

RESUMO

Discriminação de organismos do gênero *Leishmania* por análises de perfis de dissociação de DNA em alta resolução (HRM – *High Resolution Melting*)

Leishmanioses são doenças categorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como negligenciadas, o que as caracterizam como aquelas que prevalecem em condições de pobreza e representam significativo entrave ao desenvolvimento por contribuírem para desigualdade nos países em que são endêmicas. Estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas vivem sob o risco de infecção em 98 países da África, Eurásia e Américas. Acometem o homem e outros animais sob um espectro clínico amplo, que varia de discretas lesões de cura espontânea a quadros de comprometimento sistêmico, potencialmente fatais se não tratadas ou se tratadas de forma incorreta. A manutenção do ciclo de transmissão está inserida em um sistema biológico complexo, com a participação de mais de 20 espécies do parasita e uma grande variedade de reservatórios e vetores, e o diagnóstico está entre as estratégias empregadas para o controle dessas doenças. A precisa identificação das espécies envolvidas no ciclo de transmissão permite a geração de dados importantes para mapeamentos ecoepidemiológicos e para o delineamento de estratégias terapêuticas e de controle. O material genético do parasita como alvo de detecção e identificação desses organismos é descrito na literatura científica em trabalhos que abordam diversas estratégias metodológicas. Entre as técnicas descritas mais recentes estão as análises de dissociação do DNA em alta resolução (HRM- *High Resolution Melting*), descrita como uma estratégia eficiente para a discriminação de polimorfismos em fragmentos específicos de DNA gerados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Aqui propomos um protocolo de detecção e identificação de *Leishmania* desenhado para discriminar o maior número possível de espécies com base em polimorfismos do gene *hsp70*, utilizando HRM como ferramenta metodológica. Sequências nucleotídicas de *hsp70* disponíveis em banco de dados e obtidas no laboratório foram analisadas *in silico* e regiões polimórficas foram delimitadas. Das regiões delimitadas, três foram escolhidas por conterem polimorfismos que geraram fragmentos cujas temperaturas de dissociação simuladas são distintas entre espécies ou grupo de espécies. A exploração de perfis de dissociação dos três amplicons de *hsp70* obtidos por PCR em tempo revelam diferenças que permitem a discriminação das espécies de *Leishmania* responsáveis por doenças nas Américas, África e Eurásia. A metodologia foi padronizada com a utilização de DNA de cepas-referência de *Leishmania* e então aplicados a amostras de DNA obtidas de amostras clínicas, de campo ou experimentais, como isolados, biópsias humanas frescas ou fixadas, flebotomíneos e cães naturalmente infectados e camundongos experimentalmente infectados. Os resultados obtidos por HRM foram comparados aos obtidos previamente por outras metodologias como sequenciamento, com confirmação da identidade do parasita nas amostras testadas. O protocolo descrito é relativamente barato, tecnicamente simples, passível de automatização, e pode ser uma alternativa para a detecção e identificação de *Leishmania* em amostras biológicas, gerando dados relevantes para estudos diagnósticos e ecoepidemiológicos.