-1007.

**Leclercq, V., Lebastard, M., Belkaid, Y., Louis, J., Milon, G.** (1996). The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the *Lsh* and MHC loci. *Journal of Immunology*, **157**: 4537-4545.

**Leifso, K., Cohen-Freue, G., Dogra, N., Murria, A. and McMaster, W.R.** (2007). Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **152**: 35-46.

**Liew, F. Y. & O'Donnell, C. A.** (1993). Immunology of leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, **32**: 161-259.

**Lima, H. C. & Titus, R. G.** (1996). Effects of sand fly vector saliva on the development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, **64**: 5442-5445.

**Manson-Bahr, P.E.C. & Bell, D.R.** (1991). Leishmaniasis In: *Manson's Tropical Diseases*, 19<sup>th</sup> Ed. Baillière Tindall, 1557 pp.

**Martínez, J.E., Travi, B.L., Valencia, A.Z., Saravia, N.G.** (1991). Metastatic capability of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in golden hamsters. *Journal of Parasitology*, **77**: 762-768.

**Maurício, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A.** (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, **16**: 188-189.

**Maurício, I. L., Gaunt, M. W., Stothard, J. R., Miles, M. A.** (2001). Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions, *Parasitology*, **122**: 393-403.

**Melby P. C., Tryon V. V., Chandrasekar B., Freeman G. L.** (1998). Cloning of Syrian Hamster (Mesocricetus auratus) Cytokine cDNAs and Analysis of Cytokine mRNA Expression in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, **66**: 2135-2142.

**Melby, P. C., Chandrasekar, B., Zhao, W., Coe, J. E.** (2001). The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *Journal of Immunology*, **166**: 1912-1920.

**Molyneux, D. e Killick-Kendrick, R.** (1987). Morphology ultrastructure and life cycles. In "The leishmaniasis in biology and medicine". W. Peters & R. Killick-Kendrick (Eds.). Academic Press, London. pp. 941.

**Murray P.J., Handman E., Glaser T.A., Spithili T.W.** (1990). *Leishmania major*: Expression and gene structure of glycoprotein 63 molecule in virulent and avirulent clones and strains. *Experimental Parasitology*, **71**: 294-304.

**Murray H., Berman J., Davis C., Saraiva N.** (2005). Advances in Leishmaniasis. *Lancet* **366**: 1561-1577.

**Moody S.F.** (1993). Molecular variation in *Leishmania*. *Acta Tropica*, **53**: 185-204.

**Nabors, G. S., Nolan, T., Croop, W., Li, J., Farrell, J. P.** (1995). The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunology*, **17**: 569-579.

**Naula C., Parsons M., Mottram J.C.** (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1754**: 151-159.

**Nolan T.J. & Herman R.** (1985). Effects of long term cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Protozoology*, **32**: 70-75.

**Noyes H. A., Bell A. A., Margon R.** (1996). Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **55** (1): 98-105

**Ochiai, A., Mori, S., Kawai, S., Murata, K.** (2004). Overexpression, purification and characterization of ATP-NAD-kinase of *Sphingomonas* sp. A1. *Protein Expression and Purification*, **36** (1): 124-130.

**Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Petersm N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M-A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge. D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R.O., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F., Berriman, M.** (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, **39**: 839-847.

**Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Sacks, D.L.** (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, **72**: 191-204.

**Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J., Sacks, D.L.** (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sandflies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphism in the surface lipophosphoglycan. *Proceedings of National Academies Science*, **91**: 9155-9159.

**Pires, C.A.** (1984). Les phlébotomes de Portugal. I – Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de l'Arrábida (Portugal). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. **559**: 521-524.

**Ramamoorthy, R., Donelson, J.E., Paetz, K.E., Maybodi, M., Roberts, S.C., Wilson, M.E.** (1992). Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**: 1888-1895.

**Ravel C., Cortes S., Pratlong F., Morio F., Dedet J.-P., Campino L.** (2006). First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, **36**: 1383-1388.

**Reiling L., Jacobs T., Kroemer M., Gaworski I., Graefe S., Clos J.** (2006). Spontaneous recovery of pathogenicity by *Leishmania major* *hsp100*<sup>-/-</sup> alters the immune response in mice. *Infection and Immunity*, **74** (11): 6027-6036.

**Reiner, S. L. e Locksley, R. M.** (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology*, **13**: 151-177.

**Requena, J. M., Soto, M., Doria, M. D., Alonso, C.** (2000). Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **76**: 269-281.

**Rey, J.A., Travi, B.L., Valencia, A.Z., Saravla, N.G.** (1990). Infectivity of the subspecies of *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **43**: 623-631.

**Riça-Capela, M. J., Cortes, S., Leandro, C., Peleteiro, M. C., Santos-Gomes, G., Campino, L.** (2003). Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitology Research*, **89**: 163-169.

**Ritter, U. & Osterloh, A.** (2006). A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, **196** (1): 51-9.

**Roher S.P., Michelotti E.F., Torri A.F., Hajduk S.L.** (1987). Transcription of kinetoplast DNA minicircles. *Cell*, **49**: 625-632.

**Rolão, N.** (2004). O parasitismo e a resposta imunitária local em murganhos BALB/c infectados por *Leishmania infantum*. Tese Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.pp. 183.

**Rolão N., Melo C., Campino, L.** (2004). Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, **90**: 123-126.

**Roy, G., Dumas, C., Sereno, D., Wu, Y., Singh, A.K., Tremblay, M.J., Ouellette, M., Olivier, M., Papadopolou, B.** (2000). Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. Infections in macrophages and in animal models. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **110** (2): 195-206.

**Ryan, K.A., Dasgupta, S., Beverley, S.M.** (1993). Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene*, **131** (1): 145-150.

**Sádlová, J.** (1999). The life history of *Leishmania*. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta of the Society of Zoology of Bohemia*, **63**: 331-366.

**Sacks, D. & Perkins, P.** (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, **223**: 1417-1419.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.**, 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, pp.

**Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N., Regis-Roggero, A.** (2004). Leishmaniasis. *Dermatologia Peruana*, **14** (2): 82-98.

**Sádlová, J.** (1999). The life history of *Leishmania*. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta of the Society of Zoology of Bohemia*, **63**: 331-366.

**Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., Titus, R.** (1991). A mouse model of *Leishmania braziliensis* braziliensis infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine*, **173**: 49-54.

**Santos-Gomes, G.** (1995). Caracterização biológica de *Leishmania infantum*. Estudos da virulência e patogenia da infecção de estirpes isoladas em Portugal. Tese. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 163 pp.

**Semprevivo L.H., Yusuf J.N., Honogberg B.M.** (1981). Changes in growth rate and infectivity of *Leishmania donovani* subjected to various laboratory procedures. *Zeitschrift Parasitenkunde*, **65**: 42-51.

**Sloof P. & Benne R.** (1993). RNA editing in trypanosome mitochondria: guidelines for models. *FEBS Letters*, **325**: 146-151.

**Sollner-Webb B.** (1991). RNA editing. *Current Opinion in Cellular Biology*, **3**: 1056-1061.

**Strauss-Ayali, D. & Baneth, G.** (2001). *Canine Visceral Leishmaniasis*. In: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. L. Carmichael (Ed.). International Veterinary Information Service (<http://www.iviis.org>). Ithaca, New York.

**Sturm N.R. & Simpson L.** (1990). Kinetoplast DNA Minicircles Encode Guide RNAs for Editing of Cytochrome Oxidase Subunit III mRNA. *Cell*, **61**: 879-884.

**Swindle, J. & Tait, A.** (1996). In *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Eds, Smith, D.F. and Parsons M.) IRL Press, Oxford, pp. 6-34.

**Theodos, C. M., Povinelli, L., Molina, R., Sherry, B. e Titus, R. G.** (1991). Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity *in vitro* and resistance to cutaneous leishmaniasis *in vivo*. *Infection and Immunity*, **59**: 2839-2842.

**Titus, R. G. & Ribeiro, J. M.** (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, **239**: 1306-1308.

**Torrico M.C., Doncker S., Arevalo J., Ray D. e Dujardin J. C.** (1999). *In vitro* promastigote fitness of putative *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* / *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* hybrids. *Acta Tropica*, **72**: 99-110.

**Tosi, L.R. & Beverley, S.M.** (2000). Cis and trans factors affecting Mos 1 mariner evolution and transposition *in vitro*, and its potential for functional genomics. *Nuclei Acids Research*, **28** (3): 784-790.

**Tibayrenc M. & Ayala F.J.** (1999). Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes and Infection*, **1**: 465- 472.

**Turco S.J.** (1988). The lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Parasitology Today*, **4**: 255-257.

**Vale, E.S.V. & Furtado, T.** (2005). Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **80** (4): 421-428.

**Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G. C., Titus, R. G., Neva, F.** (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **345**: 223-230.

**Wilson, M.E. & Weinstock, J.V.** (1996). Hepatic granulomas in murine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Methods*, **9**: 248-254.

**Zakai, H. A., Chance, M.L., Bates, P.A.** (1998). *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology*, **116** ( Pt 4): 305-309.

**Zhang, W., Peacock, C.S., Matlashewski, G.** (2008). A Genomic-Based Approach Combining *In Vivo* Selection in Mice to Identify a Novel Virulence Gene in *Leishmania*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **2** (6): e248. doi:10.1371/journal.pntd.0000248.

## **CAPITULO VII**

---

**ANEXOS**



## 1. Composição de meios de cultura.

### 1.1. Meio "Schneider's Insect"

Dissolveu-se, lentamente, o meio "Schneider's insect" em pó (Sigma-S-9895) e 150mg de L-Fenilalanina em 800 ml de água miliQ, à temperatura ambiente. Adicionou-se 400 mg de bicarbonato de sódio (Sigma) e 600 mg de cloreto de cálcio (Sigma C-401). Adicionou-se 500 µl gentamicina (50 mg/ml – Sigma G-1397) e 10 ml de urina masculina filtrada (1%). Ajustou-se o pH do meio a 6,7 com hidróxido de sódio 1 N (Sigma). Filtrou-se e conservou-se o meio a 4°C até ao seu uso.

### 1.2. Meio Nicolle, Novy e McNeal

Dissolveu-se 6g de cloreto de sódio (Sigma) em 900 ml de água destilada. Aqueceu-se a solução e adicionou-se 14 g de agar (Sigma), agitando para que não se formem grumos. Deixou-se ferver durante alguns minutos e em seguida distribuiu-se cerca de 4,5 ml por cada tudo de cultura e esterilizou-se no autoclave (os tubos podem ser guardados a 4°C até ao momento da adição do sangue).

Adicionou-se 10 – 20% (v/v) de sangue de coelho e 6000U/ml de penicilina (Sigma) a cada tubo. Deixou-se solidificar à temperatura ambiente em posição inclinada. Conservou-se os tubos a 4°C.

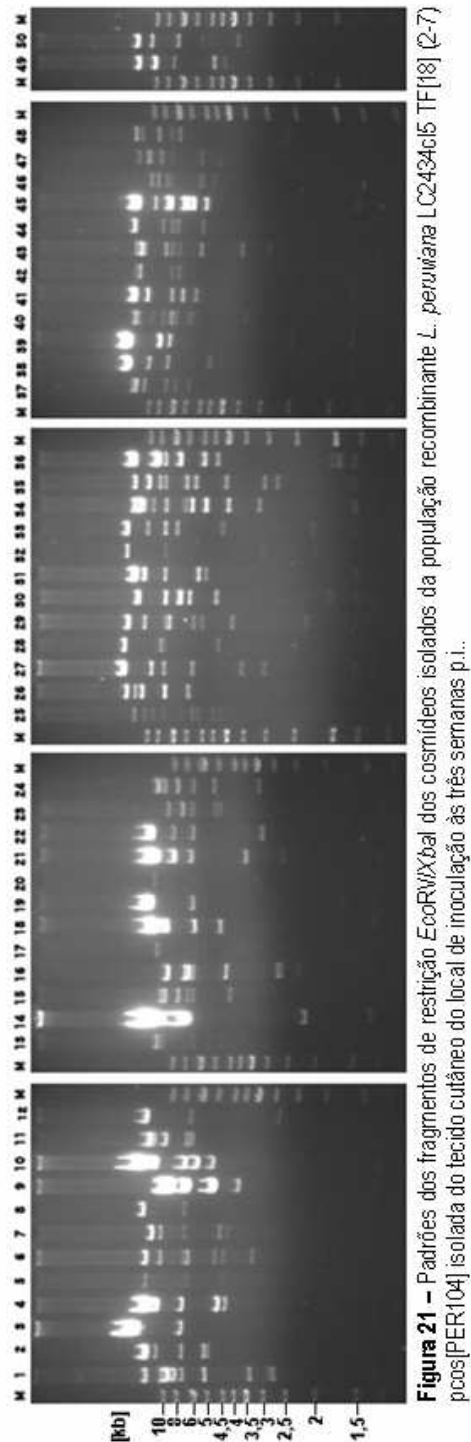
### 1.3. Meio Agar Luria Broth

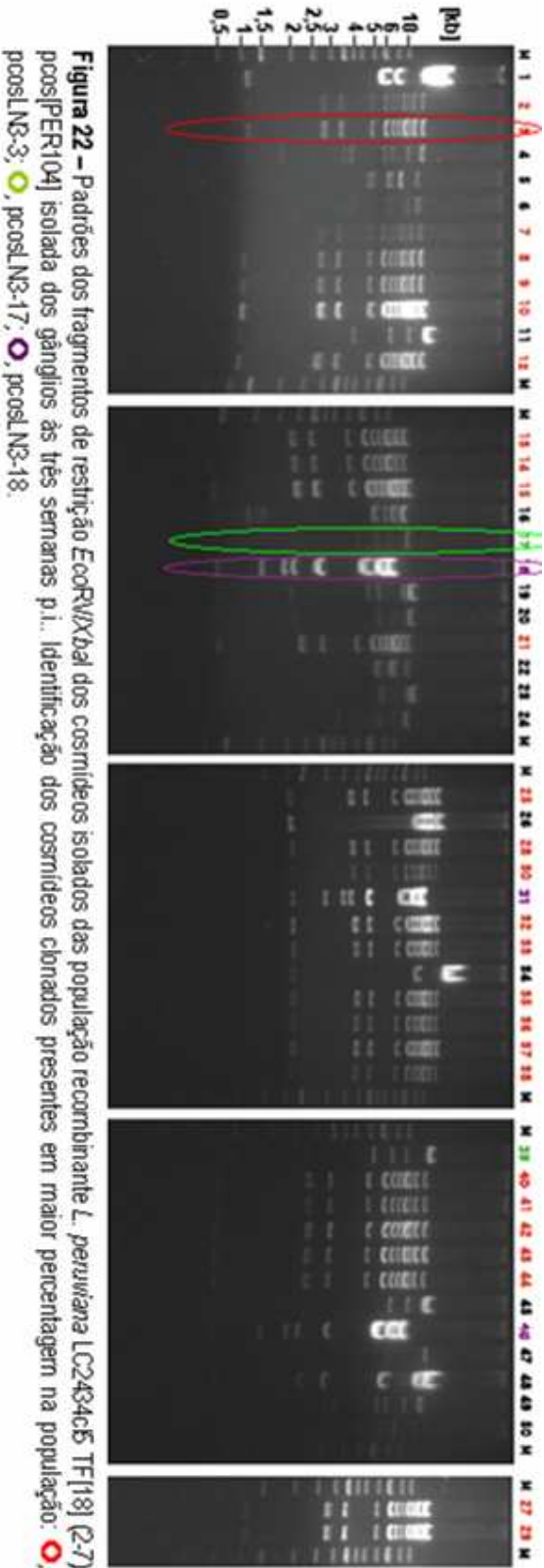
Meio de Agar LB (Normax, Biomedics) (10g triptona, 5g extracto de levedura, 5g NaCl, 15g de agar): dissolveu-se 35g num litro de água ultra pura e agitou-se sobre a chama. Distribui-se 250 ml em frascos de Roux 500 ml. Autoclavou-se 15 minutos a 121°C, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e conservou-se a 4°C. Para as placas de LB/ampicilina, fundiu-se o LB Agar, deixou-se arrefecer. Colocou-se 15 - 20 ml nas placas (Normax), deixou-se arrefecer à temperatura ambiente, com a tampa meio aberta na câmara de fluxo laminar. Por fim, o meio que continha ampicilina (Sigma) foi conservado ao abrigo da luz e todas as placas foram conservadas a 4°C.

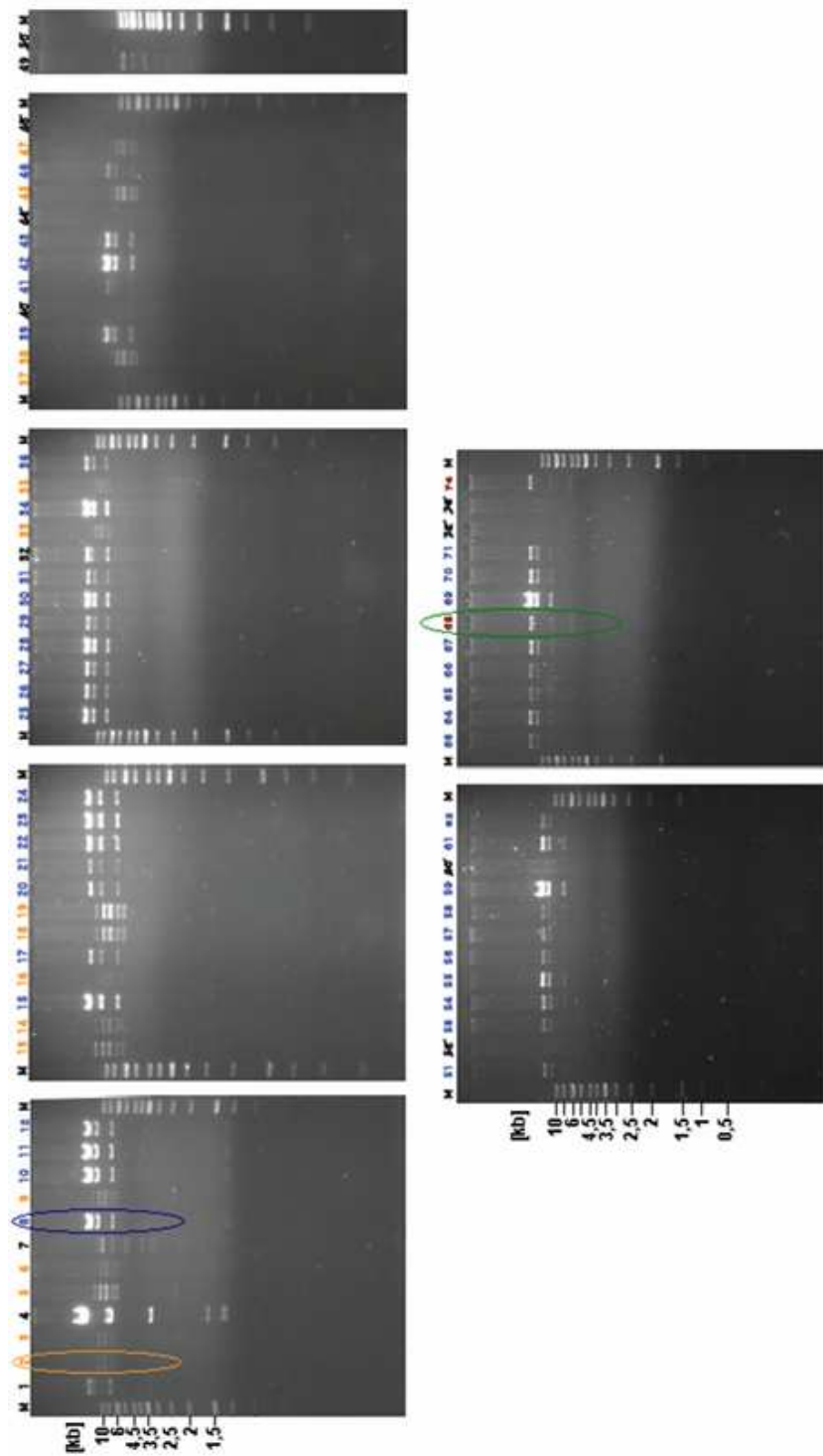
### 1.4. *Meio Luria Broth*

Meio Líquido Luria Broth (LB) (Normax) (10g triptona, 5g extracto de levedura, 5g NaCl): dissolveu-se 20g num litro de água ultra pura. Distribui-se 250 ml em frascos de 500 ml. Autoclavou-se 15 minutos a 121 °C, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. conservou-se a 4°C até à sua utilização. Quando foi necessário (selecção de colónias transformadas) adicionou-se ampicilina (Sigma) antes da utilização do meio.

## 2. Padrões de restrição dos clones cosmídicos após electroforese de campo invertido.







**Figura 23** – Padrões dos fragmentos de restrição EcoRV/XbaI dos cosmídeos isolados da população recombinante *L. peruviana* LC2434c15 TF18] (2-7) pcos[PER104] isolada do tecido cutâneo do local de inoculação às 24 semanas p.i.. Identificação dos cosmídeos clonados presentes em maior percentagem na população: ○, pcosIS24-2; ●, pcosIS24-8; ○, pcosIS24-68.

