

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ELOIZA TELES CALDART

**FAMÍLIA GÊNICA A2 COMO MARCADOR DE VIRULÊNCIA VISCEROTRÓPICA
EM PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *Leishmania* spp.: O ESTADO DA ARTE**

DOIS VIZINHOS

2024

ELOIZA TELES CALDART

**FAMÍLIA GÊNICA A2 COMO MARCADOR DE VIRULÊNCIA VISCEROTRÓPICA
EM PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *Leishmania* spp.: O ESTADO DA ARTE**

**A2 gene family as a viscerotropic virulence marker in protozoa of the gender
Leishmania spp.: the state of the art**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização
apresentado como requisito para obtenção do título de
Especialista em Biologia Molecular – Habilitação
Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Morini Küpper Cardoso

DOIS VIZINHOS

2024



Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

ELOIZA TELES CALDART

**FAMÍLIA GÊNICA A2 COMO MARCADOR DE VIRULÊNCIA VISCEROTRÓPICA
EM PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *Leishmania* spp.: O ESTADO DA ARTE**

Trabalho de conclusão de curso de Especialização
apresentado como requisito para obtenção do título de
Especialista em Biologia Molecular – Habilitação
Bioinformática da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Morini Küpper Cardoso.

Data de aprovação: 04 de abril de 2024.

Juliana Morini Küpper Cardoso
Doutora em Genética e Biologia Molecular
Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Dois Vizinhos (UTFPR-DV)

Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali
Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Universidade do Oeste de Santa Catarina

Daiara Manfio Zimmermann
Doutora em Entomologia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Dois Vizinhos (UTFPR-DV)

**DOIS VIZINHOS
2024**

RESUMO

As diferentes espécies de *Leishmania* estão comumente associadas a quadros clínicos que abrangem sintomas de ordem cutânea, mucocutânea e visceral; em alguns casos, aparentemente esporádicos, espécies causadoras de quadro cutâneo, causam quadros viscerais e vice-versa. O mecanismo exato que leva a essa variação de tropismo em uma mesma espécie de parasito ainda é incerto; porém diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar esse comportamento. O objetivo do presente trabalho foi verificar o estado da arte dos estudos realizados com a família gênica A2 como marcador de virulência viscerotrópico por meio de revisão sistemática de literatura. Esta foi realizada utilizando-se as bases “Scopus”, “Scielo”, “Web of Science” e “Pubmed” com as seguintes palavras-chave: ((leishmania) AND ("a2 gene" OR "A2 protein" OR "A2rel" OR "A2 antigen" OR "A2 expression")). O gerenciador de referências “Mendeley” foi utilizado durante a triagem por título, resumo e trabalho completo. Dos artigos provenientes do banco de dados curado foram extraídos dados de identificação do trabalho, informações a respeito de marcadores, técnicas e espécies de *Leishmania* avaliadas, os quais, foram armazenados em uma planilha do Excel. Conclui-se que embora A2 esteja fortemente envolvida na capacidade de visceralização de *Leishmania*, comprovado inclusive em isolados causadores de quadros clínicos atípicos, ela não é a única responsável pelo tropismo e virulência do parasito. A presença de polimorfismos de nucleotídeo único, pseudogenes e duplicação genética são as formas de variabilidade mais importantes no tropismo de parasitos do gênero *Leishmania*.

Palavras-chave: evolução; leishmaniose; polimorfismo; visceralização.

ABSTRACT

The different species of *Leishmania* are commonly associated with clinical conditions that include cutaneous, mucocutaneous and visceral symptoms; in some cases, apparently sporadic, species that cause cutaneous conditions cause visceral conditions and vice versa. The exact mechanism that leads to this variation in tropism within the same species of parasite is still uncertain; however, several studies have been carried out in an attempt to elucidate this behavior. The objective of the present work was to verify the state of the art of studies carried out with the A2 gene family as a viscerotropic virulence marker through a systematic literature review. A systematic review was carried out using the databases “Scopus”, “Scielo”, “Web of Science” and “Pubmed” with the following keywords: ((*leishmania*) AND ("a2 gene" OR "A2 protein" OR "A2rel" OR "A2 antigen" OR "A2 expression")). The “Mendeley” reference manager was used during the screening by title, abstract and full work. From the articles coming from the curated database, work identification data, information regarding markers, techniques and *Leishmania* species evaluated were extracted, which were stored in an Excel spreadsheet. It is concluded that although A2 is strongly involved in the visceralization capacity on *Leishmania*, proven even in isolates that cause atypical clinical conditions, it is not solely responsible for the tropism and virulence of the parasite. The presence of single nucleotide polymorphisms, pseudogenes and genetic duplication are the most important forms of variability in the tropism of parasites of the genus *Leishmania*.

Keywords: evolution; leishmaniases; polymorphism; visceralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação taxonômica do gênero <i>Leishmania</i> em subgêneros, complexos e espécies.....	12
Figura 2 - Status de endemicidade das leishmanioses cutânea e mucocutânea (LC/LMC) ao redor do mundo, 2022	13
Figura 3 - Status de endemicidade da leishmaniose visceral (LV) ao redor do mundo, 2022.	15
Figura 4 - <i>Leishmania</i> na forma amastigota dentro do macrófago (células coradas por May Grunwald Giemsa) (A). <i>Leishmania</i> na forma promastigota em meio de cultura (B).....	17
Figura 5 - Fluxograma com o número total de artigos selecionados em cada fase da revisão sistemática	20
Figura 6 - Linha do tempo com as principais conclusões relacionadas à família gênica A2...	26
Figura 7 - Mapa mundi demonstrando os países onde os 21 artigos científicos selecionados no presente estudo foram publicados	38
Gráfico 1 - Número de artigos recuperados nas fases 2 e 5 da seleção para a revisão sistemática por década.....	21
Gráfico 2 - Proporção do número de artigos recuperados na fase 2 da revisão sistemática por área temática.....	21

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Tabela 1 - Número total de casos confirmados de leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) no Brasil por região e UF no período de 2013 a 2022..... 16
- Quadro 1 - Informações de identificação dos estudos selecionados na revisão sistemática, seus objetivos e conclusões 27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DHFR	Dihidrofolato Redutase Timidilato-sintetase
EV	Espécie Viscerotrópica
GP	Glicoproteína
kDa	KDalton
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Open Reading Frame
PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós Kalazar
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMF	Sistema Monocítico-fagocitário
SNP	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Objetivos.....	10
1.1.1 Objetivos gerais.....	10
1.1.2 Objetivos específicos.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Leishmaniose cutânea e mucocutânea.....	13
2.2 Leishmaniose visceral.....	14
2.3 Ciclo biológico.....	16
2.4 Aspectos genéticos.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4 RESULTADOS.....	20
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
7 REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses de transmissão vetorial, negligenciadas, de distribuição mundial e causadas por várias espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Esses parasitas estão associados a diferentes quadros clínicos, desde quadros cutâneos que muitas vezes são auto-limitantes, quadros muco-cutâneos e até com envolvimento visceral, sendo estes muito graves, podendo levar o paciente a óbito (ALVAR et al., 2012). As diferentes formas de apresentação da doença variam, principalmente, em decorrência da espécie do parasito envolvido. Porém, em alguns casos, aparentemente esporádicos, espécies causadoras de quadro cutâneo, causam quadros viscerais e vice-versa (SAMARASINGHE et al., 2018).

Parasitas do gênero *Leishmania* são, de forma geral, organismos diplóides, apresentam variabilidade genética inter e intra-específica, desde variações no número e tamanho de cromossomos, número de repetições em *tandem* (repetições em sequência de dinucleotídeos, trinucleotídeos, sendo que, quanto maior é o número de bases nitrogenadas repetidas em sequência, mais raro é a repetição das mesmas) de determinados genes até polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - *Single Nucleotide Polimorphysm*). Por outro lado, a sintenia é altamente preservada e são relatados poucos genes espécie-específicos. Essa variação no número de cópias de genes e no número de cromossomos, pode ser responsável por variações fenotípicas em termos de patogenicidade, tropismo e virulência nos diferentes isolados por aumentar a expressão gênica na ausência de um controle transcricional e pós-traducional mais rebuscado (REAL et al., 2013; ROGERS et al., 2015).

No entanto, o mecanismo exato que leva a diferentes quadros clínicos causados por uma mesma espécie de parasito, ainda é incerto e diversos estudos têm sido desenvolvidos para melhor elucidar esse fenômeno.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar o estado da arte dos estudos realizados com a família gênica A2 como marcador de virulência viscerotrópico por meio de revisão sistemática de literatura.

1.1.2 Objetivos Específicos

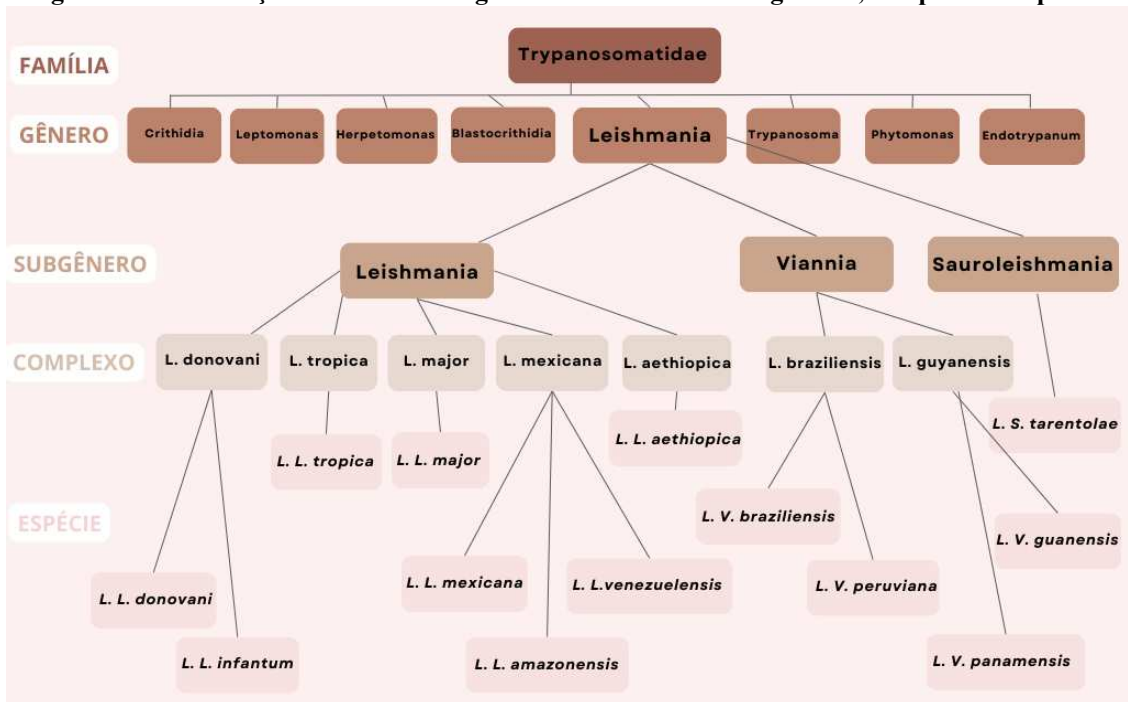
- I) Avaliar o número de trabalhos que contém as palavras-chave do estudo quanto ao ano de publicação e quanto ao tema;
- II) Identificar e caracterizar os estudos que avaliam aspectos genotípicos da família gênica A2 como marcador de virulência viscerotrópico em parasitos do gênero *Leishmania*;
- III) Identificar e caracterizar os estudos que avaliam aspectos de expressão gênica da família A2 como marcador de virulência viscerotrópico em parasitos do gênero *Leishmania*;
- IV) Identificar e caracterizar os estudos que avaliam aspectos de fenotípicos da família gênica A2 como marcador de virulência viscerotrópico em parasitos do gênero *Leishmania*.
- V) Construir linha do tempo demonstrando a evolução dos estudos relacionados à família gênica A2 como marcador de virulência viscerotrópico e das técnicas utilizadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As leishmanioses são doenças negligenciadas transmissíveis entre humanos e animais por meio de vetores e causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (WHO, 2023).

Mundialmente as espécies de *Leishmania* estão associadas a diferentes quadros clínicos de acordo com o seu tropismo no organismo do hospedeiro. As espécies viscerotrópicas, pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (Figura 1), causam a leishmaniose visceral (LV), uma doença grave popularmente chamada de calazar que leva a óbito quando não tratada. Já as espécies dermatotrópicas, causam leishmaniose cutânea ou mucocutânea (LC/LMC) e pertencem aos demais complexos (Figura 1) (ALVAR *et al.*, 2012; MAATALLAH *et al.*, 2022; WHO, 2023). Em alguns casos, aparentemente esporádicos, espécies causadoras de quadro cutâneo causam quadros viscerais e vice-versa (SILVA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2014). A fim de esclarecer essa quebra de padrão de tropismo e, conseqüentemente de virulência, diversos marcadores moleculares têm sido estudados, sendo um dos mais bem caracterizados a proteína produzida por amastigotas denominada A2.

Figura 1 - Classificação taxonômica do gênero *Leishmania* em subgêneros, complexos e espécies



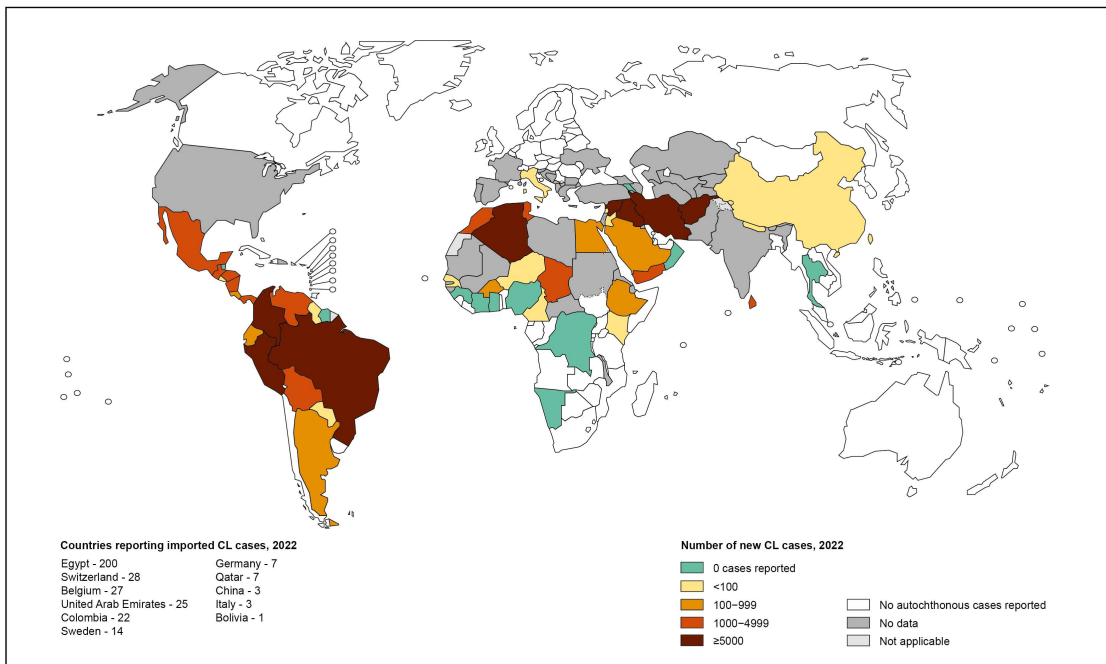
Fonte: Baseado no NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (2023).

2.1 Leishmaniose cutânea e mucocutânea

A leishmaniose cutânea (LC) cursa com lesões de pele ulceradas de difícil cicatrização, podendo evoluir para leishmaniose mucocutânea (LMC) quando acomete áreas de mucosa. Ambas são doenças estigmatizantes, cujo tratamento é longo, com muitos efeitos adversos e com relatos de resistência por parte do parasito. A LMC é mais grave que a LC, pode levar a perda de arquitetura nasal e de palato, infecção bacteriana secundária e, raramente, óbito (BRASIL, 2014; WHO, 2023).

Em torno de 600.000 a 1 milhão de novos casos de LC/LMC ocorrem por ano em todo o mundo; no entanto, estima-se que apenas 200.000 sejam notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS). Mais de 90% desses casos estão concentrados no continente americano, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central, conforme Figura 2 (WHO, 2023).

Figura 2 - Status de endemicidade das leishmanioses cutânea e mucocutânea (LC/LMC) ao redor do mundo, 2022



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2023. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Fonte: WHO (2023).

Conforme Figura 1, parasitos dos complexos *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* são os causadores da doença no Velho Mundo (continentes europeu, africano, asiático e os quatro arquipélagos da Macaronésia); enquanto no Novo Mundo (continente americano) os responsáveis são os parasitos pertencentes aos complexos *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (REAL *et al.*, 2013).

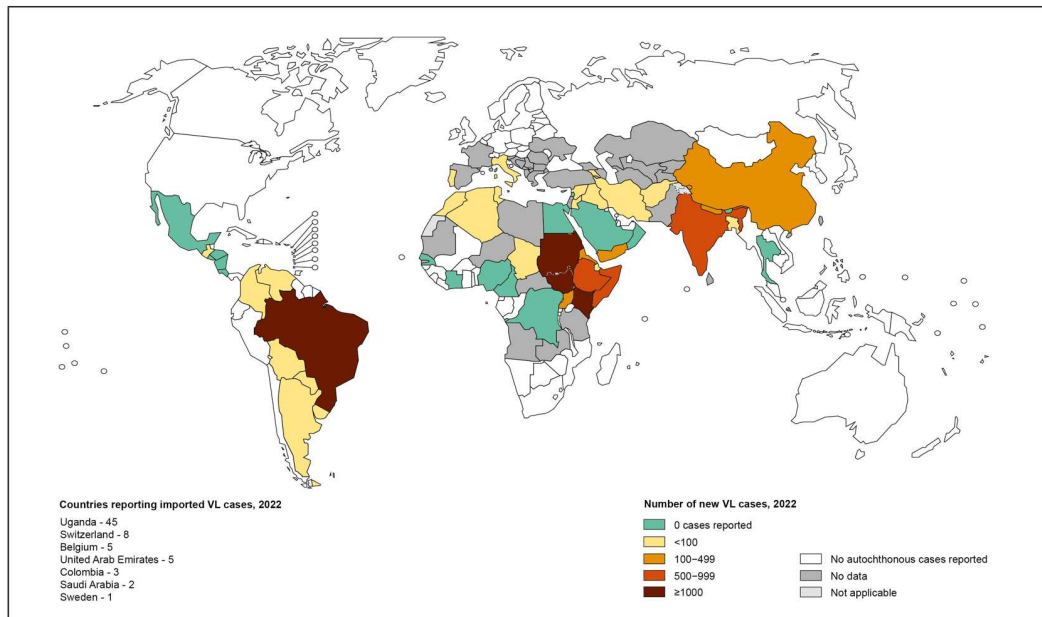
No Brasil, sete espécies de *Leishmania* foram identificadas como causadoras de LC: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) lindenbergi* (BRASIL, 2014), sendo as duas primeiras as envolvidas na LMC. De 2013 a 2022 (dados mais recentes disponíveis), 168.463 casos de LC foram notificados no Brasil, resultando em 117 óbitos; 10.565 casos novos de LMC foram notificados no mesmo período (Tabela 1) e 48 óbitos, levando a uma taxa de letalidade de 6,9 e 11,8 mortes a cada 10.000 casos confirmados, respectivamente (SINAN, 2024).

2.2 Leishmaniose visceral

Na leishmaniose visceral (LV) há acometimento de fígado, baço, medula óssea, entre outros órgãos associados ao sistema monocítico fagocitário; há intensa deposição de imunocomplexos o que pode levar a glomerulonefrite e insuficiência renal. É fatal em mais de 95% dos casos se não for tratada (BRASIL, 2014).

Entre 50.000 e 90.000 novos casos de LV ocorrem anualmente, a maior parte deles no Brasil, África Oriental e Índia (Figura 3). Estima-se que apenas uma variação entre 25% até 45% sejam notificados à OMS (BRASIL, 2017; WHO, 2023).

Figura 3 - Status de endemicidade da leishmaniose visceral (LV) ao redor do mundo, 2022



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2023. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Fonte: WHO (2023).

O agente etiológico da LV no Brasil é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinônimo de *L. (L.) chagasi*). No período de 2013 a 2022, 31.473 casos novos de LV foram notificados (Tabela 1), dentre eles, 2.412 resultaram em óbito levando a uma taxa de letalidade de 76,6 óbitos a cada 1.000 casos confirmados, 100 vezes maior do que a de LC e 65 vezes maior do que a de LMC (SINAN, 2024).

Tabela 1 - Número total de casos confirmados de leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) no Brasil por região e UF no período de 2013 a 2022

Região/UF de notificação	LC	LMC	LV
<i>Região Norte</i>	79369	3755	5369
.. Rondônia	9345	772	7
.. Acre	9344	1096	0
.. Amazonas	14466	505	7
.. Roraima	3994	156	220
.. Pará	31069	749	3232
.. Amapá	7101	120	6
.. Tocantins	4050	357	1897
<i>Região Nordeste</i>	43094	1828	17862
.. Maranhão	14423	615	5581
.. Piauí	618	93	1824
.. Ceará	4998	197	3774
.. Rio Grande do Norte	69	4	840
.. Paraíba	512	32	423
.. Pernambuco	2784	99	1443
.. Alagoas	588	36	515
.. Sergipe	51	11	602
.. Bahia	19051	741	2860
<i>Região Sudeste</i>	18593	2208	5756
.. Minas Gerais	14048	1316	4109
.. Espírito Santo	1339	189	76
.. Rio de Janeiro	415	84	100
.. São Paulo	2791	619	1471
<i>Região Sul</i>	2661	509	114
.. Paraná	2408	434	47
.. Santa Catarina	181	51	18
.. Rio Grande do Sul	72	24	49
<i>Região Centro-Oeste</i>	24746	2265	2354
.. Mato Grosso do Sul	980	208	1504
.. Mato Grosso	19390	1387	204
.. Goiás	3995	560	493
.. Distrito Federal	381	110	153
Total	168463	10565	31473

Fonte: SINAN (2023).

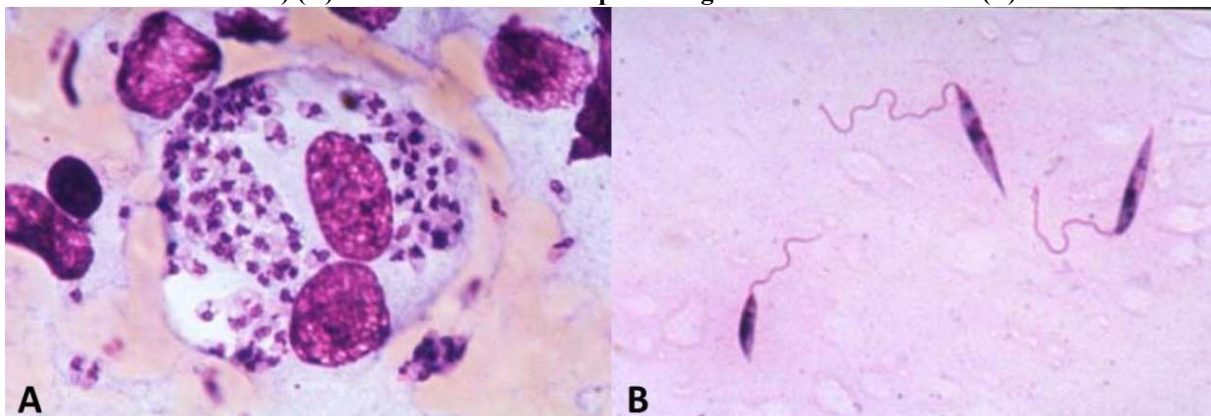
2.3 Ciclo biológico

Os vetores dos parasitos do gênero *Leishmania* são os flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e a *Phlebotomus* autor e ano no Velho Mundo (Insecta, Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), gêneros mais próximos filogeneticamente das moscas

do que dos mosquitos. São popularmente conhecidos como cangalhinha, mosquito-palha, birigui, asa-dura, dentre outros. As fêmeas infectadas transmitem o parasito durante o repasto sanguíneo que ocorre principalmente à noite ou ao crepúsculo. Medem de 1 a 3 mm de comprimento, distanciam-se, no máximo, 300 m do local de procriação que são sempre ricos em matéria orgânica em decomposição, úmidos e com sombra (FORATTINI, 1973).

As *Leishmanias* são heteroxenas (digenético), ou seja, parte do seu ciclo de vida (amastigotas) ocorre em vertebrados e outra parte (promastigotas) em insetos vetores. Mamíferos de várias ordens e espécies já foram relatados como hospedeiros desses parasitos (ROQUE; JANSEN, 2014), nos quais assumem a forma amastigota (Figura 4A) no citoplasma de células do sistema monocítico-fagocitário (SMF). As amastigotas são arredondadas ou ovaladas e imóveis (2-6 μ m), (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987).

Figura 4 - Leishmania na forma amastigota dentro do macrófago (células coradas por May Grunwald Giemsa) (A). Leishmania na forma promastigota em meio de cultura (B)



Fonte: PEREIRA (2005).

Durante o repasto sanguíneo os vetores infectam-se com os amastigotas, os quais se transformam em promastigotas procíclicos (Figura 4B), células flageladas e com corpo alongado. No trato digestivo do flebotomíneo ocorre a metaciclogênese (1 a 5 dias) que torna os promastigotas infectantes (metacíclicos) (GOSSAGE *et al.*, 2003; GENARO *et al.*, 1995a e b).

As populações de *Leishmania* apresentam uma identidade genética clonal, pois sua principal forma de reprodução é assexuada por divisão binária. Porém, a ocorrência de híbridos na natureza já foi relatada, bem como a formação de híbridos *in vitro* (TIBAYRENC; AYALA,

2013; VAN DER AUWERA; DUJARDIN, 2015; ROMANO *et al.*, 2014; GUTIERREZ-CORBO *et al.*, 2022).

2.4 Aspectos genéticos

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam peculiaridades genéticas. É ampla a variação no número e tamanho de cromossomos, o que ocorre de forma inter e intraespecífica. De forma geral, são considerados diploides; porém, podem ocorrer aneuploidias, trissomias e até a presença de 4 ou 5 cromossomos homólogos. Os genomas de *L. infantum*, *L. donovani* e *L. (L.) major* apresentam 36, enquanto o de *L. (L.) mexicana* apresenta 34 e o *Leishmania braziliensis* 35 cromossomos (BASTIEN *et al.*, 1992; DOWNING *et al.*, 2011; BRITTO *et al.*, 1998; PEACOCK *et al.*, 2007; REAL *et al.*, 2013; ROGERS *et al.*, 2011; MANNAERT *et al.*, 2012; STERKERS *et al.*, 2012).

Outra característica interessante da estrutura genômica do gênero *Leishmania* é a existência de matrizes em *tandem* (regiões de nucleotídeos repetidas em sequência) de genes duplicados (PEACOCK *et al.*, 2007). Essa redundância genética, tanto no nível de gene quanto de cromossomo, está associada ao tropismo do parasito e, conseqüentemente a variações fenotípicas e virulência (PALETTA-SILVA *et al.*, 2011; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2010; ROGERS *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2014).

É amplamente observado nesses genomas um alto grau de sintenia (PEACOCK *et al.*, 2007; DOWNING *et al.*, 2011; ROGERS *et al.*, 2015; RAYMOND *et al.*, 2012) e um baixíssimo número de genes espécie-específicos, dessa forma, alguns autores sugerem que poucos genes estão associados aos diferentes tropismos do parasita, viscerotrópicos ou dermatotrópicos (PEACOCK *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007; MAATALLAH *et al.*, 2022).

A família de genes/proteínas A2 é um exemplo dessas duplicações em *tandem*; evidências robustas indicam que o número de cópias genética de A2 está associado ao tropismo, por conseguinte capacidade de visceralização e virulência nas leishmanioses (ZHANG *et al.*, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

No período de 22 a 31 de outubro de 2023 foi realizada uma revisão sistemática de literatura utilizando-se as palavras-chave: (leishmania) AND ("a2 gene" OR "A2 protein" OR "A2rel" OR "A2 antigen" OR "A2 expression"). As buscas foram realizadas em seis bases de dados: Scielo, ScienceDirect, Scopus, Pubmed, Pubmed Central e Web of Science; não foi selecionado período específico, pois o objetivo era que todos os artigos publicados sobre o tema pudessem entrar na pesquisa.

Os critérios de inclusão das publicações foram: língua inglesa, publicação em forma de artigo científico em revista indexada e avaliação da relação entre a família gênica A2 e tropismo/visceralização em *Leishmania*. Os critérios de exclusão foram: publicação em forma de teses, dissertações, resumo de congresso ou artigo publicado em revista não indexada, artigos que não estejam em inglês ou que estejam relacionados à A2 em estudos a respeito de vacinas, testes diagnóstico, tratamento e outros.

Os metadados dos artigos selecionados nas bases foram importados para o programa Mendeley (versão 2.110.2). Do banco de dados geral foram excluídos arquivos duplicados ou vazios, para, então, iniciar as etapas de triagem: por título, por resumo e por texto completo. As etapas de triagem têm por objetivo avaliar se as publicações selecionadas atendem os critérios de inclusão e exclusão supracitados.

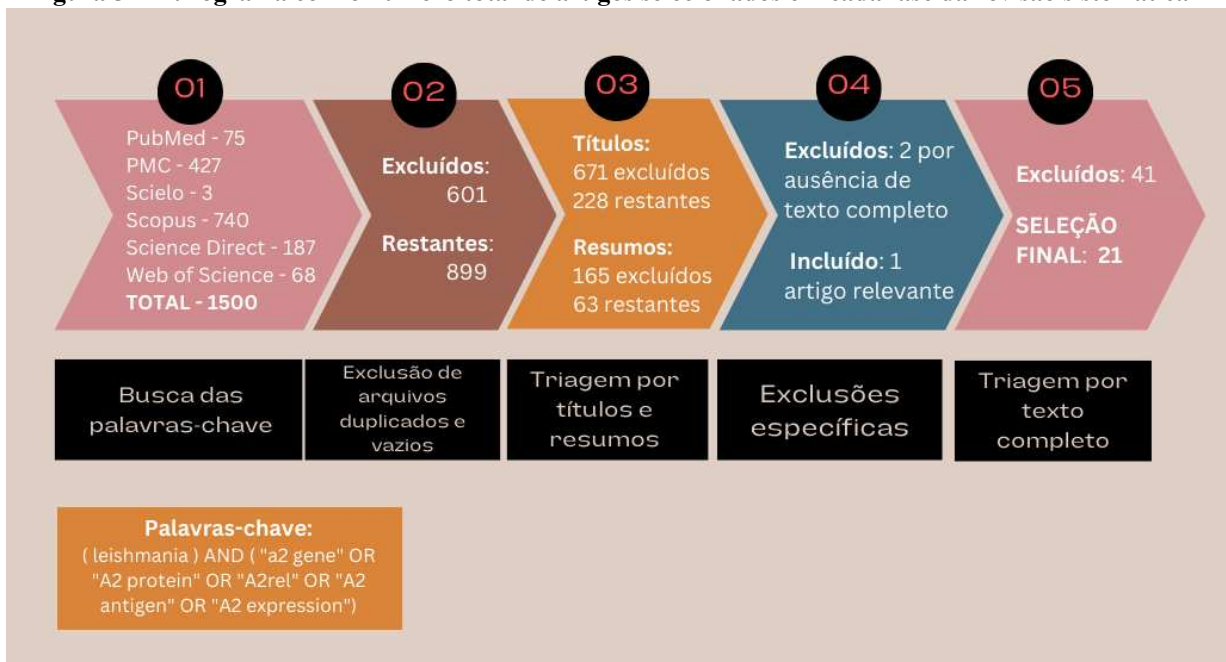
Após a devida curadoria, foram extraídas das publicações as seguintes informações: 1 - autores; 2 - data e local de publicação; 3 - revista e fator de impacto; 4 - objetivos do trabalho; 5 - principais conclusões obtidas pelos autores.

O programa Excel (versão 2311) foi utilizado para a geração do banco de dados, para cada linha uma publicação e cada coluna uma informação extraída. As figuras de autoria própria foram feitas no Canva (www.canva.com), tabelas, gráficos e quadros no Excel.

4 RESULTADOS

Na pesquisa pelas palavras-chave da revisão sistemática foram recuperados 1500 arquivos de seis bases de dados; excluindo-se os arquivos vazios e duplicados restaram 899 artigos científicos na fase 2. Destes, 21 foram efetivamente selecionados para o presente trabalho. Os números de artigos excluídos e restantes de cada etapa de seleção são apresentados na Figura 5.

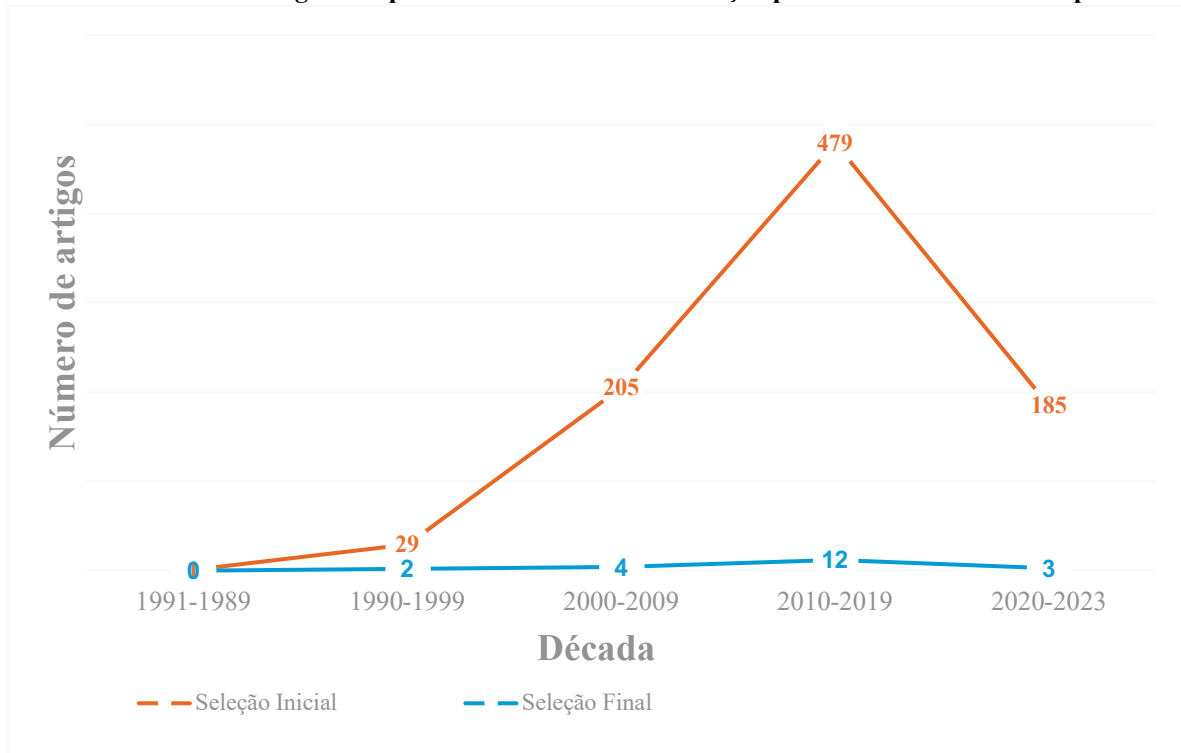
Figura 5 - Fluxograma com o número total de artigos selecionados em cada fase da revisão sistemática



Fonte: Autora (2024).

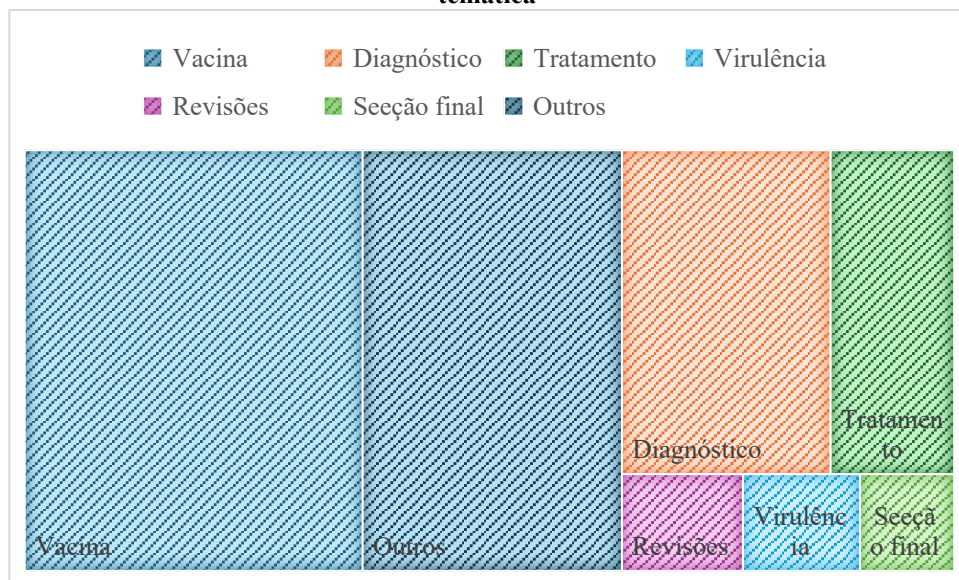
Dos 899 artigos científicos restantes na fase 2 da revisão sistemática, a maior parte foi publicada na década de 2010 a 2019, com uma média de 47,9 artigos por ano. Os dados da década atual apresentam tendência de estabilidade com uma média de 46,2 artigos por ano até 2023 (Gráfico 1). Os principais temas desses artigos foram vacinas (326), diagnóstico (155) e tratamento (92) (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Número de artigos recuperados nas fases 2 e 5 da seleção para a revisão sistemática por década



Fonte: Autora (2024).

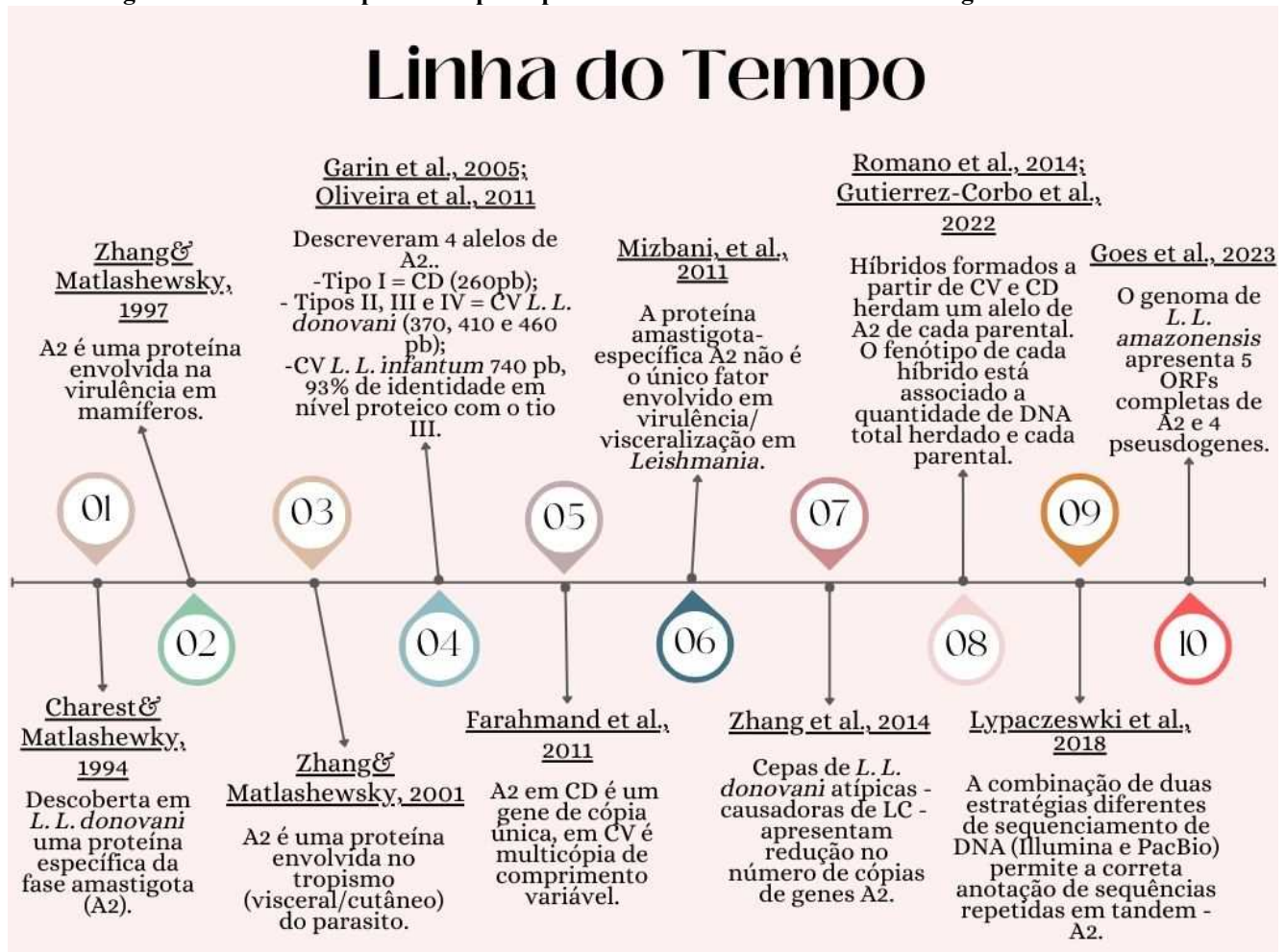
Gráfico 2 - Proporção do número de artigos recuperados na fase 2 da revisão sistemática por área temática



Fonte: Autora (2024).

Os dados completos extraídos dos 21 artigos selecionados na fase 5 para a revisão estão apresentados no Quadro 1 e resumidos na Figura 6 por meio de uma linha do tempo. O ano com maior número de publicações selecionadas foi 2011 com três trabalhos, dos anos de 1997, 2014, 2017, 2018 e 2022 dois trabalhos foram selecionados, um trabalho foi selecionado de cada um dos anos 2001, 2003, 2005, 2009, 2010, 2012, 2013 e 2023 (Gráfico 1). Dezesete trabalhos avaliaram aspectos genotípicos da família gênica A2 (80,9%), oito estudaram a expressão gênica (38,1%), enquanto 10 levaram em consideração aspectos fenotípicos (47,6%) (Quadro 1). O Canadá foi o país com o maior número de publicações (Figura 7).

Figura 6 - Linha do tempo com as principais conclusões relacionadas à família gênica A2.



CV – cepas viscerotrópicas; CD – cepas dermatrópicas. LC – leishmaniose cutânea. ORF – de leitura aberta.

Fonte: Autora (2024).

Quadro 1 - Informações de identificação dos estudos selecionados na revisão sistemática, seus objetivos e conclusões

Nro	Autor	Título	Revista	Tipo de Estudo ¹	Espécies estudadas ²	Objetivos	Conclusões
I	Ghedin <i>et al.</i> , 1997	Antibody Response against a <i>Leishmania donovani</i> Amastigote-Stage-Specific Protein in Patients with Visceral Leishmaniasis	Cinical and Diagnostic Laboratory Immunology	G F	LLDON; LLMAJ; LLTROP ; LVBRA ³	Avaliar a resposta de anticorpos contra uma proteína amastigota-específica (A2) de LLDON. Realizar cariotipagem e verificar a presença do gene A2 em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> .	Apenas pacientes infectados com parasitos dos complexos donovani e mexicana produziram anticorpos contra a proteína A2. O gene A2 está presente e é funcional em parasitos do gênero <i>Leishmania</i> , complexos donovani e mexicana.
II	Zhang <i>et al.</i> , 1997	Loss of virulence in <i>Leishmania donovani</i> deficient in na amastigote-specific protein, A2	Proceedings of the National Academy of Sciences	EG F	LLDON	Inibir a expressão/maturação do RNAm codificante de A2 por meio de produção recombinante de RNAm antisenso. Avaliar as consequências por meio de bioensaio em camundongos e cultura em amastigotas.	Promastigotas e amastigotas recombinantes que expressam RNAm antisenso de A2 apresentam virulência reduzida, demonstrando que a proteína A2 está envolvida na virulência de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> em mamíferos.
III	Zhang <i>et al.</i> , 2001	Characterization of the A2-A2rel gene cluster in <i>Leishmania donovani</i> : involvement of A2 in visceralization during infection	Molecular Microbiology	EG G F	LLDON; LLMAJ	Caracterizar a estrutura e função do cluster gênico A2-A2rel por meio de produção de promastigotas knockout heterozigotos.	Cluster A2-A2rel é essencial para a sobrevivência em cultura, visto que foi impossível produzir células knockout homozigotas. A proliferação dos mutantes em cultura e sua virulência em camundongos foram comprometidas.

							LLMAJ (controle) demonstrou capacidade aumentada de sobreviver no baço de camundongos. Estes dados sugerem que A2 desempenha um papel na visceralização da infecção associada a LLDON.
IV	Zhang <i>et al.</i> , 2003	Comparison of the A2 Gene Locus in <i>Leishmania donovani</i> and <i>Leishmania major</i> and Its Control over Cutaneous Infection	The Journal of Biological Chemistry	EG G F	LLDON; LLMAJ	Analisar detalhadamente os loci A2 em LLAMJ e LLDON. Avaliar os efeitos da expressão de A2 em LMAJ recombinante em camundongos.	A2 é um pseudogene não expresso em LLMAJ, porém contém as sequências reguladoras conservadas. LLMAJ recombinante (expressa A2) perde a habilidade de se multiplicar na pele do hospedeiro levando a produção de lesões brandas em camundongos. Surpreendentemente, regiões não codificantes apresentaram-se mais conservadas no cluster As-A2rel.
V	Garin <i>et al.</i> , 2005	A2 gene of Old World cutaneous <i>Leishmania</i> is a single highly conserved functional gene	BMC Infectious Diseases	EG G	LLINF; LLMAJ; LLTROP ; LLAET	Comparar o gene A2 em cepas isoladas de pacientes infectados com diversas espécies de <i>Leishmania</i> do Velho Mundo: 1 viscerotrópica e 5 cutâneas.	Espécies dermatrópicas de <i>Leishmania</i> compartilham um gene A2 funcional conservado, gerando na PCR uma banda única de 260pb. Ao contrário das múltiplas bandas

							resultantes da PCR do gene A2 de LLDON (tipo I - 370, tipo II - 410 e tipo III - 460pb). Essa variação ocorre pelo diferente número de repetições.
VI	Azizi <i>et al.</i> , 2009	Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans <i>Leishmania tarentolae</i>	Parasitology	G	LLMAJ; LLINF; LSTAR; LVBRA Z	Verificar se fatores de virulência bem caracterizados de <i>Leishmania</i> (A2, amastinas, cisteína-protease B, lipopofosfoglicano e leishmaniolisina) estão presentes e/ou expressos na em LSTAR.	Quase todos os fatores de virulência testados estavam presentes e expressos em LSTAR em proporções semelhantes às das espécies patogênicas. A única exceção foi a proteína A2 cujo gene não está presente em LSTAR.
VII	Sharma <i>et al.</i> , 2010	Comparative in vivo expression of amastigote up regulated <i>Leishmania</i> genes in three different forms of Leishmaniasis	Parasitology International	EG	LLDON; LLTROP	Avaliar a expressão quantitativa de 6 genes <i>Leishmania</i> estágio-específicos (P27, MAPK, PSA2, A1, A2, Uba5) por meio de RT-qPCR utilizando como amostra tecidos lesionados de pacientes com LV, PKDL e LC.	A proteína A2 não estava presente em amostras de pacientes com LC/LMC ou PKDL, porém estava expresso em grande quantidade nas amostras de medula óssea de pacientes com LV. A perda da expressão de A2 pode ser um fator importante que facilita a mudança para o fenótipo PKDL, onde o parasita não visceraliza e reside na derme, ainda mais considerando que nos dois casos o parasito é da mesma espécie.

VIII	Farahmand <i>et al.</i> , 2011	Molecular Analysis of A2-genes Encoding Stage-specific S Antigen-like Proteins among VL and CL Isolates from Iranian	Iranian Journal of Basic Medical Sciences	G	LLINF; LLMAJ; LLTROP	Realizar caracterização molecular do gene A2 em diferentes isolados cutâneos e viscerais de campo do Irã.	Os resultados indicaram que o gene A2 em CL é apenas uma cópia única de 153 pb que codifica uma proteína de 51 aminoácidos, em oposição a A2 de espécies VL com genes multi-cópia de comprimento variável (tamanhos de bandas de 320 e 550 pb).
IX	Mizbani <i>et al.</i> , 2011	Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite <i>Leishmania tarentolae</i>	Parasitology Research	F	LLINF; LSTAR	Realizar a transfecção do gene A2 de LLINF em LSTAR e avaliar seu efeito na infectividade, sobrevivência e virulência in vitro e in vivo.	Parasitas LSTAR que expressam A2 demonstraram maior infectividade em macrófagos, em camundongos observou-se aumento significativo na sobrevivência no fígado. Contudo, nenhum sinal de lesão foi observado em camundongos infectados mesmo após 6 meses, demonstrando que a presença da proteína A2, sozinha, não torna os parasitos virulentos.
X	Oliveira <i>et al.</i> , 2011.	A novel A2 allele found in <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i>	Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária	G	LLINF	Caracterização do gene A2 em LLINF isolada de cão com LV no estado de São Paulo Brasil	Descrição de novo alelo de 740pb em LLINF do Novo Mundo que tem 98% de identidade com outras sequências da mesma espécie do Velho Mundo. No nível proteico, as sequências alinhadas tiveram

							uma média de identidade de 93%. Próximo às posições 170 e 200 há uma alanina na sequência de LLINF ao invés de um resíduo de serina presente nas demais sequências A2 analisadas.
XI	McCall <i>et al.</i> , 2012	Involvement of the <i>Leishmania donovani</i> virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress	Experimental Parasitology	F	LLDON	Avaliar os efeitos da diminuição da expressão de A2 em LLDON no estresse térmico e oxidativo.	As células deficientes em A2 foram mais sensíveis ao choque térmico (tanto as promastigotas quanto as amastigotas). Amastigotas deficientes em A2 apresentaram maior quantidade de oxidantes internos e diminuíram a viabilidade após o tratamento com peróxido de hidrogênio ou um doador de óxido nítrico.
XII	Ali <i>et al.</i> , 2013	Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to <i>Leishmania mexicana</i>	Parasite Immunology	F	LLMEX	Investigar a resposta de camundongos, promastigotas e amastigotas contra a infecção por promastigotas virulentos e avirulentos (após 20 passagens em cultura in vitro) de LLMEX.	Em camundongos, a cepa virulenta (P1) causou lesão nos animais e a cepa avirulenta (P20) não. Ao longo das passagens a célula promastigota aumentou de tamanho. Genes de virulência testados em promastigotas apresentaram downregulation ao longo das passagens. A coloração de

							GIEMSA mostrou a falha de parasitas avirulentos, em se transformarem em amastigota. A proteína A2 teve expressão 8 vezes maior em amastigotas virulentos.
XII	Romano <i>et al.</i> , 2014	Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of <i>Leishmania</i> in the sand fly vector	Proceedings of the National Academy of Sciences	G E G F	LLMAJ; LLINF	Investigar a possibilidade de troca genética entre diferentes espécies de <i>Leishmania</i> , uma cepa cutânea (LLMAJ) e uma cepa visceral (LLINF), no intestino de flebotomíneos experimentalmente infectados.	Os híbridos gerados apresentaram 1 alelo A2 de LLMAJ e 1 alelo de LLINF; no entanto, a virulência variou entre os híbridos, demonstrando a existência de outros fatores, além de A2, associados a visceralização. A quantidade de DNA herdado de cada parental parece ser uma influência maior na virulência. Juntos, estes resultados indicam que a origem dos cromossomos extras na progênie 3n se correlaciona com o fenótipo, enquanto para a progênie 2n, vários mecanismos, podem controlar seus tropismos teciduais.
XIV	Zhang <i>et al.</i> , 2014	Genetic Analysis of <i>Leishmania donovani</i> Tropism Using a Naturally Attenuated	PLOS Pathogens	G E G F	LLDON	Comparar isolados de LLDON do Sri Lanka causadores de diferentes quadros clínicos	O isolado cutâneo (LC-SL) foi severamente atenuado em comparação com o isolado visceral (LV-SL) em camundongos.

		Cutaneous Strain				(visceral e cutâneo) em humanos dos pontos de vista genotípico, expressão gênica e fenotípico.	Análises genômicas e transcriptômicas demonstraram que SNPs e/ou variações no número de cópias genéticas (gene ou cromossomo) desempenham um papel importante no quadro clínico. Estes resultados representam uma validação da importância do A2 num ambiente natural; no entanto, a virulência permaneceu severamente atenuada nos parasitas LC-SL nos quais a expressão de A2 foi parcialmente restaurada.
XV	Teixeira <i>et al.</i> , 2017	Comparative analyses of whole genome sequences of <i>Leishmania infantum</i> isolates from humans and dogs in northeastern Brazil	International Journal for Parasitology	G	LLINF	Comparar 20 isolados de LLINF de causadores de diferentes quadros clínicos em humanos (visceral, cutâneo e assintomático) e cães (visceral) do nordeste do Brasil entre si e com as sequências genômicas disponíveis de 29 isolados de LLLINF/LLD ON do Nepal e da Turquia.	O complexo LDON contém 19 a 25 genes que estão ausentes, ou afuncionais, em LLMAJ e LVBRA. Na família de genes A2, SNPs ocorreram em sete locais diferentes e muitos eram heterozigotos, refletindo tanto a natureza multicópia do gene, quanto a presença de repetições internas variáveis. O único isolado cutâneo de LLDON brasileiro não apresentou SNP em nenhum dos

							25. Os isolados de indivíduos assintomáticos apresentaram menor diversidade genética do que os demais.
XVI	Valdivia <i>et al.</i> , 2017	Comparative genomics of canine isolated LLAMA from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil	Scientific Reports	G	LLAMA ; LLINF	Comparar 2 isolados de LLAMA e 3 de LLINF isolados de cães com LV em Governador Valadares, Brasil.	A maior parte dos cromossomos de LLAMA se mostraram dissômicos, diferindo dos achados em outras espécies. Variações no número de cópias gênicas em relação a LLMEX mostram que existem expansões espécie-específicas apesar da alta similaridade. Infelizmente, o gene que codifica a proteína A2, está colapsado em ambas as montagens devido à sua grande região repetitiva.
XVI I	Lypaczeswki <i>et al.</i> , 2018	A complete <i>Leishmania donovani</i> reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence	Scientific Reports	G	LLDON	Realizar montagem e anotação completa do genoma de LLDON utilizando mais de uma estratégia de sequenciamento (fragmentos curtos e longos) para torná-lo referência.	A montagem do genoma relatada resultou no fechamento de mais de 2.000 lacunas presentes no genoma referência anterior, cerca de 15% dos genes foram reanotados. Foi possível montar corretamente os clusters altamente repetitivos de genes de

							virulência A2. Identificou-se 15 novas diferenças genômicas entre cepas de LLDON causadoras de doença visceral e cutânea atípicas, fornecendo um mapa mais completo de genes associados à virulência e tropismo de órgãos viscerais.
XVI II	Samarasinghe <i>et al.</i> , 2018	Genomic insights into virulence mechanisms of <i>Leishmania donovani</i> : evidence from an atypical strain	BMC Genomics	G	LLDON	Apresentar uma comparação genômica de uma variante atípica de LLDON de um foco no Sul da Ásia, onde causa principalmente a forma cutânea da leishmaniose.	Aneuploidia cromossômica foi observada em ambos os grupos, mas foi mais frequente no LC-SL. 248 genes diferiram em 2 vezes ou mais no número de cópias entre os dois grupos. Não foi observada diferença no número de cópias de A2 entre LC-SL e LV-SL, no entanto, somente a tecnologia de sequenciamento Illumina foi empregada.
XIX	Gutiérrez-Corbo <i>et al.</i> , 2022	Axenic interspecies and intraclonal hybrid formation in <i>Leishmania</i> : Successful crossings between visceral and cutaneous strains	PLoS Neglected Tropical Diseases	G F	LLDON; LLMAJ; LLTROP	Avaliar a capacidade de troca genética entre três cepas parentais (LLDON, LLMAJ, LLTROP) em cultivo de células de flebotomíneos (LULO).	A análise de ploidia revelou um aumento no conteúdo de DNA em todos os híbridos em comparação com as linhagens parentais e a análise nuclear mostrou que os híbridos interespecíes são híbridos completos, ou seja, cada um deles apresenta pelo menos um conjunto

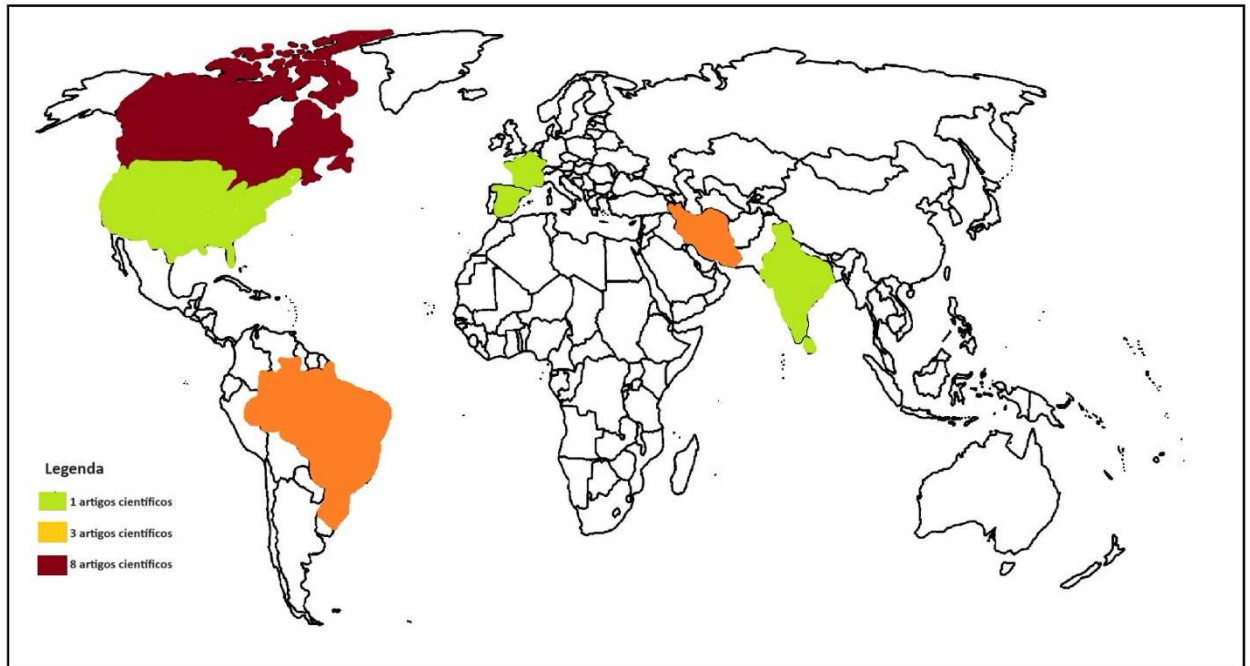
							cromossômico de cada parental, inclusive do gene A2. Estudos fenotípicos mostraram que híbridos apresentaram diminuição da capacidade de crescimento e infecção.
XX	Lypaczewski <i>et al.</i> , 2022	An intraspecies <i>Leishmania donovani</i> hybrid from the Indian subcontinent is associated with an atypical phenotype of cutaneous disease	Iscience	G	LLDON	Investigar as origens e os fatores genéticos que levaram um isolado de LLDON (Himachal Pradesh) a causar patologia atípica (CL) na Índia.	Demonstrou-se que o isolado de Himachal Pradesh é derivado de uma hibridização genética entre dois parentais independentes de LLDON. Isto revela que os híbridos intraespécies de LLDON podem dar origem a uma nova estirpe associada ao LC. O isolado do presente estudo tem um número de cópias de A2 (3,2) menor do que cepas viscerotrópicas (5,5) e cutâneas (4) do Sri Lanka.
XXI	Goes <i>et al.</i> , 2023	Complete assembly, annotation of virulence genes and CRISPR editing of the genome of <i>Leishmania amazonensis</i> PH8 strain	Genomics	G	LLAMA	Realizar montagem e anotação completa do genoma da cepa PH8 de LLAMA utilizando mais de uma estratégia de sequenciamento (fragmentos curtos e longos)	Para todas as famílias multigênicas analisadas (proteínas A2, amastinas e metaloproteases GP63), identificamos um número maior de membros no genoma PH8, comparado ao único genoma de LLAMA anotado até o momento (2269). Dentre as 9 sequências com

							homologia com A2 presentes no genoma PH8, 5 possuem ORFs completas enquanto 4 são pseudogenes. Além da análise do conteúdo gênico, análises de variação do número de cópias cromossômicas também permitiram confirmar a natureza diplóide de LLAMA e a existência de cópias extras para alguns de seus cromossomos.
--	--	--	--	--	--	--	---

Legenda: EG – expressão gênica; F – fenotípico – genotípico. LLAET – *L. (L.) aethiopica*; LLAMA – *L. (L.) amazonensis*; LLDON – *L. (L.) donovani*; LLINF - *L. (L.) infantum*; LLMAJ - *L. (L.) major*; LLMEX – *L. (L.) mexicana*; LLTROP - *L. (L.) tropica*; LVBRA – *L. (V.) braziliensis*; LSTAR – *L. (S.) tarentolae*. PCR – reação em cadeia da polimerase. RT-qPCR – seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa seguida de transcrição reversa; SNP – mutação de nucleotídeo único. DNA – ácido desoxirribonucleico. LC – leishmaniose cutânea; LMC – leishmaniose mucocutânea; LV – leishmaniose visceral; PKDL – leishmaniose cutânea pós-kalazar. SL – Sri Lanka.

Fonte: Autora (2024).

Figura 7 - Mapa mundi demonstrando os países onde os 21 artigos científicos selecionados no presente estudo foram publicados



Fonte: Autora (2024).

5 DISCUSSÃO

A complexidade das manifestações clínicas das leishmanioses parece envolver a combinação de fatores genéticos do parasita, bem como do *background* imunológico do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Diferentes espécies de *Leishmania* podem causar diferentes manifestações clínicas em humanos e cães. No Brasil há relatos da *L. amazonensis*, espécie dermatrópica (ED), causando LV em humanos na Bahia (BARRAL *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1996); em cães, casos semelhantes também foram relatados na cidade de Araçatuba, São Paulo; Paracatu, Minas Gerais; Londrina, Paraná e Governador Valadares, Minas Gerais (DIAS *et al.*, 2011; HOFFMANN *et al.*, 2012; TOLEZANO *et al.*, 2007; VALDIVIA *et al.*, 2017). Também se tem um relato de *L. Rio Grande do Norte* (TEIXEIRA *et al.*, 2017). No Sri-Lanka (ZHANG *et al.*, 2014; SAMARASINGHE *et al.*, 2018) e na Índia (LYPAZEWSKI *et al.* 2018, SHARMA *et al.*, 2010) há relatos de *L. donovani* (EV) causando doença cutânea. O mecanismo exato que leva aos quadros clínicos atípicos ainda não foi totalmente elucidado.

Uma proteína (45-100 kDa) estágio-específica altamente expressa em amastigotas denominada A2 foi descoberta em *L. donovani* (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994), é proveniente de sequências genômicas repetitivas em *tandem* (40 a >90 repetições), cada uma contendo uma sequência líder secretora e uma sequência de 10 aminoácidos. Pacientes infectados por parasitos dos complexos *donovani* e *mexicana* apresentam anticorpos anti-A2 (GHEDIN *et al.*, 1997). A expressão de A2 em *L. donovani* recombinante produtora de RNAm antisenso fica diminuída, por conseguinte, ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio quando os protozoários são submetidos experimentalmente a estresse térmico e oxidativo. Portanto, sugere-se que A2 torna *L. donovani* capaz de sobreviver nas células dos hospedeiros vertebrados onde encontra um ambiente de temperatura mais elevada e oxidativo (MCCALL *et al.*, 2012).

Fernandes *et al.* (2014) usaram sequências do Dihidrofolato Redutase Timidilato-sintetase (DHFR), um gene constitutivo conservado e funcionalmente equivalente entre todas as espécies de *Leishmania*, para retratar uma filogenia de diferentes espécies desse gênero. Os autores sugerem que as sequências de A2 foram, provavelmente, adquiridas por um ancestral comum entre *L. donovani* / *L. infantum* / *L. amazonensis* depois da divergência do ancestral compartilhado com *L. major*. Comparando *L. major* com *L. donovani*, Zhang, *et al.* (2001)

observaram que regiões codificantes são menos conservadas do que as não-codificantes no cluster As-A2rel, o que não é comum.

Em *L. major*, A2 é um pseudogene não expresso devido à ausência de várias repetições nas múltiplas sessões da proteína no genoma. Por outro lado, *L. major* recombinante (expressa A2) perde a habilidade de se multiplicar na pele do hospedeiro quando testado em camundongos susceptíveis (BALB/c) ou resistentes (C57BL6) (ZHANG, *et al.*, 2003). Garin *et al.* (2005), contrariamente a Zhang *et al.* (2003), afirmam que A2 em espécies causadoras de LC do Velho Mundo são genes funcionais. Eles descrevem três diferentes alelos de A2 em *L. donovani* (370 pb tipo II, 410 pb tipo III e 460 pb tipo IV) e um nas espécies causadoras de LC (260 pb tipo I). Mais tarde foi descrito um novo alelo em *L. infantum* com 740 pb (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Farahmand *et al.* (2011) estudaram essa família de genes em isolados do Irã e observaram que em espécies causadoras de LC este gene estava presente em apenas uma cópia, enquanto em espécies causadoras de LV ela estava presente em multicópias.

Diversas pesquisas confirmam A2 como determinante de virulência em *Leishmania*. Parasitas *knockout* heterozigotos apresentam menor capacidade de infectar macrófagos e causar lesões no baço e camundongos BALB/c; bem como isso foi observado em promastigotas produtores de RNAm antisenso de A2 (ZHANG; MATLASHEWSKI, 1997 e 2001). Zhang *et al.* (2014) realizaram sequenciamento de nova geração de genoma completo em isolados de *L. donovani* do Sri-Lanka cujos pacientes apresentavam duas formas clínicas diferentes da doença, LV (cepas viscerotrópica) e LC (cepa dermatotrópica). Os autores observaram que um dos polimorfismos encontrados entre os isolados foi o número de cópias do gene A2; encontrado em menor número nos isolados causadores de doença cutânea. Os resultados desses quatro estudos combinados confirmam que o tropismo por vísceras está altamente associado ao número de cópias de A2 no genoma.

Rogers *et al.* (2015), compararam os genomas de *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* e encontraram 56 genes codificantes que se apresentavam em múltiplas cópias nas quatro espécies; a variação no número de cópias encontrada é considerável, alguns exemplos desses genes são: PSA2, Glicorproteína 46 (GP46), amastina e Glicorproteína 63 (GP63).

Realizou-se a comparação da expressão gênica de genes sabidamente associados à virulência em *Leishmania*: GP63, A2, amastinas, LPG3 e CPT-I, entre *L. tarentolae*, espécie avirulenta, e *L. infantum*, causadora de LV no Novo Mundo. Os autores concluíram que o único

fator de virulência em que o nível expressão gênica variou foi A2 (AZIZI *et al.*, 2009), e que *L. tarentolae* não apresenta o gene A2. *L. tarentolae* recombinante (expressa A2) apresenta maior infectividade, porém não se torna capaz de causar doença, demonstrando que A2 não é o único fator necessário para virulência ausente em *L. tarentolae* (MIZBANI *et al.*, 2011).

Promastigotas de *L. mexicana* virulentos (1 passagem em cultura) e avirulentos (20 passagens em cultura) foram avaliados quanto a expressão da proteína A2, foi observada oito vezes mais A2 em parasitos virulentos quando comparados aos avirulentos (ALI *et al.*, 2013).

Um estudo inédito avaliou a expressão quantitativa de seis genes estágio-específico (P27, MAPK, PSA2, A1, A2, Uba5) por meio de RT-qPCR utilizando como amostra tecidos lesionados de pacientes com LV, PKDL e LC. Especificamente, o gene A2 não estava expresso em amostras de pele (LC e PKDL); porém estava expresso em grande quantidade nas amostras de medula óssea de pacientes diagnosticados com LV. A perda da expressão de A2 pode ser um fator importante que facilita a mudança para o fenótipo PKDL, onde o parasita não visceraliza e reside na derme (SHARMA *et al.*, 2010).

A recombinação de *L. major* e *L. infantum* em flebotomíneos (ROMANO *et al.*, 2014) e de *L. donovani*, *L. tropica* e *L. major* em cultivo celular (GUTIERREZ-CORBO *et al.*, 2022) demonstrou que híbridos de EV e ED herdaram um alelo de A2 de cada parental; no entanto, a virulência variou entre os híbridos, sugere-se que a quantidade de DNA herdado de cada parental parece ser uma influência maior na virulência do que somente a família gênica A2.

Ao comparar 20 isolados de *L. infantum* causadores de diferentes quadros clínicos em humanos e animais do nordeste do Brasil entre si e com as sequências genômicas disponíveis de 29 isolados de *L. infantum* e *L. donovani* do Nepal e da Turquia, Teixeira *et al.*, (2017) relataram que o complexo *L. infantum/L. donovani* contém 19 a 25 genes que estão ausentes, ou presentes como pseudogenes, em *L. major* e *L. braziliensis* causadoras de LC. Quatro desses genes apresentaram SNPs nos isolados brasileiros, na família de genes A2, os SNPs ocorreram em sete locais diferentes e muitos eram heterozigotos, refletindo tanto a natureza multicópia dos genes quanto a presença de repetições internas cujas sequências podem variar. O único isolado cutâneo não apresentou SNPs em nenhum desses 25 genes que o distingam dos outros 19 isolados brasileiros. Isolados de pacientes assintomáticos apresentaram menor diversidade do que isolados de indivíduos sintomáticos.

Sequenciou-se o genoma de dois isolados de *L. amazonensis* provenientes de cães com LV, os quais foram comparados com a cepa referência M2269. Os resultados deste estudo

encontraram cerca de 15 mil polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) entre os isolados e cerca de 14 mil compartilhados entre eles. Quando analisados os números de cópias dos cromossomos, os autores verificaram que a maioria dos cromossomos de ambos os isolados tinham número de cópias haploides, exceto o cromossomo 30, que apresentava ampliações cromossômicas completas e parecia ser tetrassômico em ambos os isolados (VALDIVIA *et al.*, 2017). Este cromossomo é homólogo ao cromossomo 31 em outras espécies de *Leishmania*, nas quais é consistentemente polissômico e enriquecido para genes regulados positivamente para amastigotas. Esses genes parecem estar envolvidos nas estratégias de sobrevivência do parasito dentro das células hospedeiras, sugerindo que o aumento no número de cópias desse cromossomo poderia favorecer a adaptação do parasito à infecção, sobrevivência e proliferação do vertebrado (REIS-CUNHA; VALDIVIA; BARTOLOMEU, 2018). Infelizmente, o gene que codifica a proteína A2 está colapsado em ambas as montagens devido à sua grande região repetitiva.

O genoma de um isolado dermatrópico de *L. donovani* do Sri-Lanka foi sequenciado utilizando-se duas tecnologias: Illumina (segunda geração) e PacBio (terceira geração) com objetivo de aumentar a precisão durante a montagem e anotação. Foi possível montar corretamente os clusters altamente repetitivos de genes de virulência A2; por meio de *Western blotting* confirmou-se a existência de um cluster com 3 cópias do gene e outro com uma cópia nesse isolado de *L. donovani* dermatrópico, ou seja, atenuado. Ao comparar isolados dermatrópicos com viscerotrópicos, os autores concluíram que a evolução entre patologias cutâneas e viscerais por diferentes espécies de *Leishmania* é resultado de SNPs, pseudogenes e variação do número de cópias gênicas; e não de grandes mudanças, como rearranjos cromossômicos ou deleções/inserções completas de genes (LYPAZEWSKI *et al.*, 2018).

Investigou-se os fatores genéticos que levam um isolado dermatrópico de *L. donovani* da Índia a causar patologia atípica. Observou-se que o isolado em questão tem um número de cópias de A2 (3,2) menor do que cepas viscerotrópicas (5,5) e cutâneas (4) do Sri Lanka (LYPAZEWSKI *et al.*, 2018).

Goes *et al.* (2023), sequenciaram o genoma de *L. amazonensis* (PH8). Dentre as nove sequências de A2 encontradas, cinco apresentaram ORFs completas enquanto quatro eram pseudogenes. As proteínas A2 possuem entre 600 e 1089 aminoácidos, dependendo do número de repetições gênicas, a estrutura da proteína A2 de *L. amazonensis* é semelhante à A2 de outras espécies de *Leishmania*, com uma sequência N-terminal seguida pelo módulo repetido de 10

aminoácidos VGP[Q/L]SVGPQS que ocorrem de 40 a 90 vezes. Distinta de todas as outras proteínas A2, uma segunda repetição, SLLAR, é encontrada na proteína da cepa PH8.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de amplo conhecimento que a família gênica A2 é composta por diversas sequências repetidas em *tandem*, e que está presente em grande quantidade em espécies de *Leishmania* causadoras de quadro clínico visceral (complexo *donovani*). Essa família gênica codifica uma proteína estágio-específica expressa em formas amastigotas que confere ao parasito capacidade de se adaptar ao ambiente intracelular no hospedeiro vertebrado e, principalmente, a se multiplicar nas vísceras deles. Embora A2 esteja fortemente envolvida na capacidade de visceralização de *Leishmania*, comprovado inclusive em isolados causadores de quadros clínicos atípicos, ela não é a única responsável pelo tropismo e virulência do parasito. Estudos recentes apontam que o fenótipo de híbridos de EDs e EVs varia de acordo com a cepa parental de quem ele recebeu mais quantidade total de DNA. A presença de SNPs, pseudogenes e duplicação genética são a forma de variabilidade mais importantes no tropismo de parasitos do gênero *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. P.; *et al.* Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, p. 178–184, 1996.
- ALI, K. S.; *et al.* Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to *Leishmania mexicana*. **Parasite immunology**, v. 35, n. 12, p. 441-456, 2013.
- ALVAR, J.; *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS one**, San Francisco, v. 7, n. 5, 2012.
- AZIZI, H.; *et al.* Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. **Parasitology**, v. 136, n. 7, p. 723-735, 2009.
- BARRAL, A.; *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, p. 536–546, 1991.
- BASTIEN, P.; *et al.* *Leishmania*: sex, lies and karyotype. **Parasitology Today**, Oxford, v. 8, p. 174–7, 1992.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. [Brasília]: [MS], 2014. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al_1edicao.pdf. Acesso em: 01 mai. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [Brasília]: [MS], 2017. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 01 mai. 2023.
- BRITTO, C.; *et al.* Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v. 222, n. 1, p. 107–117, 1998.
- CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 14, 2975–2984, 1994.
- DIAS, E. S.; *et al.* Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazilian. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 101–111, 2011.
- DOWNING, T.; *et al.* Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance, **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2143–2156, 2011.

- FARAHMAND, M.; *et al.* Molecular analysis of A2-genes encoding stage-specific S antigen-like proteins among isolates from Iranian cutaneous and visceral leishmaniasis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 14, n. 5, p. 407, 2011.
- FERNANDES, A. P.; *et al.* A2 and other visceralizing proteins of *Leishmania*: role in pathogenesis and application for vaccine development. **Subcellular Biochemistry**, v. 74, p. 77-101. 2014.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. v. 4. 1^a ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1973. 658p.
- GARIN, Y. J. F.; *et al.* A2 gene of Old World cutaneous *Leishmania* is a single highly conserved functional gene. **BMC infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2005.
- GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p.41-60.
- GHEDIN, E. *et al.* Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 5, p. 530-535, 1997.
- GOES, W.; *et al.* Complete assembly, annotation of virulence genes and CRISPR editing of the genome of *Leishmania amazonensis* PH8 strain. **Genomics**, p. 110661, 2023.
- GOSSAGE, S. M.; *et al.* Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003
- GUTIÉRREZ-CORBO, C. *et al.* Axenic interspecies and intraclonal hybrid formation in *Leishmania*: Successful crossings between visceral and cutaneous strains. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p. e0010170, 2022.
- HOFFMANN, A. R., *et al.* *Leishmania amazonensis* in dog with clinical diagnosis of visceral leishmaniasis in Paraná State, Brazil – a case report *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. **Sêmima - Ciências Agrárias**, v. 33, p. 3265–3270, 2011.
- LYPACZEWSKI, P. *et al.* A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 16549, 2018.
- LYPACZEWSKI, P., *et al.* Evidence that a naturally occurring single nucleotide polymorphism in the RagC gene of *Leishmania donovani* contributes to reduced virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, 2021.
- MAATALLAH, I. A.; *et al.* Tissue tropism: Is it an intrinsic characteristic of *Leishmania* species? **Acta Tropica**, v. 232, p. 106512, 2022.

MANNAERT, A.; *et al.* Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 370–376, 2012.

MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 2, p. 109-115, 2012.

MIZBANI, A. *et al.* Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*. **Parasitology research**, v. 109, p. 793-799, 2011.

MOLYNEUX, D. H.; *et al.* The Leishmaniasis in biology and medicine: biology and epidemiology. vol. 1, London: **Academic Press**, 1987, p.122-168.

OLIVEIRA, T. M. F. S. *et al.* A novel A2 allele found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 42-48, 2011.

PALETTA-SILVA, R.; *et al.* *Leishmania amazonensis*: characterization of na ecto-30-nucleotidase activity and its possible role in virulence, **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 3, p. 277–283, 2011.

PEACOCK, C. S.; *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, Nova York, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.
PEREIRA, E. F. A. **Variabilidade Genética e Diagnóstico Molecular da *Leishmania* spp., pelas Técnicas de RAPD e PCR, no estado do Paraná e Casos Importados**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

RAYMOND, F.; *et al.* Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2012.

REAL, F.; *et al.* The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**, v. 20, p. 567–581, 2013.

REIS-CUNHA, J. L., *et al.* Gene and chromosomal copy number variations as an adaptive mechanism towards a parasitic lifestyle in trypanosomatids. **Current genomics**, v. 9, n. 2, p. 87-97, 2018.

ROGERS, M. B.; *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 2015.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014

- ROMANO, A. *et al.* Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, p. 16808-16813, 2014.
- SAMARASINGHE, S. R. *et al.* Genomic insights into virulence mechanisms of *Leishmania donovani*: evidence from an atypical strain. **BMC genomics**, v. 19, p. 1-18, 2018.
- Schoch CL, *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database (Oxford)**, jan., 2020.
- SHARMA, P. *et al.* Comparative in vivo expression of amastigote up regulated *Leishmania* genes in three different forms of Leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 262-264, 2010.
- SILVA, T. F., *et al.* Phenotypical and genotypical differences among *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: A systematic review. **Acta Tropica**, v. 221, n. 1, 106018, 2021.
- SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 02 mar 2024.
- SMITH, D. F.; *et al.* Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **International Journal of Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 1173–1186, 2007.
- STERKERS, Y.; *et al.* Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 15–23, 2012.
- TEIXEIRA, D. G., *et al.* Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. **International journal for parasitology**, v. 47, n. 10-11, p. 655-665, 2017.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. How clonal are *Trypanosoma and Leishmania*? Trends in Parasitology, **Oxford**, v. 29, n. 6, p. 264–269, 2013.
- TOLEZANO, J.E.; *et al.* The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 149, p. 280–284, ago., 2007.
- VALDIVIA, H. O.; *et al.* Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- VAN DER AUWERA, G.; DUJARDIN, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 265-294, 2015.
- WHO, World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2023 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 23 março 2024.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Screening *Leishmania donovani* specific genes required for visceral infection. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 505–517, 2010.

ZHANG, W-W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 16, p. 8807-8811, 1997.

ZHANG, W.-W., *et al.* A Genomic-based approach combining in vivo selection in mice to identify a novel virulence gene in *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, e248, 2008.

ZHANG, W-W.; MATLASHEWSKI, G. Characterization of the A2–A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 4, p. 935-948, 2001.

ZHANG, W-W *et al.* Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35508-35515, 2003.

ZHANG, W-W.; *et al.* Genetic analysis of *Leishmania donovani* Tropism using a naturally attenuated cutaneous strain. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, 2014.