

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FELIPE TROVALIM JORDÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A QUITINASE EM
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ENDÊMICAS DA AMÉRICA LATINA**

SANTO ANDRÉ

2018

FELIPE TROVALIM JORDÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A QUITINASE EM
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ENDÊMICAS DA AMÉRICA LATINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do ABC como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Aparecida
Sperança

**SANTO ANDRÉ
2018**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Trovalim Jordão, Felipe

Caracterização do gene que codifica a quitinase em
espécies de *Leishmania* endêmicas da América Latina /
Felipe Trovalim Jordão. — 2018.

36 fls. : il.

Orientadora: Márcia Aparecida Sperança

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do
ABC, Bacharelado em Ciências Biológicas, Santo André,
2018.

1. *Leishmania*. 2. Quitinase. 3. Leishmaniose. 4.
Sequenciamento. I. Aparecida Sperança, Márcia. II.
Bacharelado em Ciências Biológicas, 2018. III. Título.

RESUMO

Os protozoários do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae, possuem grande notoriedade por serem os agentes patogênicos da leishmaniose, parasitose que possui ampla distribuição em diversas regiões tropicais e subtropicais do Novo e Velho Mundo. O ciclo de vida desse parasita inclui dois hospedeiros: um vertebrado (predominantemente mamífero) e um inseto vetor da família Psychodidae, do gênero *Lutzomyia*, no continente americano. As espécies de *Leishmania* são naturalmente transmitidas no ambiente silvestre para vertebrados através da picada de vetores específicos de *Lutzomyia*. Estudos anteriores demonstram que o gene que codifica a quitinase é específico para as espécies que compõem o gênero *Leishmania* e permite assim, a identificação do parasita através da PCR. A investigação da quitinase codificada por um gene de cópia única altamente conservado entre as espécies de *Leishmania*, tem potencial para gerar informações inéditas para um melhor entendimento da relação filogenética das espécies desse grupo. Portanto, o gene da quitinase de seis espécies endêmicas da América Latina foi caracterizado. As amostras usadas no estudo foram obtidas da coleção de *Leishmania* da Fundação Instituto Oswaldo Cruz - RJ. As espécies de referência de *L. lainsoni*, *L. guyanensis*, *L. naifi*, *L. shawi*, *L. hertigi* e *L. equatoriensis* foram mantidas em meio de cultura. As culturas em crescimento exponenciais foram centrifugadas e usadas para extração de DNA. Usando oligonucleotídeos complementares às regiões conservadas do gene que codifica a quitinase do gênero *Leishmania*, foi amplificado um fragmento de PCR, que posteriormente foi clonado em vetor e submetido ao sequenciamento. Após análise do sequenciamento dos clones, foram obtidas seis sequências distintas da quitinase correspondente a cada espécie de *Leishmania* incluída no estudo, que foram caracterizadas e utilizadas para verificar sua validade na reconstrução filogenética do grupo. As espécies do subgênero *Viannia* (com exceção da *L. equatoriensis*) permaneceram como um grupo natural, enquanto que a *L. hertigi* ficou posicionada como grupo externo ao gênero. A *L. equatoriensis* permaneceu no gênero, porém, outros estudos demonstram que essa espécie seja pertencente à *Endotrypanum*, o que demonstra a necessidade de mais dados para determinar sua classificação filogenética.

Palavras-Chave : Leishmaniose, *Leishmania*, sequenciamento, quitinase

ABSTRACT

The protozoans from *Leishmania* genus, of the Trypanosomatidae family, possess a great notoriety for being the leishmaniasis etiological agent, a parasitosis with a wide distribution in several tropical and subtropical regions of the New and Old World. The parasite's life cycle includes two hosts: a vertebrate (predominantly mammal) and an insect vector from the Psychodidae family and *Lutzomyia* genus in the American continent. *Leishmania* species are naturally transmitted in wild environment to mammals through specific *Lutzomyia* vectors bite. Previous studies showed that the chitinase is encoded by a single copy gene and it's specific for the species that compose the *Leishmania* genus and thus, allow the parasite identification through PCR, and has the potential to generate unprecedented information for a better understanding of the phylogenetic relationships among the species in this group. Therefore, the chitinase gene of six species endemic to Latin America was characterized. The samples used in this study were obtained from the Fundação Instituto Oswaldo Cruz *Leishmania* collection - RJ. The *L. lainsoni*, *L. guyanensis*, *L. naifi*, *L. shawi*, *L. hertigi* and *L. equatoriensis* reference species were maintained in culture media. Exponential growth cultures were centrifuged and used for DNA extraction. By using complementary oligonucleotides to the *Leishmania* chitinase encoding gene conserved regions, a fragment from DNA of the species included in the study was amplified by PCR, cloned to a vector and submitted to sequencing. After sequence analysis of the fragments corresponding to the chitinase encoding gene of the six different *Leishmania* species included in this study, they were characterized and used in order to validate its use for *Leishmania* genus phylogenetic reconstruction. The species belonging to the *Viannia* subgenus (with *L. equatoriensis* being the exception) remained as a natural group, meanwhile *L. hertigi* was positioned as external group to the genus. *L. equatoriensis* remained in the genus, however, other studies showed that this species actually belongs to *Endotrypanum*, therefore more data is necessary to determine its phylogenetic classification.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania*, sequencing, chitinase

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
1. <i>Leishmania Viannia guyanensis</i>	8
2. <i>Leishmania Viannia naiffi</i>	9
3. <i>Leishmania Viannia lainsoni</i>	9
4. <i>Leishmania Viannia shawi</i>	10
5. <i>Leishmania Leishmania hertigi</i>	10
6. <i>Leishmania Viannia equatoriensis</i>	11
METODOLOGIA	12
1. Amostras das espécies <i>Leishmania</i>	12
2. Extração e quantificação de ácidos nucleicos	12
3. Obtenção do gene que codifica a quitinase das espécies de <i>Leishmania</i> incluídas no estudo	12
4. Clonagem e sequenciamento do produto de PCR do gene que codifica a quitinase	13
5. Verificação de homologia das sequências obtidas com sequências de quitinase já descritas	13
6. Alinhamento, construção de sequências-consenso, tradução e construção de árvores filogenéticas	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXO	28
1. Sequências de nucleotídeos dos clones construídas por consenso	28
1.1 – <i>Leishmania guyanensis</i>	28
1.2 – <i>Leishmania naiffi</i>	29
1.3 – <i>Leishmania lainsoni</i>	30

1.4 – <i>Leishmania shawi</i>	31
1.5 – <i>Leishmania hertigi</i>	32
1.6 – <i>Leishmania equatoriensis</i>	33
2. Sequências dos clones traduzidas.....	34
2.1 – <i>Leishmania guyanensis</i>	34
2.2 – <i>Leishmania naiffi</i>	34
2.3 – <i>Leishmania lainsoni</i>	35
2.4 – <i>Leishmania shawi</i>	35
2.5 – <i>Leishmania hertigi</i>	36
2.6 – <i>Leishmania equatoriensis</i>	36

INTRODUÇÃO

A leishmaniose ou leishmaníase é um conjunto de doenças que afetam algumas regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo. É causada pelo diverso grupo de protozoários flagelados parasitas de maioria zoonótica da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* e transmitida pelos insetos vetores da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Lutzomyia* nas Américas (ASHFORD, 2000). Essas doenças afetam o sistema fagocítico mononuclear e podem se manifestar em três formas distintas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. Considerando ambas as cutâneas e mucocutâneas em somente um grupo, podem também ser apenas classificadas como leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral.

Cada espécie de *Leishmania* possui um ciclo de vida próprio em que há a participação de hospedeiros vertebrados e vetores flebotomíneos em determinadas áreas geográficas (GRIMALDI; TESH, 1993). Pertencentes à classe Kinetoplastida, estes parasitas apresentam duas formas em seu ciclo de vida: a forma amastigota quando é encontrado em hospedeiros vertebrados e a forma promastigota flagelada quando é encontrado no intestino de flebotomíneos.

De acordo com a localidade em que ocorre a fase de desenvolvimento no intestino do vetor, estes foram agrupados em dois subgêneros denominados *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON, 2010). Esse estudo inclui cinco espécies do subgênero *Viannia* (*Leishmania guyanensis*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania shawi* e *Leishmania equatoriensis*) e uma classificada no subgênero *Leishmania* (*Leishmania hertigi*).

Entre os genes de cópia única no genoma das espécies de *Leishmania*, a quitinase possui uma grande relevância, pois é indispensável para o ciclo de vida desses parasitas. Essa enzima é a responsável pela liberação das formas promastigotas do parasita após a digestão da matriz peritrófica, composta de quitina, que inicialmente engloba o sangue ingerido fornecendo a proteção necessária para as formas amastigotas contra o sistema digestivo do flebotomíneo, permitindo a diferenciação das mesmas (PIMENTA et al., 1997). Outros estudos já indicavam que a quitinase também poderia ser responsável por facilitar a infecção parasitária, a sobrevivência dos parasitas nos vetores e a transmissão para os hospedeiros

mamíferos (SCHLEIN, JACOBSON et al. 1991; SCHLEIN et al. 1992). Em 1998, foi identificado pela primeira vez, o gene que codifica a quitinase em *L. donovani*, Ld Cht1 (Genbank: AF009354.1) (SHAKARIAN; DWYER, 1998) e a continuação desse trabalho mostrou que esse gene apresenta um alto nível de conservação em uma mesma espécie de *Leishmania* (SHAKARIAN; DWYER, 2000). Em 2005 foi caracterizada a quitinase (AAT42197.1) da *L. mexicana*, agrupando-a na família hidrolase-glicosil 18 e comprovando sua atividade extracelular pela confirmação da presença de peptídeo sinal na sua sequência gênica codificadora, LmexCht1 (GenBank AY572789.1) (JOSHI et al., 2005). Em 2008, um estudo confirmou que a quitinase é essencial para a sobrevivência e capacidade de infecção do parasita no hospedeiro mamífero (ROGERS et al., 2008). Outro estudo, em 2009, sugeriu que as quitinases que são produzidas pelos protozoários do gênero *Plasmodium* tem o potencial de serem alvos de bloqueio de transmissão da malária que o mesmo causa (TAKEO et al., 2009), mostrando assim a relevância que a quitinase possui no ciclo de vida dos protozoários patogênicos e levantando novas possibilidades de estudo da quitinase em *Leishmania*.

As *Leishmania* incluídas nesse estudo são a *L. guyanensis*, *L. naifi*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. hertigi* e *L. equatoriensis*. Maiores detalhes de cada uma dessas espécies são abordados a seguir.

1. *Leishmania Viannia guyanensis*

Esta espécie é altamente presente nas áreas que englobam a Guiana Francesa, Guiana, Suriname e os estados brasileiros do norte que fazem fronteira com esses países (ROTUREAU et al., 2006).

A leishmaniose que esta espécie causa é conhecida popularmente na Guiana Francesa como “*pians-bois*”, “*bosch-yaws*” no Suriname ou “*piã das florestas*” no Brasil e predominantemente causa lesões cutâneas ulcerosas (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994) . Além do homem, os principais hospedeiros vertebrados para essa espécie são os mamíferos da ordem *Edentata* (principalmente o bicho - preguiça da espécie *Choloepus didactylus* e o tamanduá da espécie *Tamandua tetradactyla*) e também os marsupiais da ordem *Didelphis*. Seu vetor transmissor principal é o flebotomíneo *Lutzomyia umbratilis* (LAINSON et al., 1994).

A alta prevalência de *L. guyanensis* em certas áreas, ocorre devido a proximidade das habitações humanas à florestas, onde os insetos vetores são

atraídos pelas luzes das casas durante a noite, tornando o homem um potencial alvo de picadas do mosquito e por consequência, ser infectado pelo parasita (RANGEL; LAINSON, 2009). Um estudo que monitorou a ocorrência de leishmaniose por *L. guyanensis* em um vilarejo na Guiana Francesa chegou às mesmas conclusões, após observarem que a transmissão da doença cessou após um desflorestamento de 400 – 500 m em torno da comunidade (ESTERRE et al., 1986). Para um maior controle da leishmaniose nas áreas de maior incidência do parasita, um método de diagnóstico com alta especificidade pode se mostrar muito útil.

2. *Leishmania Viannia naiffi*

Esta espécie foi descrita primeiramente após serem isoladas de tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* no estado do Pará (LAINSON; SHAW, 1989). A região de endemia do parasita são as áreas de floresta amazônica dos estados do Pará, Rondônia e Amazonas (NAIFF et al., 1991), porém, há registro de casos fora dessas áreas, como no Suriname (VAN THIEL et al., 2010).

Além do homem, os principais hospedeiros vertebrados são os já mencionados tatus (*D. novemcinctus*) e os vetores são os flebotomíneos das espécies *Lutzomyia Psychodopygus paraensis*, *Lutzomyia Psychodopygus ayrozai* e *Lutzomyia Psychodopygus squamiventris* (LAINSON et al., 1994).

A *L. naiffi* é raramente encontrada no homem e as lesões causadas por sua leishmaniose são geralmente benignas, únicas e pequenas, localizadas nos braços, mãos e pernas (NAIFF et al., 1991). Ao mesmo tempo, estudos mostraram que em hamsters, esse patógeno causa lesões praticamente imperceptíveis (LAINSON; SHAW, 1989). As lesões causadas são de cura espontânea relativamente alta e em alguns casos nem chegam a apresentar sintomas visíveis. Além disso, por circular em áreas que são comuns a outras espécies de *Leishmania*, alguns estudos sugerem que a real distribuição da *L. naiffi* na região de endemia é subestimada (FAGUNDES-SILVA et al., 2015).

3. *Leishmania Viannia lainsoni*

Essa espécie do parasita foi descrita pela primeira vez após terem sido isoladas de pacientes humanos de diferentes localidades do estado do Pará (SILVEIRA et al., 1987). Sua distribuição geográfica abrange as regiões de floresta amazônica do Brasil nos estados do Pará, Amapá e Rondônia (SILVEIRA et al.,

1987, 1991), na região sub-andina do Peru (LUCAS et al., 1994) e na Bolívia (BASTRENTA et al., 2002). No Brasil, além do homem, o principal hospedeiro mamífero é a paca *Agouti paca* da ordem dos *Rodentia* e seu vetor inseto é o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia ubiquitalis* (SILVEIRA et al., 1991).

A leishmaniose em humanos causada por *L. lainsoni* possui uma baixa frequência, e quando ocorre acarreta em lesões ulcerosas cutâneas únicas. (SILVEIRA et al., 1987). O vetor desse parasito não possui um comportamento muito antropofílico, o que explicaria a infecção no homem por esse parasita ser mais incomum, porém conforme houver a tendência de expansão de áreas de habitação para as florestas e regiões de habitat do flebotomíneo, a chance de que a *L. lainsoni* se torne um parasita mais frequente em humanos pode aumentar (CORRÊA; BRAZIL; SOARES, 2005).

4. *Leishmania Viannia shawi*

Descrito pela primeira vez em 1989 a partir de isolados de duas espécies de macacos (*Cebus apella* e *Chiropotes satanas*), duas de bicho-preguiça (*Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*) e uma de Procyonidae (*Nasua nasua*) (LAINSON et al., 1989).

Sua distribuição geográfica abrange os locais de floresta amazônica no estado do Pará e arredores próximos (LAINSON, 2010). Seu vetor, o flebotomíneo *Lutzomyia whitmani*, é a mesma espécie que transmite a *Leishmania braziliensis* no estado da Bahia, entretanto, o segundo possui o diferencial de ser altamente antropofílico e de ser normalmente encontrado em casas, enquanto que o primeiro possui como habitat ambientes mais silvestres e raramente pica o homem (RANGEL et al., 1996). Essa diferença em comportamento sugere que o vetor de *L. shawi* seja na realidade parte de um complexo de *Lu. whitmani*, porém seriam necessários mais dados para se chegar à essa conclusão (LAINSON, 2010; READY et al., 1997).

A leishmaniose que a *L. shawi* causa em humanos é do tipo cutânea, normalmente, acarretando em lesões únicas, porém já foi observado devido à metástase, casos em que houve a apresentação de lesões múltiplas (LAINSON, 2010).

5. *Leishmania Leishmania hertigi*

Descrita pela primeira vez em isolados de uma espécie de porco - espinho

(*Coendou rothschildi*) no Panamá (HERRER, 1971), esta espécie possui distribuição nas regiões de floresta tropical do Panamá e Costa Rica. Seu vetor é desconhecido, porém pode-se inferir que ele se encontra nas mesmas localidades que o seu hospedeiro vertebrado, que vive em tocas de árvores ocas (NOYES et al., 1997). A infecção em seu hospedeiro conhecido é assintomática e não há registros de infecção em humanos, que pode ser por incapacidade do parasita afetar humanos ou porque seu vetor desconhecido não ser antropofílico (LAINSON, 2010).

Esta espécie, única pertencente ao subgênero *Leishmania* deste estudo, é alvo de discussão desde 1997 em relação à sua classificação taxonômica devido à análises moleculares, como sequências de genes conservados que mostram que essa espécie pode pertencer na verdade ao gênero *Endotrypanum*, que faz parte da mesma família que *Leishmania*, os Trypanosomatidae (MARCILI et al., 2014; MOMEN; CUPOLILLO, 2000; NOYES et al., 1997).

6. *Leishmania Viannia equatoriensis*

Descrito em 1992 a partir de isolados de uma espécie de esquilo (*Sciurus granatensis*) e de bicho - preguiça (*Choloepus hoffmanni*) (GRIMALDI JÚNIOR et al., 1992), o que se sabe sobre esta espécie é que sua distribuição geográfica limita-se à costa do Equador e que seu vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia hartmanni* (LAINSON, 2010). No período em que foi descoberta não foi encontrado nenhuma infecção humana, porém, um estudo encontrou dois isolados humanos de pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea contendo *L. equatoriensis*, o que sugere uma capacidade de infectar o homem (RAMÍREZ et al., 2016). Entretanto, como o próprio artigo alerta, há dados moleculares que sugerem a necessidade de uma revisão da classificação filogenética desta espécie, que assim como *L. hertigi*, poderia ser incluída no gênero *Endotrypanum* (MARCILI et al., 2014).

Um marcador molecular que permita um desenvolvimento de diagnósticos específico e sensível pode auxiliar no controle das leishmanioses causadas por essas espécies. Além disso, esse mesmo marcador pode ter potencial para trazer dados significativos para a reconstrução da filogenia desse grupo. É possível que a quitinase seja uma boa candidata para ser esse marcador, portanto, esse projeto teve por objetivo a obtenção da sequência do gene que codifica a quitinase de *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. hertigi* e *L. equatoriensis*.

METODOLOGIA

1. Amostras das espécies *Leishmania*

As amostras de referência de *Leishmania* utilizadas no estudo foram obtidas da coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz do Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de Leishmania, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. As culturas de *Leishmania* referência das espécies *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. equatoriensis*, *L. hertigi* e *L. lainsoni*, foram mantidas em meio de cultura M199 e as culturas em crescimento exponencial foram centrifugadas e utilizadas para extração de DNA.

2. Extração e quantificação de ácidos nucleicos

Para obtenção de DNA das amostras das culturas de parasitas *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. equatoriensis*, *L. hertigi* e *L. lainsoni*, foi utilizado *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (QIAGEN®, Valencia, CA, USA) segundo instruções do fornecedor. A quantificação e a determinação da qualidade do DNA de cada uma das amostras foram obtidas após eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de DNA coradas com GelRed (Biotium – Uniscience). A quantificação de DNA foi feita com utilização do marcador de massa *Low Mass Ladder* da Invitrogen como padrão.

3. Obtenção do gene que codifica a quitinase das espécies de *Leishmania* incluídas no estudo

A obtenção da sequência que codifica o gene da quitinase de *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. equatoriensis*, *L. hertigi* e *L. lainsoni* foi feita por PCR com oligonucleotídeos complementares à regiões conservadas do gene que codifica a quitinase das espécies de *Leishmania* e que permitem a amplificação de um fragmento específico de 958pb (Tabela 1). Os fragmentos de PCR das amostras positivas para o gene que codifica a quitinase de *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L.*

equatoriensis, *L.hertigi* e *L. lainsoni*, foram purificados e submetidos a clonagem em vetor pGEM-T (Promega).

Tabela 1 – Descrição dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Nome	Sequencia (5'-3')	Condições	Especificidade	Amplicon
LChit_22 4F	GTTCM*ACTACGAGGCCTTCTTCAA	94°C 3'/40x 94°C 30"- 64°C 30"- 72°C 30"/72 °C 7'	<i>Leishmania sp</i>	958pb
L. Chit 1182R	CAGATCATTATCCCAGACAAGTT			
M13F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAA	94°C 3'/40x 94°C 30"- 55°C 30"- 72°C 1'/72°C 7'	Vetor pGEM-t	Inserito +100pb
M13R	AGCGGATAACAATTTACACAGG			

* A ou T

4. Clonagem e sequenciamento do produto de PCR do gene que codifica a quitinase

Os produtos amplificados por meio da *PCR* foram ligados pela afinidade AT ao plasmídeo *pGEM-T* (Promega) e posteriormente transformados em bactérias *Mach T1*; os clones transformantes (selecionados por *miniscreen* de acordo com Sambrook *et al.*, 1989 e digestões com enzima *Eco RI*), foram sequenciados utilizando-se *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer) em sequenciador automático ABI 310, com utilização dos oligonucleotídeos M13F e M13R, presentes no vetor pGEM-T (Tabela 1).

5. Verificação de homologia das sequências obtidas com sequências de quitinase já descritas

As sequências de cada um dos clones selecionados foram utilizadas para comparação com as sequências disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*,

1990). Em ambas as fitas foi realizada a verificação de homologia com sequências de quitinase de outras espécies de *Leishmania* já descritas.

6. Alinhamento, construção de sequências-consenso, tradução e construção de árvores filogenéticas

As sequências dos clones de cada espécie que mostraram homologia foram selecionadas, alinhadas e sequências-consenso foram obtidas para cada espécie através do módulo SeqBuilder. Foi feita a tradução pelo módulo Editseq e o alinhamento e árvores filogenéticas pelo Megalign, todos do pacote de softwares Lasergene 7 da DNASTAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizar testes com diferentes temperaturas de associação em reação de PCR com os oligos que amplificam o gene que codifica a quitinase de espécies de *Leishmania*, foram obtidos fragmentos de tamanho esperado, com aproximadamente 1 Kb, para as 6 espécies de *Leishmania* incluídas no estudo. Os fragmentos foram purificados e utilizados para clonagem em vetor pGEM-T. Após análise por PCR com os oligos M13F e M13R de diferentes colônias de bactérias resistentes a ampicilina, de cada uma das espécies de *Leishmania*, foram selecionados clones recombinantes, os quais foram submetidos ao sequenciamento (Figura 1):

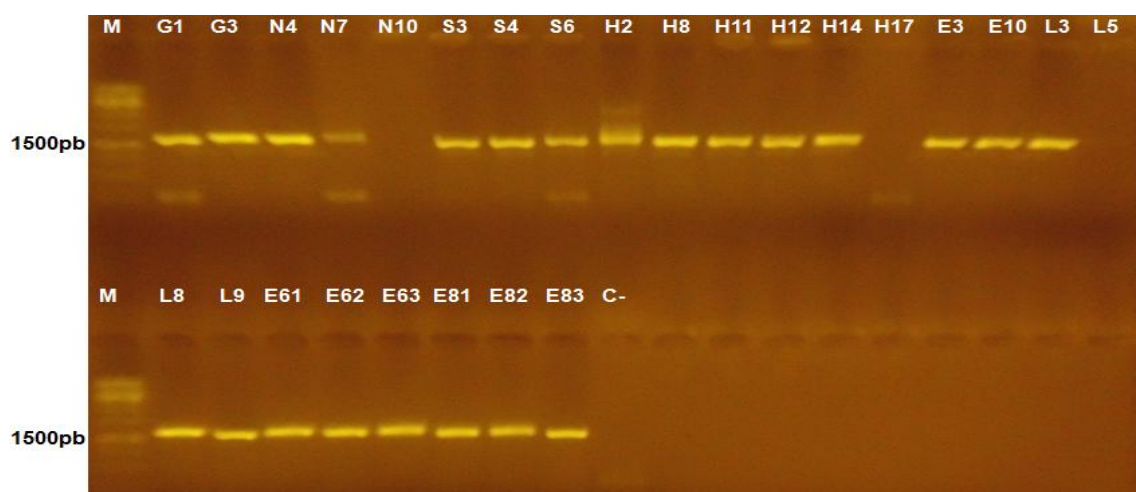


Figura 1 - Eletroforese com gel de agarose 1% da PCR dos clones com oligos M13 e purificados. M - Marcador 1kb, G: *L. guyanensis*, N: *L. naiffi*, L: *L. lainsoni*, S: *L. shawi*, H: *L. hertigi*, E: *L. equatoriensis*, C-: Controle negativo. Amostras N10, H17 e L5 foram descartadas.

Através do sequenciamento pelo método de Sanger, foram obtidas sequências que, para verificação de homologia com outras quitinases de *Leishmania* já disponíveis no Genbank, foram submetidas à ferramenta BLAST. Posteriormente, cada sequência foi conferida nas duas fitas e foi feito um consenso para cada clone utilizando o software SeqBuilder do Lasergene. Ao final, foram obtidas seis sequências de nucleotídeos referentes a cada espécie incluída no estudo que também foram traduzidas utilizando o software Editseq também do Lasergene. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos estão disponíveis na seção ANEXO.

As sequências obtidas neste trabalho são um consenso do resultado do

sequenciamento de diferentes clones em pGEM-T de cada um dos produtos de PCR obtidos com os oligos LChit224F e LChit1182R (Tabela 1). Ao alinhá-las com sequências de quitinase de outras espécies de *Leishmania* e organismos mais distantes disponíveis no banco de dados, pode-se obter duas árvores filogenéticas pelo método de distância: uma por substituição de nucleotídeos (Figura 2) e outra por substituição de aminoácidos (Figura 3).

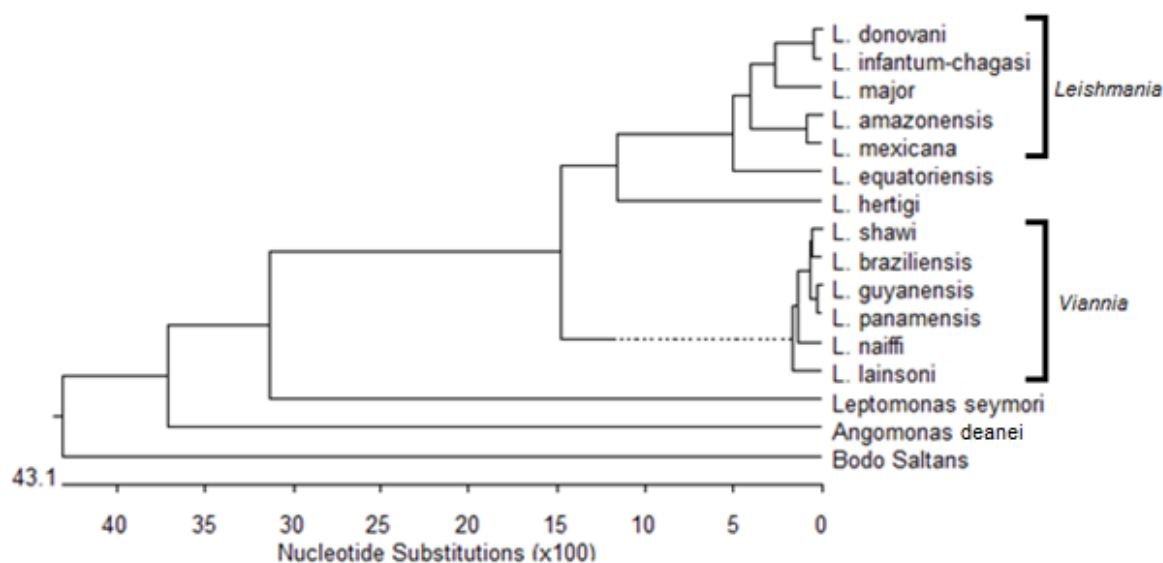


Figura 2 – Árvore filogenética de substituição de nucleotídeos do gene que codifica a quitinase em *Leishmania* e grupos externos

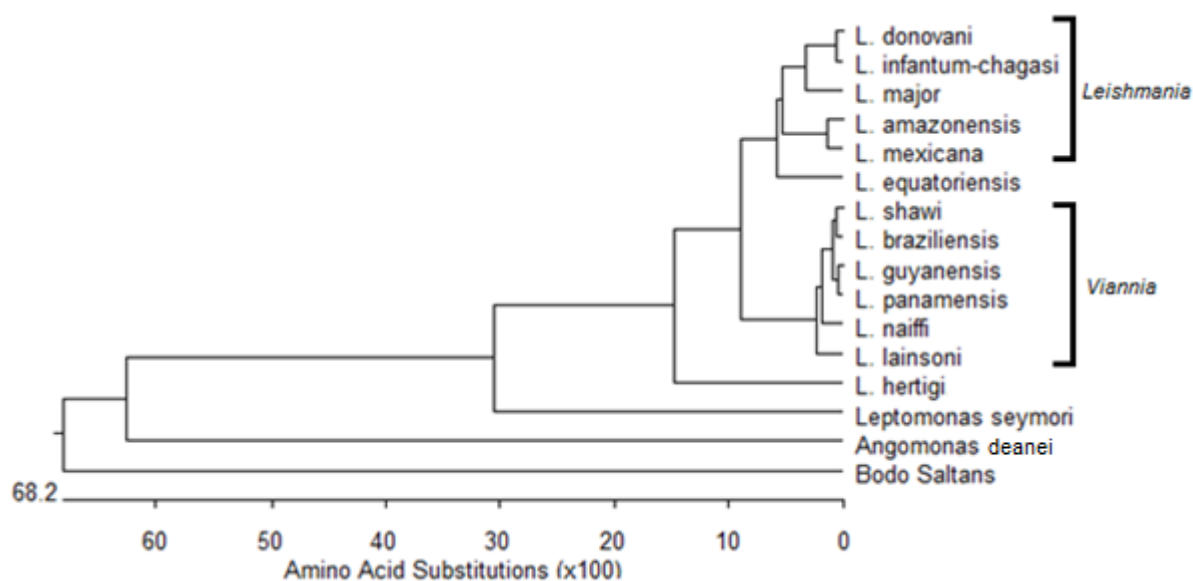


Figura 3 – Árvore filogenética de substituição de aminoácidos da tradução do gene que codifica a quitinase em *Leishmania* e grupos externos

Com o uso da ferramenta BLAST, foi possível verificar que todas as espécies incluídas no estudo possuem identidade própria, pois suas sequências não são idênticas às de nenhuma outra espécie disponíveis no banco de dados.

É possível notar através das árvores contruídas com base na quitinase (Figuras 2 e 3), que as espécies do subgênero *Viannia* permanecem como um grupo natural, com a *L. shawi* mais próxima à *L. braziliensis*, compartilhando um ancestral em comum com *L. guyanensis* e *L. panamensis* que são mais próximas entre si, a *L. naiffi* mais basal em relação à essas quatro anteriores e a *L. lainsoni* sendo a mais basal de todo este subgênero. Essas relações filogenéticas são condizentes à biogeografia destas espécies. Considerando que a *L. panamensis* possui uma distribuição geográfica que abrange alguns países ao sul da América Central continental (Panamá, Costa Rica, Honduras) e compartilha as regiões ao norte do rio Amazonas com a *L. guyanensis* (LAINSON, 2010), é coerente que elas sejam as mais próximas entre si, possuindo um ancestral em comum. No caso da *L. shawi* e *L. braziliensis*, ambas são encontradas em diversas áreas da floresta amazônica, mas com maior concentração no estado do Pará (LAINSON, 2010), o que é coerente com a relação evolutiva que as duas demonstraram com os dados deste estudo. A *L. naiffi*, por possuir características mais primitivas, é considerada mais basal que as quatro espécies anteriores, fato que se repete ao utilizarmos a quitinase como critério. Por fim, a *L. lainsoni* possui muitas características que são comuns ao subgênero *Leishmania* (SILVEIRA et al., 1987; CORRÊA et al., 2005; FERNANDEZ et al., 1995; ERESH et al., 1995), sendo então considerada como a espécie mais basal do subgênero *Viannia*. Portanto, assim como a *L. naiffi*, sua posição na árvore filogenética de *Viannia* como tendo origens mais basais, é confirmada com o uso da quitinase como critério. Esses dados são condizentes ao que se encontra em outros trabalhos de filogenia utilizando outros marcadores moleculares (CUPOLILLO et al., 2000; MARCILI et al., 2014; POTHIRAT et al., 2014).

Apesar da *L. equatoriensis* e a *L. hertigi* estarem historicamente incluídas nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* respectivamente, há diversos estudos que sugerem uma revisão dessas classificações, pois os dados apontam que essas espécies são na verdade pertencentes ao gênero *Endotrypanum*, que por sua vez é grupo-irmão de *Leishmania*. Neste estudo, ao observarmos as árvores filogenéticas construídas, podemos perceber que há uma discrepância da posição dessas duas

espécies com relação ao critério adotado. Se for utilizado a substituição de nucleotídeos (Figura 2), tanto a *L. hertigi* quanto a *L. equatoriensis* se encontram posicionadas como grupo externo do subgênero *Leishmania*, mas ainda dentro do gênero. No caso da árvore em que a substituição de aminoácidos foi utilizada como critério (Figura 3), a *L. hertigi* se torna grupo externo ao gênero, enquanto que a *L. equatoriensis* mantém sua condição de grupo mais basal do subgênero *Leishmania*.

Essa diferença entre as árvores construídas pode ser explicada devido às substituições sinônimas, ou seja, substituições de nucleotídeos que não alteram o aminoácido traduzido. Para testar essa hipótese foram alinhadas as duas sequências de nucleotídeos e aminoácidos da *L. hertigi* e *L. equatoriensis*, as substituições encontradas destacadas e diferenciadas em sinônimas e não-sinônimas (Figuras 4 e 5).

		10	20	30	
1	A A T C T C C C C T T C T T C A G C G C G G A G G T G G A T				L. hertigi
1	- - - - - G T G C C G A G G T G G A C				L. equatoriensis
		40	50	60	
31	C C A G T G A C C T T G C G C C T C A C T C A T G T A G A T				L. hertigi
15	C C C G C A A C C T T G C G T C T C A T C C A C G T A G A T				L. equatoriensis
		70	80	90	
61	G A C C G T T T G C C G T C T G G T G G C G A G T G G G C C				L. hertigi
45	G A C C G A C T G C C A T C G G G C G A C G A G T G G G C C				L. equatoriensis
		100	110	120	
91	C G C A T T C G C C G A T T G G C A G A C C T G C A C G G C				L. hertigi
75	C G C A T C C G C C G G C T G G C A G A C C T G C A C G G T				L. equatoriensis
		130	140	150	
121	A C C A A G C T G A T G C T C T G C A T T G G T G G T G G C				L. hertigi
105	G C G A A A C T G A T G C T C T G C A T C G G C G G T G G T				L. equatoriensis
		160	170	180	
151	G G T C G C A G T T C C G G G T T T G C G G A C C T C G T C				L. hertigi
135	G G C C G C A G C T C C G G G T T T G C G G A C C T C G T C				L. equatoriensis
		190	200	210	
181	G G G G A C G C A G T G A A G C G G C A A G C G T T C A T T				L. hertigi
165	G G G G A C A C G G T G C A G C G A C A A G C G T T C A T A				L. equatoriensis
		220	230	240	
211	G A A G A A A C G A A G G C G G T G C T G C T G G C G C G A				L. hertigi
195	G A G G A G G T G A A C G C G G T G C T G C T G G C G C G A				L. equatoriensis
		250	260	270	
241	A G C C T G G A C G G C A T C G A C T T C A A C T G G G A G				L. hertigi
225	A A A C T C G A C G G C A T A G A C T T C A A C T G G G A G				L. equatoriensis
		280	290	300	
271	T A T C C G C A G A C G A T G A C G G A G T G G C T G A A T				L. hertigi
255	T A C C G C A A A C A A T G A C G G A G T G G C T G A A C				L. equatoriensis

	310	320	330	
301	T T C G G C C G C T T C C T G C A A G A C C T C C G A T C T	L. hertigi		
285	T T T G G C C G C T T C C T A C T G G A G C T C C G G T C T	L. equatoriensis		
	340	350	360	
331	G C C T T G G G T T A T A T G G A C G C C A C C G G A G G C	L. hertigi		
315	G C C C T G G G T T A T G C T C C C G C C T G T A G G A A G A	L. equatoriensis		
	370	380	390	
361	G A A G G C G C A G C T G C A C C C A T T G T C G A G C G G	L. hertigi		
345	G A A C A C G C A G C T G G A C T G A T C G G T G A G C G G	L. equatoriensis		
	400	410	420	
391	C G C C A C C A T A C T C G A G T A G G G C G C A C C C T C	L. hertigi		
375	C A C C A C C G C A C C G A G T G C G G C G C G C C G T C	L. equatoriensis		
	430	440	450	
421	T T G T C T A T G G C C C T T C A T C C T C A T T C G T C C	L. hertigi		
405	T T G T C C A T G G C C C T C C A T C C T C A T T C G T C T	L. equatoriensis		
	460	470	480	
451	A T C T C A A C T G T G C T G C A G T C C A C T G G T G T G	L. hertigi		
435	A T T G C A G C T G T A C T G C A G T C C G C T C G A G T G	L. equatoriensis		
	490	500	510	
481	C T T C A G T C G C T G G A T T A T G T A C A C T G G A T G	L. hertigi		
465	C T T C G C T C G C T C G A C T A C G T G C A C T G G A T G	L. equatoriensis		
	520	530	540	
511	G C G T A C G A C C A C G T T G T C G G G A C T G A G C C A	L. hertigi		
495	G C A T A T G A C C A T A T T C T C G A G A C C G A G C C A	L. equatoriensis		
	550	560	570	
541	C A C A G T T C G G T T G A G T A C G C T G C C T C G G T G	L. hertigi		
525	C A C A G C T C G G T C G A G T A C G C T G C C T C G G T G	L. equatoriensis		
	580	590	600	
571	C T C A G A G A G G A G A T G A T T G G G C C T T T T A G G	L. hertigi		
555	C T C A G C G A G G A G A C A A T T G G G C T C T T T A G C	L. equatoriensis		

		610	620	630	
601	G A G G C T T C G T A T G A C A G G C G C C G T G G G C A G				L. hertigi
585	G A G G C T G C A T A C A A C A G G C G C C T T G G G C A G				L. equatoriensis
		640	650	660	
631	A C G C A C C G G C G C C C C G C G C C G A G C A G A A C				L. hertigi
615	A T G C A C C G G C G G C C G C G C A C C G A G C A G G A C				L. equatoriensis
		670	680	690	
661	C A C C G C T G T A T G C T C A C C C T T G G G A T T C C T				L. hertigi
645	C A C C G C C G C A A G C T C A C C C T T G G T A T C C C C				L. equatoriensis
		700	710	720	
691	T T C T A T G G C C G T C A T C G A G T G G A C A G G C A A				L. hertigi
675	T T C T A C G G C C G T C A T C G A G A G G A C A G G C G A				L. equatoriensis
		730	740	750	
721	C T G C C G C C C C A G A C G T A C G A G C A A C T C T G G				L. hertigi
705	C T G C A G C C T G A G G C G T A C G A C C G C C T C T G G				L. equatoriensis
		760	770	780	
751	C T C T C C A T T C G A C A A T G G G C G A A G G A G A A G				L. hertigi
735	C T C T T C A T C C A A G A A T G G G C T A G C A A G A A C				L. equatoriensis
		790	800	810	
781	C A C C C A A C G T G G G T C G A G G G A G G G G C G G A G				L. hertigi
765	C A C C C A A C A T G G G T C G A G G G A G G A G C G G A G				L. equatoriensis
		820	830		
811	C T G C G C G C C T T G A G T G A G T A C G C C - - - - C				L. hertigi
795	C T G C G G G C A T T G A G C G A G T A T G G C G G G T A C				L. equatoriensis
836	A G				L. hertigi
825	A G T T T C A C C G G C T A C G A C G A T G T G A A G C G C				L. equatoriensis
837					L. hertigi
855	A A G A T G C T A C C T A C A C G C G T				L. equatoriensis

Figura 4 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos que codifica a quitinase em *L. hertigi* e *L. equatoriensis*. Em verde estão destacadas as substituições sinônimas e em vermelho as não-sinônimas

	10	20	30																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
1	NLPFFSAEVD	PVTLRL	LIHVDD	RLPSGG	EWAL. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
1	- - - - -	AEVD	PA	TLRL	LIHVDD	RLPSGD	EWAL. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	40	50	60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
31	RIRRLADLH	GTKMLC	IGGGGR	SSSGFAD	LV L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
25	RIRRLADLH	GA	KMLC	IGGGGR	S	SSSGFAD	LV L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	70	80	90																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
61	GDAVKRQAF	IEETKAV	LLARSL	DGIDFN	WE L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
55	GDTVQRQAF	IEEVN	AVLLAR	KLDGID	FNWE L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	100	110	120																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
91	YPQIMTEWL	NFGRFL	QDLRSAL	GYMDAT	IGG L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
85	YPQIMTEWL	NFGRFL	LLELR	SALGY	APAVGR	L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	130	140	150																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
121	EGAAAPIVER	RRHHTRV	GRITLL	SMA	LHPHSS L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
115	EHAAGLIGER	HHRT	VRRA	VL	SMA	LHPHSS L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	160	170	180																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
151	ISTVLQST	GVLSLD	YVHWMAY	DHVVGT	EP L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
145	IAAVLQ	SARVLS	LDYVHWMAY	DHILET	EP L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	190	200	210																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
181	HSSVEYAAS	SVLREEM	IGPFRE	ASYDRRR	GQ L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
175	HSSVEYAAS	SVLSEET	IGLFS	EAYNRR	LGQ L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	220	230	240																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
211	THRRPRAE	QNHRC	MLTLG	IPFYGR	HRVDRQ L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
205	MHRRPRT	EQDHR	RKLT	LGLIPF	YGRHRE	DR L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	250	260	270																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
241	LPPQITYEQ	LWLSIR	QWAKE	KHPTW	VEGGAE L. hertigi																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
235	LQPEAYDR	LWLFIQ	EWASKN	HP	TWVEGGAE L. equatoriensis																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
	280	290																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
271	LRA	LSEYA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- -

Figura 5 - Sequência de aminoácidos obtidas após tradução da sequência de nucleotídeos do gene que codifica a quitinase em *L. hertigi* e *L. equatoriensis*. Em verde os aminoácidos cujo códon sofreram substituição sinônima e em vermelho os que sofreram substituição não-sinônima.

Ao observar esses alinhamentos, pode-se observar que houve 69 substituições sinônimas e 84 substituições não-sinônimas (resultando em 57

aminoácidos substituídos). Portanto, pode-se afirmar que sim, a diferença entre as árvores filogenéticas obtidas foram devido à muitas alterações de nucleotídeos de forma sinônima, o que acabou diferenciando a posição dessas duas espécies nos dois tipos de árvores. Devido aos dados da literatura e que substituições não-sinônimas são as que podem causar as alterações funcionais na proteína, que por sua vez podem levar à especiação, o mais provável é que a árvore de substituição de aminoácidos seja a mais próxima da relação filogenética verdadeira das *Leishmania* utilizadas no estudo.

Percebe-se também que ao observar os nós mais basais das árvores, os táxons mais externos à *Leishmania* como os da mesma família Trypanosomatidae (*Leptomonas seymori* e *Angomonas deanei*) e o de mesma classe Kinetoplastida (*Bodo saltans*), que a quitinase é um ótimo marcador molecular por ter alto grau de conservação e especificidade em todo esse grupo de organismos.

Com a realização deste trabalho, foi possível obter seis sequências inéditas do gene que codifica a quitinase em espécies de *Leishmania*. A informação adquirida com estas sequências permitem aplicações que variam desde construção de oligonucleotídeos para diagnóstico molecular específico de leishmaniose até a reconstrução da filogenia de *Leishmania*. Por seu alto grau de conservação e especificidade, a quitinase pode possuir potencial para o uso em táxons mais basais da família dos tripanosomatídeos, o que abre novas possibilidades para futuros estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.
- BASTRENTA, B. et al. First evidence of transmission of *Leishmania (Viannia) lainsoni* in a Sub Andean region of Bolivia. **Acta tropica**, v. 83, n. 3, p. 249–253, set. 2002.
- CORRÊA, J. R. et al. Axenic promastigote forms of *Leishmania (Viannia) lainsoni* as an alternative source for *Leishmania* antigen production. **The Journal of parasitology**, v. 91, n. 3, p. 551–556, jun. 2005.
- CORRÊA, J. R.; BRAZIL, R. P.; SOARES, M. J. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus: a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 687–692, out. 2005.
- CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 4, p. 142–144, abr. 2000.
- ERESH, S. et al. *Leishmania (Viannia) lainsoni* occupies a unique niche within the subgenus *Viannia*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 231–236, 1995.
- ESTERRE, P. et al. Evaluation of a cutaneous leishmaniasis control program in a forest village of French Guyana. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, n. 4, p. 559–565, 1986.
- FAGUNDES-SILVA, G. A. et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 797–800, set. 2015.
- FERNANDEZ, O. et al. *Leishmania lainsoni*: a peculiar *Viannia* species. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 89, n. 1, p. 81–82, fev. 1995.
- GRIMALDI JÚNIOR, G. et al. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 2, p. 221–228, 1992.
- GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and

implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

HERRER, A. *Leishmania hertigi* sp. n., from the Tropical Porcupine, *Coendou rothschildi* Thomas. **The Journal of Parasitology**, v. 57, n. 3, p. 626, jun. 1971.

LAINSON, R. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 64, n. 3, p. 200–207, 19 ago. 1989.

JOSHI, M. B. et al. Molecular Characterization, Expression, and in Vivo Analysis of *LmexCht1*: THE CHITINASE OF THE HUMAN PATHOGEN, *LEISHMANIA MEXICANA*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3847–3861, 4 fev. 2005.

LAINSON, R. et al. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435–443, set. 1994.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, v. 64, n. 1, p. 3–9, 1989.

LUCAS, C. M. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*: first isolation in Peru. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 51, n. 5, p. 533–7, nov. 1994.

MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and *gGAPDH* genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum* *chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44–51, 1 jul. 2014.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. S359–S375, 26 jul. 1994.

MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 583–588, ago. 2000.

NAIFF, R. D. et al. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi*

- Lainson & Shaw, 1989. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 317–321, set. 1991.
- NOYES, H. A. et al. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: Their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 511–517, set. 1997.
- POTHIRAT, T. et al. First Isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: Case Report, Identification as *Leishmania martiniquensis* and Phylogenetic Position within the *Leishmania enriettii* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3339, 4 dez. 2014.
- PIMENTA, P. F. P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v. 115, n. 4, p. S0031182097001510, out. 1997.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937–954, nov. 2009.
- RAMÍREZ, J. D. et al. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28266, 2016
- RANGEL, E. F. et al. Variation between Geographical Populations of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 43–50, fev. 1996.
- READY, P. D. et al. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v. 87, n. 02, p. 187, 10 abr. 1997.
- ROGERS, M. E. et al. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1363–72, jun. 2008.
- ROTUREAU, B. et al. Molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 468–473, 2006.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by

bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9944–8, 15 out. 1992.

SHAKARIAN, A. M.; DWYER, D. M. The Ld Cht1 gene encodes the secretory chitinase of the human pathogen *Leishmania donovani*. **Gene**, v. 208, n. 2, p. 315–22, 27 fev. 1998.

SHAKARIAN, A. M.; DWYER, D. M. Pathogenic leishmania secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus. **Experimental parasitology**, v. 94, n. 4, p. 238–42, abr. 2000.

SILVEIRA, F. T. et al. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Para. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 2, p. 289–291, jun. 1987.

SILVEIRA, F. T. et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* do roedor Agouti paca (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p. 18–22, fev. 1991.

TAKEO, S. et al. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. **Parasitology international**, v. 58, n. 3, p. 243–8, set. 2009.

VAN THIEL, P.-P. A. M. et al. First cases of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* infection in Surinam. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 82, n. 4, p. 588–90, abr. 2010.

ANEXO

1. Sequências de nucleotídeos dos clones construídas por consenso

1.1 – *Leishmania guyanensis*

```

5' AGACGGCGAGTGGGCGCCGATCCGCGCGCTGGCAGACCTGCACGGTGCGAAGCTGATGCTCTGCATTGGTGGTGGTGGCGCGAGCTCCGG
0 ++++++
3' TCTGCCGCTCACC CGGCGTAGGCGGCCGACCGTCTGGACGTGCCACGCTTCGACTACGAGACGTAACCACCACCACCGCGCTCGAGGCC
1 R R R V G P H P P A G R P A R C E A D A L H W W W W P Q L R
2 D G E W A R I R R L A D L H G A K L M L C I G G G G R S S G
3 K T A S G P A S A G W Q T C T V R S . C S A L V V V A A A P
0 ++++++
5' GTTTTCGGACCTCGTCGGGGACCCGGTGGGCGGCTATCGTTTATTAGGAGGTGAATGCGGTGCTGCTGACGCGAGAGCTCGACGGTAT
0 ++++++
3' CAAAAGCCTGGAGCAGCCCTGGGCGCACGCCGCGGATAGCAAATAACTCCTCCACTTACGCCACGACGACTGCGCTCTCGAGCTGCCATA
1 V F G P R R G P G A A A I V Y . G G E C G A A D A R A R R Y
2 F S D L V G D P V R L S F I E E V N A V L L T R E L D G I
3 G F R T S S G T R C G G Y R L L R R . M R C C . R E S S T V
0 ++++++
5' CGACTTCAACTGGGAGTATCCGACAGACAATGACTGAGTGGTTGAACTTTGGCCGCTTCCTACTGGAGCTCCGGTCTACCTGGGCTATGC
0 ++++++
3' GCTGAAGTTGACCCTCATAGGCGTCTGTTACTGACTCACCACCTTGAAACCGGCAAGGATGACCTCGAGGCCAGATGGGACCCGATACG
1 R L Q L G V S A D N D . V V E L W P L P T G A P V Y P G L C
2 D F N W E Y P Q T M T E W L N F G R F L L E L R S T L G Y A
3 S T S T G S I R R Q . L S G . T L A A S Y W S S G L P W A M
0 ++++++
5' TCCCGCTGTAGGAAGAGAACACGACGCTGGACTGATCGGTGAGCGGCACCACCGCACCAGTGCGGCGCGCGCTCTTGTCCATGGCCCT
0 ++++++
3' AGGGCGACATCCTTCTTGTGCGTCGACCTGACTAGCCACTCGCCGTGGTGGCGTGGGCTCACGCCGCGCGCAGAACAGGTACCGGGA
1 S R C R K R T R S W T D R . A A P P H P S A A R R L V H G P
2 P A V G R E H A A G L I G E R H H R T R V R R A V L S M A L
3 L P L . E E N T Q L D . S V S G T T A P E C G A P S C P W P
0 ++++++
5' CCATCCCCATTGCTCTATTGACGCTGTACTGACGCTCCGCTCGAGTGCTTCGCTCGCTGACTACGTGCACTGGATGGCATATGACCATAT
0 ++++++
3' GGTAGGGGTAAGCAGATAACGTCGACATGACGTCAGGCGAGCTCACGAAGCGAGCGAGCTGATGCACGTGACCTACCGTATACCTGATATA
1 P S P F V I A S C T A V R S S A S L A R L R A L D G I . P Y
2 H P H S I A A V L Q S A R V L R S L D Y V H W M A Y D H I
3 S I P I R L L Q L Y C S P L E C F A R S T T C T G W H M T I
0 ++++++
5' TCTCGGACCGAGCCACACGCTCGGTGAGTACGCTGCCTCGGTGCTCAGTGAGGAGATGATTGGGCTCTTTAGCGAGGCTACCTACAA
0 ++++++
3' AGAGCCCTGGCTCGGTGTGTGAGCCGCTCATGCGACGAGCCAGGAGTCACTCCTACTAACCGAGAAATCGCTCCGATGGATGTT
1 S R D R A T Q L G R V R C L G A Q . G D D W A L . R G Y L Q
2 L G T E P H S S V E Y A A S L V A S E E M I G L F S E A T Y N
3 F S G P S H T A R S S T L P R C S V R R . L G S L A R L P T
0 ++++++
5' CAAGCGTTCGGGACAGCGACCCAGGAGCTGCGCACAGAGCAGGACCACCGCCGAAGCTTACCCTTGGAAATCCCCCTTCTATGGTCGTCA
0 ++++++
3' GTTCGCAAGACCGCTGCGTGGTCTCGACGCGTGTCTGCTCCTGGTGGCGGCTTCGAATGGGAACCTTAGGGGAAGATACCGAGCT
1 Q A F W A D A P G A A H R A G P P P Q A Y P W N P L L W S S
2 K R S G Q T H Q E L R T E Q D H R R K L T L G I P F Y G R H
3 T S V L G R R T R S C A Q S R T T A A S L P L E S P S M V V
0 ++++++
5' TCAGAAGATAGGCGACGCGCAGCCGAGACGTACGATCGCCTCTGGCGCTCAATCCAGCAATGGGCTCGCAAGAAACACCCAGCATGGGT
0 ++++++
3' AGCTCTTCTATCCGCTGCCGTCGGGCTCTGCATGCTAGCGGAGACCGGAGTTAGGTCGTTACCGAGCGTTCTTTGTTGGGTCGTACCCA
1 S R R . A T A A R D V R S P L A L N P A M G S Q E T P S M G
2 R E D R A T A Q P E T Y D R L W R S I Q Q W A R K K H P A W V
3 I E K I G R D G S P E R T I A S G A Q S S N G L A R N T P H G
0 ++++++
5' TGAGGGGGGAGCAGAGCTGCGGGCTTTGAACAATACGGCGGGTACAGCTTCACTGGCTACAACGATGTGAAGCGCAAGATGCGACTGGC
0 ++++++
3' ACTCCCCCTCGTCTCGACGCCGAAACTTGTGATGCGGCCATGTCGAAGTGACCGATGTTGCTACACTTCGCGTCTTACGCTGACCG
1 G G S R A A G F E Q L R R V Q L H W L Q R C E A Q D A T G
2 E G G A E L R A L N Y G G Y S F T G Y N D V K R K M R L A
3 L R G E Q S C G L . T T T A G T A S L A T T M . S A R C D W
0 ++++++
5' ACGCGCTGCTAACTTGTCTGGGA
0 ++++++
3' TGCGCGACGATTGAACAGACCTT
1 T R C . L V W E
2 R A A N L S G
3 H A L L T C L G
0

```

1.2 – *Leishmania naiffi*

[illegible]

1.4 – *Leishmania shawi*

0 T C A G T G C C G A G G T T G A T C C A G C T A C C T T G C G T C T C A C C C A C G T A G A T G A C C G C T G C C G T C A G A C G A G T G G G C C G C A T C C G C C G G C
0 ++++++
3' A G T C A C G G C T C C A A C T A G G T C G A T G G A A C G C A G A T G G G T G C A T C T A C T G G C G G A C G C A G T C T G C T G C T A C C C G G G C G T A G G C G G C G G
1 S V P R L I Q L P C V S P T . M T A C R Q T T S G P A S A G
2 Q C R G . S S Y L A S H P R R . P P A V R R R R V G P H P P A
3 I S A E V D P A T L A S H T H V D D R L P S D D E W A R I R R
0 ++++++
5' T G G C A G A C C T G C A C G G T G C G A A G C T G A T G C T C T G C A T T G G C G G T G G G G G C G C A G C T C C G G G T T T C G G A T C T C G T C A G G G A C C C G G T G C
0 ++++++
3' A C C G T C T G G A G C T G C C A C G T T C G A C T A C G A G A C G T A A C C G C C A C C C C C G C G T C G A G G C C A A A A G C C T A G A G C A G T C C C T G G G C C A G C
1 W Q T C T V R S . C S A L A V G G A A P G F R I S S G T R C
2 G R P A R C E A D A L H W R W G A Q L R V F G S R Q G P G A
3 L A D L H G A K L M L C I G G G G R S S G F S D L V R D P V
0 ++++++
5' G G C G A C T A T C G T T T A T T G A G G A G G T G A A T G C G G T G C T G C T G A C G C G A G A G C T C G A C G G T A T C G A C T T C A A C T G G G A G T A T C C G C A G A C A A
0 ++++++
3' C C G C T G A T A G C A A A T A A C T C C T C C A C T T A C G C C A C G A C G A C T G C G C T C T C G A G C T G C C A T A G C T G A A G T T G A C C C T C A T A G G C G T C T G T T
1 G D Y I L L R R . M R C C . R E S S T V S T S T G S I R R Q
2 A T I V Y . G G E C G A A D A R A R R Y R L Q L G V S A D N
3 R R L S F I E E V N A V L L T R E L D G I D F N W E Y P Q T
0 ++++++
5' T G A C C G A G T G G T T G A A C T T T G G C C G C T T C C T A C T G G A G C T C C G G T C T G C C C T G G G T T A T G C T C C C G C T G T A G G A A G A A C A C G C A G C T G
0 ++++++
3' A C T G G C T C A C C A A C T T G A A A C C G G C A A G G A T G A C C T C G A G G C C A G A C G G G A C C C A A T A C G A G G G C G A C A T C C T T C T T G T G C G T C G A C
1 P S G . T L A A S Y W S S G L P W V M L P L . E E N T Q L
2 D R V V E L W P L P T G A P V C P G L C S R C R K R T R S W
3 M T E W L N F G R F L L E L R S A L G Y A P A V G R E H A A
0 ++++++
5' G A C T G A T C G G T G A G C G G C A C C A C G C A C C C G A G T G C G G C G C G C G C T T T G T C C A T G G C C C C C A T C C T C A T T C G T C T A T T G C A G C T G T A C
0 ++++++
3' C T G A C T A G C C A C T C G C C G T G G T G G C T G G G C T C A C C C G C G C G C G A A C A G G T A C C G G G G G T A G G A G T A A G C A G A T A A C G T C G A C A T G
1 D . S V S G T T A P E C G A P S C P W P P I L I R L L Q L Y
2 T D R . A A P P H P S A A R R L V H G P P P S S F V Y C S C T
3 G L I G E R H H R T R V R R A V L S M A P H P H S S I A A V
0 ++++++
5' T G C A G T C C G C T C G A G T G C T T C G C T C G C T C G A C T A C G T G C A C T G G A T G G C A T A T G A C C A T A T T C T C G A G A C C G A G C C A C A C A G C T C G G T C G
0 ++++++
3' A C G T C A G G C G A G C T C A C G A A G C G A G C G A G C T G A T G C A C G T G A C C T A C C G T A T A C T G G T A T A A G A G C T C T G G C T C G T G T G T C G A G C C A G C
1 C S P L E C F A R S T T C T G W H M T I F S R P S H T A R S
2 A V R S S A S L A R L R A L D G I . P Y S R D R A T Q L G R
3 L Q S A R A V L R S L D Y V H W M A Y D H I L E T E P H S S V
0 ++++++
5' A G T A C G C T G C C T C G G T G C T C A G T G A G G A G A T G A T T G G G C T C T T A G C A G G C T A C C T A C A A C A A G C G T T C T G G G C A G A C C A C C A G G A G C
0 ++++++
3' T C A T G C G A C G A G C C A G A G T C A C T C C T C T A C T A A C C C G A G A A T C G C T C C G A T G G A T G T T G T T C G C A A G A C C C G T C T C G C T G G T C C T C G
1 S T L P R C S V R R . L G S L A R L P T T S V L G R R T R S
2 V R C L G A Q . G D D W A L . R G Y L Q Q A F W A D A P G A
3 E Y A A S V L S E E M I G L F S E A T Y N K R S G Q T H Q E
0 ++++++
5' T G C G C A C A G A G C A G G A C C A C C G C G A A G C T T A C C C T T G G A A T C C C C T C T A T G G T C G T C A T C G A G A A G A T A G A C A G C G C A G C C C G A G A
0 ++++++
3' A C G C G T G C T C G T C C T G G T G G C G G C T T C G A A T G G G A A C C T T A G G G G A A G A T A C C A G A G T A G C T C T T C T A T C T G C T G C C G T C G G G C T C T
1 C A Q S R T T A A S L P L E S P S M V V I E K I D D G S P R
2 A H R A G P P P Q A Y P W N P L W S S S R R . T T A A A R D
3 L R T E Q D H R R K L T L G I P F Y G R H R E D R R R Q P E
0 ++++++
5' C G T A C G A T C G C C T C T G G C G C T C A A T C C A G C A A T G G G C T C G C A A G A A A C A C C C A G C A T G G G T T G A G G G A G A G C A G A G C T G C G G A C T T T G A
0 ++++++
3' G C A T G C T A G C G G A G A C C G C A G T T A G G T C G T T A C C C G A G C G T T C T T G T G G G T C G T A C C C A A C C C C T C C T C G T C T C A G C G C C T G A A A C T
1 R T I A S G A Q S S N G L A R N T Q H G L R E E Q S C G L
2 V R S P L A L N P A M G S Q E T P S M G . G R S R A A A D F E
3 T Y D R L W R S I Q Q W A R K K H P A W V E G G A E L R T L
0 ++++++
5' G C A A C T A C G C G G G T A C A G C T T C A C T G G C T A C A
0 ++++++
3' C G T T G A T G C G C C C A T G T C G A A G T G A C C G A T G T
1 A T T A G T A S L A T
2 Q L R R V Q L H W L H
3 S N Y G G Y S F T G Y

1.5 – *Leishmania hertigi*

```

5' AATCTCCCCITTCAGCGCGGAGGTGGATCCAGTACCTTGCCTCACTCATGTAGATGACCGTTTGCCGTCTGGTGGCGAGTGGGCC
0 ++++++
90
3' TTAGAGGGGAAGAAGTCGCGCTCCACCTAGGTCACTGGAACGCGGAGTGAGTACATCTACTGGCAAACGGCAGACCACCGCTCACCCGG
1 N L P F F S A E V D P V T L R L T H V D D R L P S G G E W A
2 I S P S S A R R W I Q . P C A S L M . M T V C R L V A S G P
3 E S P L L Q R G G G S S D L A P H S C R . P F A V W W R V G
0
5' CGCATTGCGCGATTGGCAGACCTGCACGGCACCAAGCTGATGCTCTGCATTGGTGGTGGCGGTGCGAGTTCGGGGTTTGGCGGACCTCGTC
0 ++++++
180
3' GCGTAAGCGGCTAACCGTCTGGACGTGCCGTGGTTCGACTACGAGACGTAACCAACCGCCAGCGTCAAGGCCAAACCGCTGGAGCAG
1 R I R R L A D L H G T K L M L C I G G G G R S S G F A D L V
2 A F A D W Q T C T A P S . C S A L V V A V A V P G L R T S S
3 P H S P I G R P A R H Q A D A L H W W W R S Q F R V C G P R
0
5' GGGGACGCGAGTGAAGCGGCAAGCGTTTATTGAAGAAACGAAGCGGTGCTGCTGGCGCAAGCCTGGACGGCATCGACTTCAACTGGGAG
0 ++++++
270
3' CCCCTGCGTCACTTCGCGTTCGCAAGTAACCTTTGCTTCGCCACGACGACCGCGCTTCGGACCTGCCGTAGCTGAAGTTGACCCCTC
1 G D A V K R Q A F I E E T K A V L L A R S L D G I D F N W E
2 G T Q . S G K R S L K K R R R C C W R E A W T A S T S G S
3 R G R S E A K S V H . R N E G G A C A G A K P G R H R L Q L G
0
5' TATCCGACAGCATGACGGAGTGGTGAATTTGCGGCCGCTTCTGCAAGACCTCCGATCTGCCTTGGGTATATGGACGCCACCGGAGGC
0 ++++++
360
3' ATAGCGCTCTGCTACTGCTCACCAGCTTAAAGCGGCGAAGGACGTTCTGGAGGCTAGACGGAACCAATATACCTGCGGTGGCCTCCG
1 Y P Q T M T E W L N F G R F L Q D L R S A L G Y M D A T G G
2 I R R R . R S G . I S A A S C K T S D L P W V I W T P P E A
3 V S A D D D G V A E F R P L P A R P P I C L G L Y G R H R R
0
5' GAAGCGCAGCTGCACCCATTGTCGAGCGGCCACCATACTCGAGTAGGGCGCACCCCTCTGTCTATGGCCCTTCACTCTCATCTGCTCC
0 ++++++
450
3' CTTCCGCGTCGACGTGGGTAAACAGCTCGCCGCGGTGGTATGAGCTCATCCCGCTGGGAGAACAGATACCGGGAAGTAGGAGTAAGCAGG
1 E G A A A P I V E R R H H T R V G R T L L S M A L H P H S S
2 K A Q L H P L S S G A T I L E . G A P S C L W P F I L I R P
3 R R R S C T H C R A A P P Y S S R A H P L V Y G P S S S F V
0
5' ATCTCAACTGTGCTGCAGTCCACTGGTGTGCTTCAGTCGCTGGATTATGTACTGGATGGCGTACGACCACGTTGTGGGACTGAGCCA
0 ++++++
540
3' TAGAGTTGACACGAGCTCAGGTGACCAAGTCAGCGACCTAATACATGTGACCTACCGCATGCTGGTGAACAGCCCTGACTCGGT
1 I S T V L Q S T G V L Q S L D Y V H W M A Y D H V V G T E P
2 S Q L C C S P L V C F S R W I M Y T G W R T T T L S G L S H
3 H L N C A A V H W C A S V A G L C T L D G V R P R C R D . A
0
5' CACAGTTCGGTTGAGTACGCTGCCTCGGTGCTCAGAGAGGAGATGATTGGGCCCTTTTAGGGAGGCTTCGTATGACAGGCGCGTGGGCAG
0 ++++++
630
3' GTGTCAAGCAACTCATGCGAGGAGCCACGAGTCTCTCTCTACTAACC CGGAAAATCCCTCCGAGCATACTGTCCGCGGCACCCGTC
1 H S S V E Y A A S V L R E E M I G P F R E A S Y D R R R G Q
2 T V R L S T L P R C S E R R . L G L L G R L R M T G A V G R
3 T Q F G . V R C L G A Q R G D D W A F . G G F V . Q A P W A
0
5' ACGCACCGCGCCCCCGCGCCGAGCAGAACCACCGCTGTATGCTCACCCTTGGGATTCCCTTTCTATGGCCGTCATCGAGTGGACAGGCAA
0 ++++++
720
3' TGGTGGCGCGGGGGCGCGGCTCGTCTTGGTGGCGACATACGAGTGGGAACCCCTAAGGAAAGATACCGGCAGTAGCTACCTGTCCGTT
1 T H R R P R A E Q N H R C M L T L G I P F Y G R H R V D R Q
2 R T G A P A P S R T T A V C S P L G F L S M A V I E W T G N
3 D A P A P P R R A E P P L Y A H P W D S F L W P S S S G Q A
0
5' CTGCGCCCCAGACGTACGAGCAACTCTGGCTCTCCATTGCAATGGGCGAAGGAGAAGCACCCAACTGGGTGAGGGAGGGGCGGAG
0 ++++++
810
3' GACGGCGGGGCTGCTATGCTCGTTGAGACCGAGAGGTAAGCTGTTACCCGCTTCTCTCTGTTGGGTTGCACCCAGCTCCCTCCCGCCTC
1 L P P Q T Y E Q L W L S I R Q W A K E K H P T W V E G G A E
2 C R P R R T S N S G S P F D N G R R R S T Q R G S R E G R S
3 T A A P D V R A T L A L H S T M G E G E A P N V G R G R G G
0
5' CTGCGCGCCTTGAGTGAGTACGCCAG
0 ++++++
3' GACGCGGGAACCTCACTCATGCGGGTC
1 L R A L S E Y A Q
2 C A P . V S T P R
3 A A R L E . V R P
0

```

1.6 – *Leishmania equatoriensis*

5' GTGCGAGGTGGACCCGCAACCTTGGGCTCATCCACGTAGATGACCGACTGCCATCGGGCGACGAGTGGGGCCGGCATCCGCCGGCTGGCAGACCTGCACGGTGGAACTGATGCTGTCATCGGGGGTGGTGGCCGC
 0 ++++++
 3' CACGGCTCCACCTGGGGGTTGGAACGCAGAGTAGTGCATCTACTGGCTGACGGTAGCCCGCTGCTCACCCGGGCTAGGGCGCGACCGCTGCGACGTGCCACGGCTTTGACTACGAGACGTAGCCGCCACACCGGGC
 1 V P R W T P Q P C V S S T . M T D C H R A T S G P A S A G W Q T C T V R N . C S A S A V V A A
 2 C R G G P R N L A S H P R R . P T A I G R R V G P H P P A G R P A R C E T D A L H R R W W P
 3 C A E V D P A T L R L I H V D D R L P S G D E W A R I R R L A D L H G A K L M L C I G G G G R
 0
 5' AGCTCCGGGTTTGGGACCTGCTGGGGACACGGTGCAGCGACAAGCGTTCATAGAGGAGGTGAACGGGTGCTGCTGGCGCGAAAACCTCGACGGCATAGACTTCAACTGGGAGTACCCGCAACATGACGGAGTGGCT
 0 ++++++
 3' TCGAGGCCCAACCGCTGGAGAGCCCTCTGTGCCACGTGCTGTTGCAAGTATCTCTCCACTTGGCGCAGACGACCGCGCTTTTGAAGTGGCGTATCTGAAGTTGACCCCTCATGGGCGTTTGTACTGGCTCAGCGA
 1 A P G L R T S S G T R C S D K R S . R R . T R C C W R E N S T A . T S T G S T R K Q . R S G
 2 Q L R V C G P R R G H G A A T S V H R G G E R G A A G A K T R R H R L Q L G V P A N N D G V A
 3 S S G F A D L V G D T V Q R Q A F I E E V N A V L L A R K L D G I D F N W E Y P Q T M T E W L
 0
 5' GAACCTTGGCGCTTCTACTGGAGCTCCGGTCTGCCCTGGGTTATGCTCCCGCTAGAGAGAGAACCGCAGCTGGACTGATCGGTGAGCGGCACACCGCACCGGAGTGGGGCGCGCTTGTTCATGGCCCTCC
 0 ++++++
 3' CTTGAACCGCGGAGGATGACCTCGAGGCCAGACGGGACCAATACGAGGGGACATCTCTCTTGTGGCTCGACCTGACTAGCCACTCGCGGTGGTGGCGTGGGCTCAGCGCGCGCGAGAACAGGTACCGGGAGG
 1 . T L A A S Y W S S G L P W V M L P L . E E N T Q L D . S V S G T T A P E C G A P S C P W P S
 2 E L W P L P T G A P V C P G L C S R C R K R T R S W T D R . A A P P H P S A A R R L V H G P P
 3 N F G R F L L E L R S A L G Y A P A V G R E H A A G L I G E R H H R T R V R R A V L S M A L
 0
 5' ATCCTCATGCTATTCAGAGCTGACTGACGCTCGGCTCGAGTGTCTGGCTCGGCTGACTGACCTGGATGGCATATGACCATATTCCTGAGACCGAGCCACACAGCTCGGTCGAGTACGCTGCCTCGGTCGCTCAGC
 0 ++++++
 3' TAGGAGTAAGCAGATACCTCGACATGACGTCAGGCGAGCTCAGGAAGGAGGAGCTGATGACGCTGACCTACCGTATACCTGTTAAGAGCTCTGGCTCGGTCGTCGAGGCGAGCTCATCGGAGGAGCCAGGAGTGC
 1 I L I R L L Q L Y C S P L E C F A R S T T C T G W H M T I F S R P S H T A R S S T L P R C S A
 2 S S F V Y C S C T A V R S S A S L A R L R A L D G I . P Y S R D R A T Q L G R V R C L G A Q
 3 H P H S S I A A V L Q S A R V L R S L D Y V H W M A Y D H I L E T E P H S S V E Y A A S V L S
 0
 5' GAGGAGACAATTGGGCTCTTTAGCGAGGTCATACACAGGCGCCTTGGGAGATGCAACGGGGCCGCGCACCGAGGAGACACCGCGCAGCTCACCTTGGTATCCCTCTACGCGGTCATCGAGAGGACAG
 0 ++++++
 3' CTCCTCTGTTAACCCGAGAAATCGCTCGAGGTATGTTGTCCGCGGAACCGCTGCTAGCTGGCGCGCGCGCTGGCTCGTCTGGTGGCGGCTTCGAGTGGGAACCATAGGGGAGATGCCGCGAGTAGCTCTCCTGTC
 1 R R Q L G S L A R L H T T G A L G R C T G G R A P S R T T A A S S P L V S P S T A V I E R T
 2 R G D N W A L . R G C I Q Q A P W A D A P A A A H R A G P P P Q A H P W Y P L L R P S S R G Q
 3 E E T I G L F S E A A Y N R R L G Q M H R R P R T E Q D H R R K L T L G I P F Y G R H R E D R
 0
 5' GCGACTGCAGCTGAGGGGTACGACCGCCTCTGGCTCTTCATCCAGAAATGGGCTAGCAAGAACCAACATGGGTGAGGGAGGAGCGGAGCTGCGGGCATTGAGCGAGTATGGCGGGTACAGTTTACCGGCTACG
 0 ++++++
 3' CGCTGACGTGGACTCCGCATGCTGGCGGAGACCGAGAAAGTAGGTTCTTACCGGATGCTTCTGGTGGGTGTGATCCCGAGCTCCCTCTCGCTCGACGCGCGTAACCTCGCTCATACCGCCATGTCAAAGTGGCGGATGC
 1 G D C S L R R T T A S G S S S K N G L A R T T Q H G S R E E R S C G H . A S M A G T V S P A T
 2 A T A A . G V R P P L A L H P R M G . Q E P P N M G R G R S G A A G I E R V W R V Q F H R L R
 3 R L Q P E A Y D R L W L F I Q E W A S K N H P T W V E G G A E L R A L S E Y G G Y S F T G Y
 0
 5' ACGATGTGAAGCGCAAGATGCTACCTACACGGCT
 0 ++++++
 3' TGCTACACTTCGCGTTCTACGATGGATGGCGCA
 1 T M . S A R C Y L H A
 2 R C E A Q D A T Y T R
 3 D D V K R K M L P T R V
 0

2. Sequências dos clones traduzidas

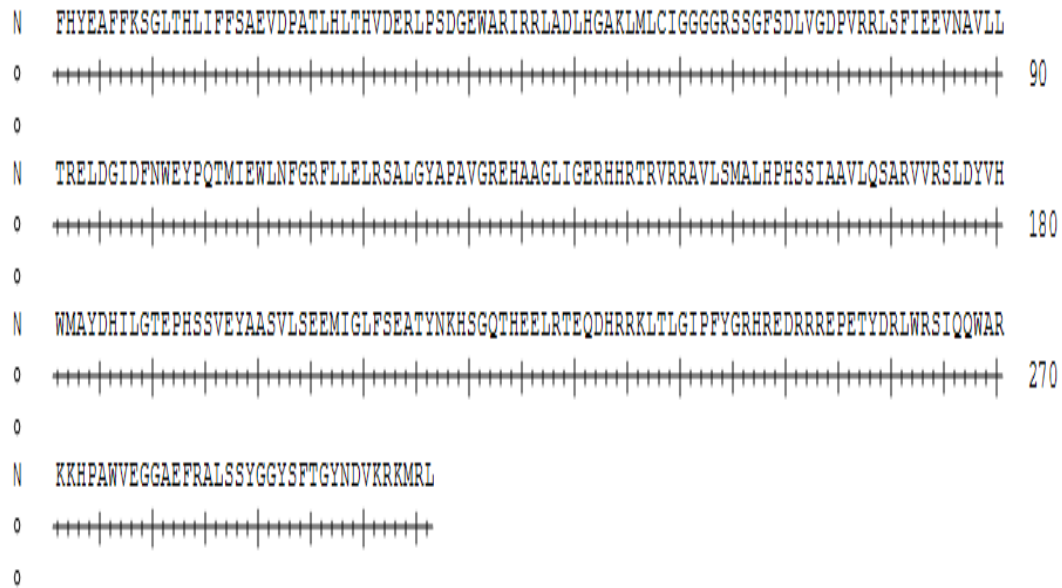
2.1 – *Leishmania guyanensis*

N DGEWARIRRLADLHGAKLMLCIGGGGRSSGFSDLVGDPVRRLSFIEEVNAVLLTRELDGIDFNWEYPQMTTEWLNFGRLFLELRSTLGYA
 0 ++++++ 90
 0
 N PAVGREHAAGLIGERHHRTRVRRRAVLSMALHPHSSIAAVLQSARVLRSLDYVHWMAYDHILGTEPHSSVEYAASVLSEEMIGLFSEATYN
 0 ++++++ 180
 0
 N KRSGQTHQELRTEQDHRKLTIGIPFYGRHREDRRQPETYDRLWRSIQWARKKHPANVEGGAEALNNYGGYSFTGYNDVKKMRLA
 0 ++++++ 270
 0
 N RAANLSG
 0 ++++++
 0

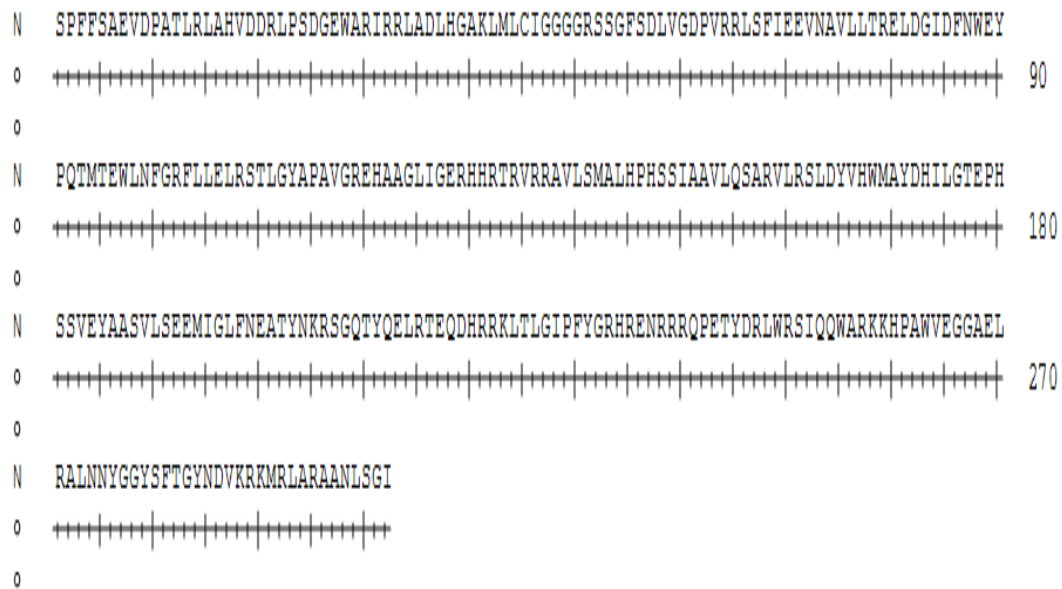
2.2 – *Leishmania naiffi*

N SAEVDPATLRLTHVDDRLPSDDEWARIRRLADLHGAKLMLCIGGGGRSSGFSDLVRDPVRRLSFIEEVNAVLLTRELDGIDFNWEYPQTM
 0 ++++++ 90
 0
 N TEWLNFGRLFLELRSAALGYAPAVGREHAAGLIGERHHRTRVRRRAVLSMALHPHSSIAAVLQSARVLRSLDYVHWMAYDHILETEPHSSVE
 0 ++++++ 180
 0
 N YAASVLSEEMIGLFSEATYNKRSGQTHQELRTEQDHRKLTIGIPFYGRHREDRRQPETYDRLWRSIQWARKKHPANVEGGAEALRLTS
 0 ++++++ 270
 0
 N NYGGYSFTGY
 0 ++++++
 0

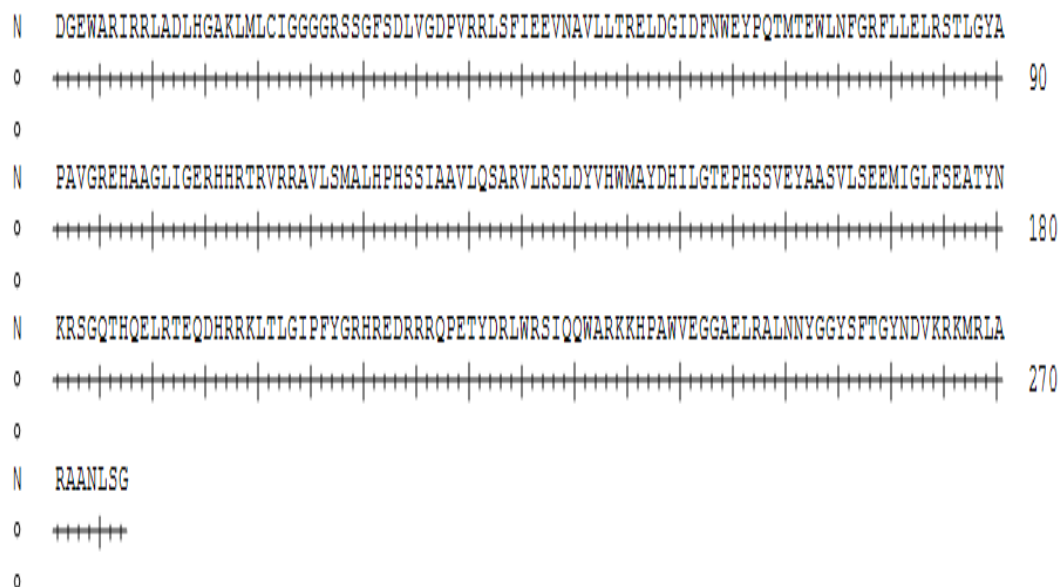
2.3 – *Leishmania lainsoni*



2.4 – *Leishmania shawi*



2.5 – *Leishmania hertigi*



2.6 – *Leishmania equatoriensis*

