

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociência - Campus de Botucatu

Departamento de Parasitologia

Letícia Tsieme Gushi

**Dinâmica populacional de minicírculos de
cinetoplastos em**

Leishmania infantum chagasi

Tese de Doutorado

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu – SP

2012

Letícia Tsieme Gushi

**Dinâmica populacional de minicírculos de
cinetoplastos em**

Leishmania infantum chagasi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética. Área de Concentração: Genética de Microorganismo, para a obtenção do título de doutora.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Botucatu 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Gushi, Letícia Tsieme.

Dinâmica populacional de minicírculos de cinetoplastos em *Leishmania infantum chagasi* / Letícia Tsieme Gushi. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Capes: 20202008

1. Parasitologia. 2. Mitocôndria. 3. Leishmania.

Palavras-chave: Cinetoplastos, Dinâmica Populacional, *Leishmania infantum chagasi*, Minicírculos e RNA-guia.

Dedico este trabalho ao meu avô Bortholo Santa Rosa Netto (in memoriam). Jamais conseguirei expressar em palavras todo o amor por você. Saudades eternas! Sua boneca dos olhos de jabuticaba.

“Veja!
 Não diga que a canção
 Está perdida
 Tenha fé em Deus
 Tenha fé na vida
 Tente outra vez!...”

Beba!
 Pois a água viva
 Ainda tá na fonte
 (Tente outra vez!)
 Você tem dois pés
 Para cruzar a ponte
 Nada acabou!
 Não! Não! Não!...

Tente!
 Levante sua mão sedenta
 E recomece a andar
 Não pense
 Que a cabeça aguenta
 Se você parar
 Não! Não! Não!
 Não! Não! Não!...

Há uma voz que canta
 Uma voz que dança
 Uma voz que gira
 Bailando no ar

Queira!
 Basta ser sincero
 E desejar profundo
 Você será capaz
 De sacudir o mundo
 Vai!
 Tente outra vez!
 Tente!
 E não diga
 Que a vitória está perdida
 Se é de batalhas
 Que se vive a vida
 Tente outra vez!”

Tente outra vez - Raul Seixas

Agradecimientos

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pois em um país onde a educação é tão precária, poder concluir o doutorado é um privilégio, espero poder contribuir com a minha pesquisa para a construção de um país melhor.

A agência de fomento CAPES pela bolsa concedida durante esses três anos e meio, para que assim eu pudesse me dedicar integralmente à pesquisa.

Ao meu orientador Paulo Ribolla por me dar oportunidade e liberdade para desenvolver minha pesquisa. Toda minha formação como profissional aconteceu sob sua orientação, desde a iniciação científica até o doutorado, serei eternamente grata por tudo que aprendi.

Aos amigos do laboratório PANGENE: Alíne A., Alíne B., Caríne, Diego, Giovana, Letícia A., Letícia O., Lina, Mel, Teresa, por todas as conversas, desde as dúvidas de trabalho, aos momentos de descontração.

A Prof^a Dr^a Maria do Socorro Pires e Cruz, Universidade Federal do Piauí e a Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, por cederem as amostras para esse estudo.

A todos os colegas do Departamento de Parasitologia. Especialmente Gi, Ériquinha e Érica B., pelas conversas na cozinha e corredores do departamento.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Nilza, Valdir e Roberto, por todas as vezes que precisei e vocês me ajudaram e pelas risadas nos momentos de descontração.

A todos os docentes do Departamento de Parasitologia, por todos os ensinamentos em todos esses anos. Especialmente as Professoras Semíramis e Teresa Cristina, pela amizade e carinho, por todos os conselhos nos momentos difíceis e por sempre torcerem por mim.

A minha família: meus pais Sérgio e Célia, meu irmão Marcel e minha cunhada Thaís, minha irmã Lívia e meu cunhado Juliano, pois sem o amor e o apoio de vocês nada faria sentido. Aos meus sobrinhos Isabela e Lucas, vocês são a minha razão de viver.

Aos meus amados avós maternos: Bortholo (in memoriam) e Júlia, paternos: Francisco e Eunice por todo amor incondicional e carinhos sem fim.

Aos meus tios e primos por torcerem por mim sempre.

As minhas amigas irmãs Kátia, Érica Leles, Élen e Gabi pelos desabaços, conselhos, risadas, por sempre torcerem pela minha felicidade. A vida fica muito mais leve com vocês do meu lado.

A XXXVII pelos melhores anos da minha vida e reencontros memoráveis. Amigos que vou levar no coração a vida toda.

Ao meu amor Carlos Roballo pela paciência, carinho e palavras de incentivo nesta fase tão difícil.

Sumário

Abstract.....	07
Resumo.....	08
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Histórico da Leishmaniose	12
1.2. Ciclo de Transmissão da Leishmaniose Visceral Americana.....	15
1.3. <i>Leishmania infantum chagasi</i> Rey (2001).....	18
1.4. Expressão Gênica em <i>Leishmania</i> sp.....	20
1.5. Cinetoplasto, Liu <i>et al.</i> (2005).....	22
2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Amostragem.....	26
3.2. Extração do material genético.....	26
3.3. Amplificação do kDNA pela PCR.....	27
3.4. Clonagem.....	28
3.5. Sequenciamento dos minicírculos.....	31
3.6. Análise das sequências.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
6. ANEXOS.....	61
6.1. Tabela 1: Comparação das sequências obtidas no trabalho com as depositadas no GENBANK.....	61
6.2. Descrição das Classes de Minicírculos.....	82

Abstract

American Visceral Leishmaniasis (AVL) is a neglected tropical disease in expansion in Brazil currently occurring in areas where there has never been reports. Its etiologic agent is *Leishmania chagasi*, a protozoan belonging to the order Kinetoplastida characterized by an organelle named kinetoplast which has a DNA organized in a network containing maxicircles, responsible for respiratory functions and minicircles, involved in the production of guide RNAs, which play a role in the RNA editing of maxicircles. The minicircles are divided into an approximately 120 b.p. conserved region and an approximately 600 b.p. variable region. The focus of this study is on the sequence analysis of the minicircles variable region in order to understand its distribution on different life stages of *L. chagasi*. Samples were collected from dogs and symptomatic patients by lymph node aspiration and, in some cases, primary cultures were obtained. DNA extraction was carried out with the commercial kit Nucleo Spin Blood Kit (Macherey - Nagel) following its protocol. kDNA was amplified by PCR, using a pair of oligonucleotides LIN R4 - forward (5'-GGT TGG TGT AAA ATA GGG-3') and LIN 19 - reverse (5'-GAA CGC CCC TAC CCG-3'), producing a fragment of 720 b.p. PCR products were cloned in pTZ57R/T vector according to the InsTAclone PCR cloning kit protocol. Sequences (182) were individually compared with the ones deposited at the GENBANK, aligned with Clustal X2 software and had a phylogenetic tree constructed utilizing MEGA 4.0 software adopting UPGMA algorithm and choosing bootstrap with 1000 replicates. Sequences distribution among different hosts was homogeneous. At first, high polymorphism is observed but, when analyzed in more detail, i.e. by branch, sequences proved to be conserved and minimal SNP (Single Nucleotide Polymorphism) was found. According to literature regarding minicircles classes sequences may vary by 1 to 2 %; therefore, the SNPs found in this study were used as criterion to separate classes. Based on the data different sequences were categorized in 53 classes. There was an interesting discovery while comparing sequences with the ones available in the GenBank. Despite limited coverage similarity of chromosome 27 of the *Leishmania donovani* was observed in all sequences, which leads us to question whether the gRNA could have a post transcriptional editing role not only in maxicircles but also in nuclear DNA. These are preliminary findings and more sequences will be analyzed prior to the conclusion of this research allowing for better understanding of the minicircles distribution validating or not this theory. Due to the complexity of this matter further researches should be developed.

Key words: *Leishmania chagasi*, population dynamics, minicircles and guide RNA.

Resumo

Leishmaniose Visceral Americana (LVA) é uma doença tropical negligenciada em expansão no Brasil, ocorrendo em áreas onde antes não havia registro. Seu agente etiológico é a *Leishmania chagasi* um protozoário pertencente à classe Kinetoplastida caracterizada por uma organela denominada cinetoplasto a qual possui um DNA organizado em uma rede contendo maxicírculos, responsáveis pelas funções respiratórias e minicírculos, envolvidos na produção de RNAs-guia, os quais possuem um papel importante na edição dos RNAs dos maxicírculos. Os minicírculos são divididos em uma região conservada de aproximadamente 120 p.b. e uma região variável de aproximadamente 600 p.b. O foco desse estudo está na análise das seqüências da região variável a fim de entender sua distribuição nos diferentes estágios de vida da *L. chagasi*. As amostras foram coletadas de cães e pacientes sintomáticos por aspiração dos linfonodos e, em alguns casos, foram obtidas culturas primárias. A extração do DNA foi realizada com o kit comercial Nucleo Spin Blood Kit (Macherey - Nagel) seguindo as instruções do protocolo. O kDNA foi amplificado por PCR, utilizando o par de oligonucleotídeos LIN R4 - forward (5'-GGT TGG TGT AAA ATA GGG-3') e LIN 19 - reverse (5'-GAA CGC CCC TAC CCG-3'), produzindo um fragmento de aproximadamente 720 p.b. Os produtos da PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T de acordo com o protocolo do InsTAclone PCR cloning kit. As seqüências (aproximadamente 182) foram individualmente comparadas com as depositadas no GenBank, alinhadas com o software Clustal X2 e tiveram uma árvore filogenética construída utilizando o software MEGA 4.0 adotando o algoritmo UPGMA e escolhendo um *bootstrap* com 1000 replicatas. A distribuição entre os diferentes hospedeiros foi homogênea. A princípio, um lato polimorfismo é observado, mas, quando analisadas mais detalhadamente, ramo por ramo, as seqüências demonstraram-se muito conservadas em poucos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) foram encontrados. De acordo com a literatura, as sequencias das classes de minicírculos podem variar entre 1 a 2%, portanto, este foi o critério utilizado neste estudo para separar as classes. Baseados nos dados das diferentes seqüências foram categorizadas em 53 classes. Houve uma descoberta interessante ao comparar as sequencias com as depositadas no GenBank. Apesar da pequena cobertura foi observada, em quase todas as seqüências, similaridade com seqüências do cromossomo 27 de *L. donovani*, o que nos leva a questionar se o gRNA pode função não somente na edição pós-transcricional dos maxicírculos, mas também no DNA nuclear. Estes ainda são os resultados preliminares e mais sequencias serão analisadas antes da conclusão dessa pesquisa, para que possamos ter uma melhor compreensão da distribuição dos minicírculos e validar ou não essa teoria. Devido a complexidade deste assunto mais pesquisas serão necessárias.

Palavras-chaves: *Leishmania chagasi*, dinâmica populacional, cinetoplasto, minicírculos e RNA-guia.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da Leishmaniose

A primeira observação dos agentes etiológicos das leishmanioses ocorreu no final do século XIX, quando Cunningham (1885), na Índia, descreveu formas amastigotas em casos denominados “Calazar”. Posteriormente, em 1898, o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico encontrado no oriente, sem, entretanto lhe dar nome. Mais tarde, Leishman (1903), observou corpúsculos ovais com 2-3 μm de diâmetro em preparações de baço de um soldado inglês que havia morrido de febre Dum-Dum, contraída em Calcutá na Índia. Ao mesmo tempo, Donovan (1903), relatou esses mesmo parasitos em aspirados esplênicos de um menino hindu com 12 anos de idade que estava acometido de uma febre irregular. Laveran & Mesnil (1903) consideraram o parasito associado ao calazar indiano um piroplasma, nomeando-o então de *Piroplasma donovani*. Ainda em 1903, Ross demonstrou que os organismos evidenciados na preparação de Donovan não eram esporozoários como este havia proposto e estabeleceu um novo gênero (*Leishmania*) e denominou de *Leishmania donovani* o agente etiológico do calazar. Em 1904, Rogers cultivou o protozoário em sangue citratado a 22°C e demonstrou serem flagelados. Em 1908 Nicolle & Comte demonstraram pela primeira vez o parasito em cães na Tunísia, sugerindo seu possível papel como reservatório da doença.

Em 1934, Penna, relatou o primeiro encontro do parasita no Brasil, após examinar lâminas de cortes histológicos de fígados, obtidos por meio de viscerotomia *post-mortem* para o diagnóstico anatomopatológico da febre amarela, este pesquisador observou o protozoário do gênero *Leishmania* em 41 lâminas.

Lutzomyia longipalpis, flebotomíneo transmissor da leishmaniose visceral endemicamente encontrado na região nordeste do Brasil, foi originalmente identificado como transmissor de tal moléstia por Lutz & Neiva (1912).

Entre 1936 e 1939, Evandro Chagas e seus colaboradores realizaram extensos estudos demonstrando então a doença em homens e em cães e o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* foi incriminado como provável vetor e o agente etiológico nas Américas foi classificado como *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas (1937).

A leishmaniose visceral (LV) encontra-se distribuída em 22 países no Novo Mundo e 66 nações do Velho Mundo, concentrando-se principalmente no Sudeste da Ásia, África Oriental e Brasil (Figura1). Infecções em humanos ocorrem em 16 países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal (WHO, 2009). No entanto, a maior parte dos casos de LV (>90%) concentra-se em seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil. Sendo que Índia, Nepal e Bangladesh abrigam em torno de 67% dos casos mundiais Chappuis (2007). Na Ásia e África o agente etiológico responsável pela LV é a espécie *Leishmania donovani* e dentre uma das peculiaridades está a transmissão homem-homem, não tendo o cão ou outro mamífero como reservatório. Já na região do Mediterrâneo o agente etiológico é a *Leishmania infantum*. Nas

Américas a classificação ainda é um tanto quanto controversa, anteriormente o agente etiológico era classificado como *Leishmania chagasi*, no entanto, as diferenças morfológicas e genéticas são mínimas, o que leva a supor que trata-se da mesma espécie que ocorre na Europa, *Leishmania infantum* Michalick & Genaro (2005).

Estima-se que ocorram 500.000 novos casos de LV e mais de 50.000 mortes por ano no mundo Desjeux (2004), entre as doenças parasitárias, a LV é superada em mortalidade apenas para a malária.

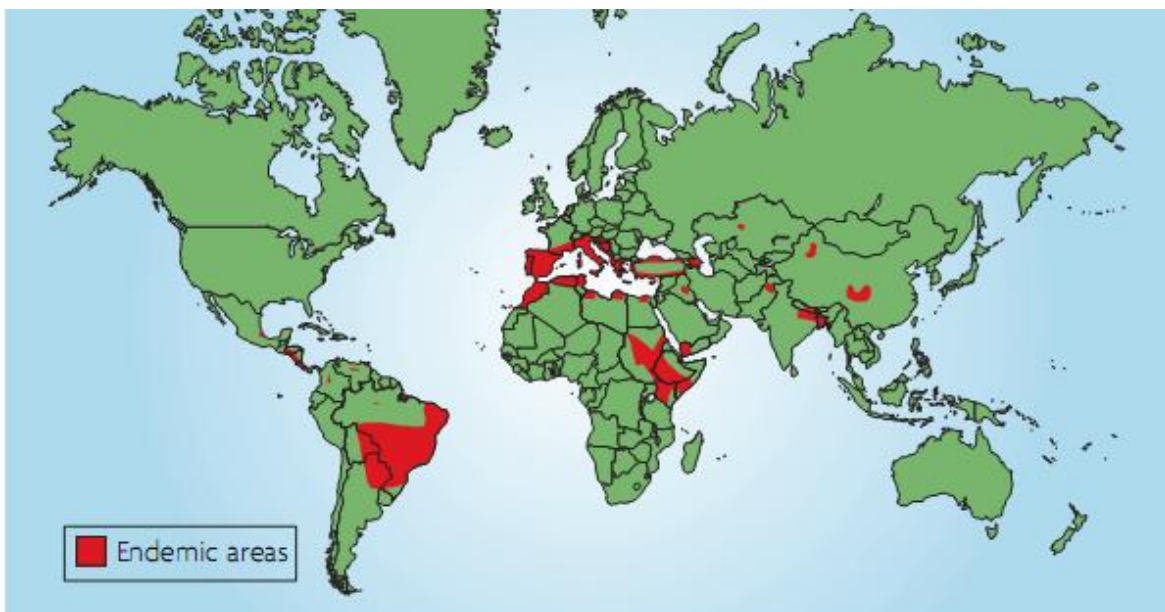


Figura 1: Distribuição da Leishmaniose Visceral no mundo. (Fonte: Chappuis et al., 2007).

1.2. Ciclo de transmissão da Leishmaniose Visceral Americana.

O ciclo biológico da *Leishmania chagasi*, protozoário causador da Leishmaniose Visceral Americana, é do tipo heteroxênico, isto é possui hospedeiro intermediário e definitivo, e possui como transmissor as fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*, denominado também de hospedeiro invertebrado; onde são encontradas as formas promastígotas e paramastígotas, localizadas no lúmen do trato digestório Michalick & Genaro (2005).

As fêmeas de *Lu. longipalpis* (Figura 3) necessitam de alimentação sangüínea (repasto sangüíneo) para o desenvolvimento dos ovos. Ao se alimentarem do sangue de um animal infectado, as fêmeas ingerem juntamente com o sangue, macrófagos e monócitos parasitados pelas formas amastígotas. Estas células parasitadas rompem-se liberando as formas amastígotas que após divisão binária podem transformam-se em duas formas de promastígotas: arredondadas e de flagelo curto que dividem - se intensamente, ou alongadas de flagelo longo cujo processo de divisão é bem menos intenso. Entre 48 a 71 horas após o repasto sangüíneo a matriz peritrófica rompe-se liberando as formas promastígotas livres que migram para o intestino anterior. Na válvula estomadeo, no esôfago, na faringe e no cibário são encontradas formas paramastígotas metacíclicas que são infectantes para o hospedeiro vertebrado. A transmissão do parasito ocorre quando as fêmeas infectadas se alimentam em vertebrados susceptíveis Michalick & Genaro (2005).

No local da picada do inseto vetor, as formas promastigotas metacíclicas injetadas são fagocitadas por células do SMF, onde encontram condições ideais para sua multiplicação, imediatamente transformam-se em formas amastigotas e iniciam sua multiplicação por divisão binária no interior do vacúolo fagocitário dos macrófagos. Quando estão densamente parasitados, os macrófagos rompem-se liberando as formas amastigotas que serão fagocitadas por novos macrófagos dando continuidade a sua multiplicação dentro do hospedeiro.

No homem estas formas amastigotas localizam-se em órgãos linfóides, como a medula óssea, baço e linfonodos. No hospedeiro invertebrado *Lutzomyia longipalpis*, são encontradas as formas paramastígotas, promastígotas e promastígotas metacíclicas ao longo do intestino médio e anterior.

Anteriormente a transmissão da doença era relatada somente em áreas silvestres e rurais; atualmente é relatada em centros urbanos. Acredita-se que um dos fatores que contribui para esta mudança seja a maior adaptação do inseto a estas áreas. No entanto, os criadouros do inseto em área urbana ainda não são conhecidos, o que dificulta o controle das populações de insetos nestes locais.

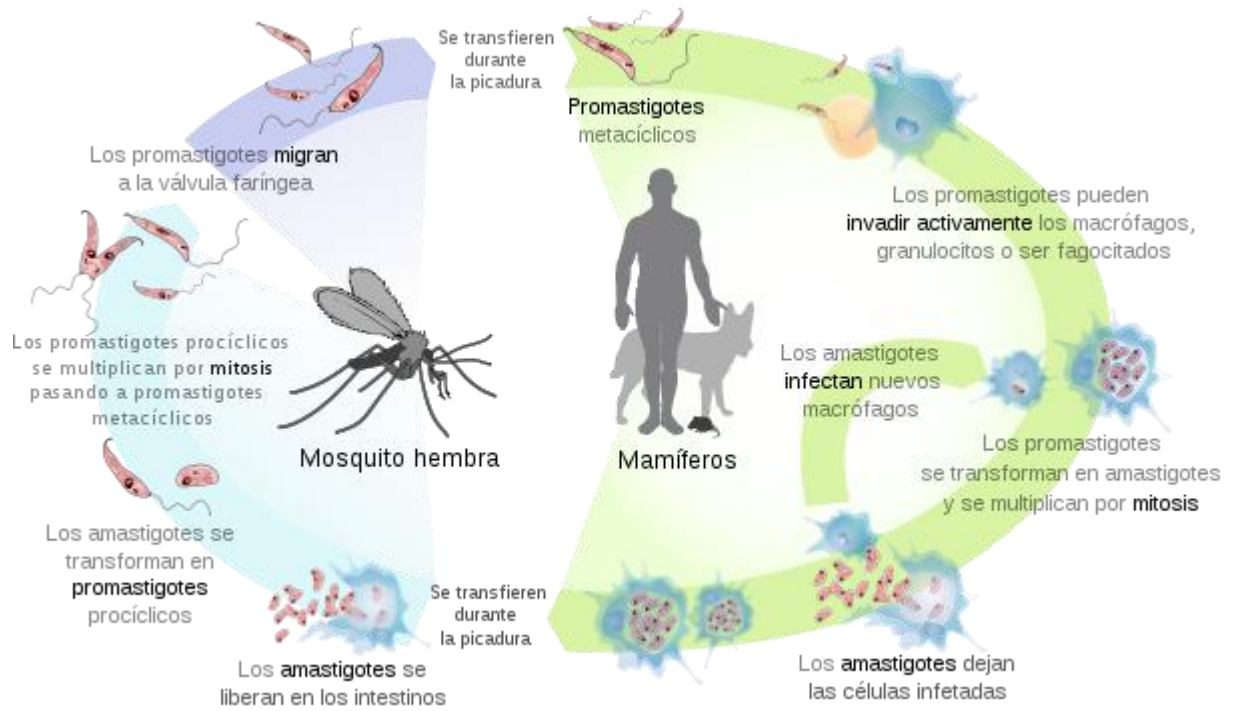


Figura 2: Representando o ciclo biológico da doença. (Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Leishmaniasis_life_cycle_diagram-es.svg)



Figura 3: Fêmea de *Lutzomyia* sp (fonte: www.antropozoonosi.it/vettori/flebotomi.htm).

1.3. *Leishmania chagasi*.

A Leishmaniose Visceral Americana possui como agente etiológico protozoários da Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e espécie *Leishmania chagasi*. A classificação e nomenclatura das leishmanias oferecem algumas dificuldades, devido ao tipo de reprodução que apresentam as taxas de modificações genéticas são baixas, sendo as espécies morfologicamente muito parecidas, entretanto cada espécie causa determinada doença com características clínicas e epidemiológicas tão peculiares que não se pode atribuir sua etiologia a um mesmo agente patogênico Rey (2001).

O gênero *Leishmania* tem como característica apresentar diferentes formas em seu ciclo de vida, Kamhaw (2006) descreveu novas formas de vida do parasito dentro do trato digestório do vetor (Figura 4), no entanto, as formas mais citadas e estudadas são:

- ✓ Formas amastigotas, trata-se da forma aflagelada, possui aspecto ovalado e dimensões de 2 a 6 μm de comprimento por 1,5 a 3 μm de largura. São observadas parasitando células de tecidos de hospedeiros vertebrados, especialmente as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), onde encontram nos vacúolos digestivos (fagossomos) de macrófagos as condições ideais para seu desenvolvimento e reprodução assexuada por divisão binária simples e longitudinal. Assim, o número de parasitos vai aumentando no interior do macrófago de tal forma que se rompe o macrófago liberando as formas amastigotas no meio intercelular, então o sistema

imunológico irá recrutar novos macrófagos para a região e estes irão fagocitar-los e assim dando continuidade ao ciclo de vida dos parasitos no hospedeiro vertebrado Rey (2001).

- ✓ Formas promastigotas, consistem nas formas flageladas, possuem aspecto fusiforme possuindo a extremidade anterior mais arredondada, suas dimensões alcançam entre 14 a 20µm de comprimento por 1,5 a 4µm de largura. São encontradas no tubo digestório de hospedeiros invertebrados, no caso, fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*; onde se reproduzem intensamente por divisão binária e invadem as porções anteriores do estômago e o proventrículo o que pode levar a uma obstrução mecânica e dificultar a ingestão de sangue, levando a um esforço intenso dos músculos encarregados da sucção, estes então relaxam, o que irá provocar a regurgitação do material aspirado incluindo muitos promastigotas. Ocorrendo assim a infecção do hospedeiro vertebrado Rey (2001).

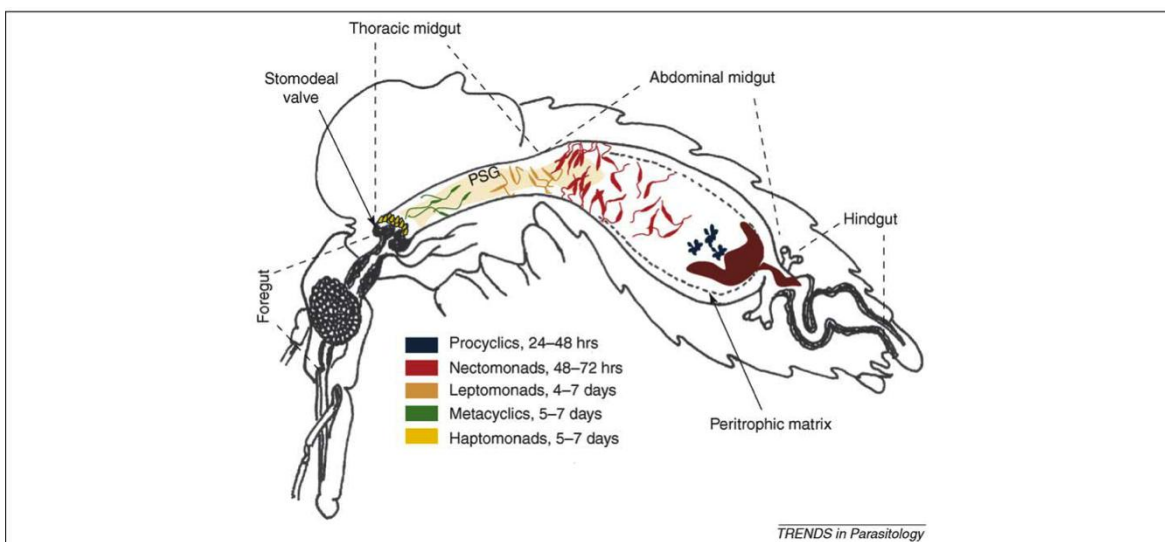


Figura 4: Ilustração das diferentes formas de vida do protozoário *Leishmania chagasi* dentro do trato digestório da fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis*. (Fonte: Kamhaw, 2006)

1.4. Expressão Gênica em *Leishmania* sp.

Os tripanossomatídeos têm atraído a atenção de biólogos moleculares, pois, possuem mecanismos únicos de expressão gênica tais qual transcrição policistrônica, trans-splicing e o envolvimento da polimerase I (Pol I) na síntese de mRNA e na edição de RNA. Em eucariotos a Pol I está envolvida na produção de RNAs ribossomais (rRNA), 18S, 5.8S e 28S. O genoma nuclear de *L. major*, 33.8 megabases (Mb), está distribuído entre 36 pequenos cromossomos que variam em tamanho entre 0.28 a 2.8 Mb Wincker *et al.* (1996). O genoma dos tripanossomatídeos está organizado em grandes agrupamentos gênicos policistrônicos (*Polycistronic Gene Clusters* - PGCs), isto é, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas arranjados seqüencialmente na mesma fita de DNA Martínez-Calvillo *et al.* (2010). Esta organização incomum foi observada pela primeira vez no cromossomo 1 de *L. major*, o primeiro cromossomo de tripanossomatídeo inteiramente seqüenciado, o qual contém 85 genes organizados dentro de dois grandes PGCs, com os primeiros 32 genes agrupados na porção inferior da fita e os outros 53 genes na porção superior Myler *et al.* (1999).

Ao contrário de maioria dos organismos eucariotos, a transcrição em tripanossomatídeos é policistrônica. Muitos cromossomos contêm pelo menos dois PGCs, os quais podem ter transcrição divergente, em direção aos telômeros, ou transcrição convergente, longe dos telômeros. Os genes de uma unidade policistrônica não são codificados em proteínas funcionais; os mRNAs nucleares primários necessitam passar pelos processos de trans-splicing e poliadenilação para tornarem-se maduros (Figura 5) Martínez-Calvillo *et al.* (2010). Trans-splicing é o processo que adiciona um miniexon, 39-nucleotídeo, não codificante capeado chamado *spliced leader* (SL) à extremidade 5' dos mRNAs Parsons *et al.* (1984). Todos os genes que fazem parte de um PGCs são transcritos aos mesmos níveis, como uma consequência dessa forma particular de transcrição, no entanto, a maturação de genes adjacentes pode mostrar concentrações diferentes e/ou expressão estágio-específica. Isto ocorre porque a expressão gênica em tripanossomatídeos é principalmente regulada pós-transcricionalmente Haile & Papadopoulou (2007).

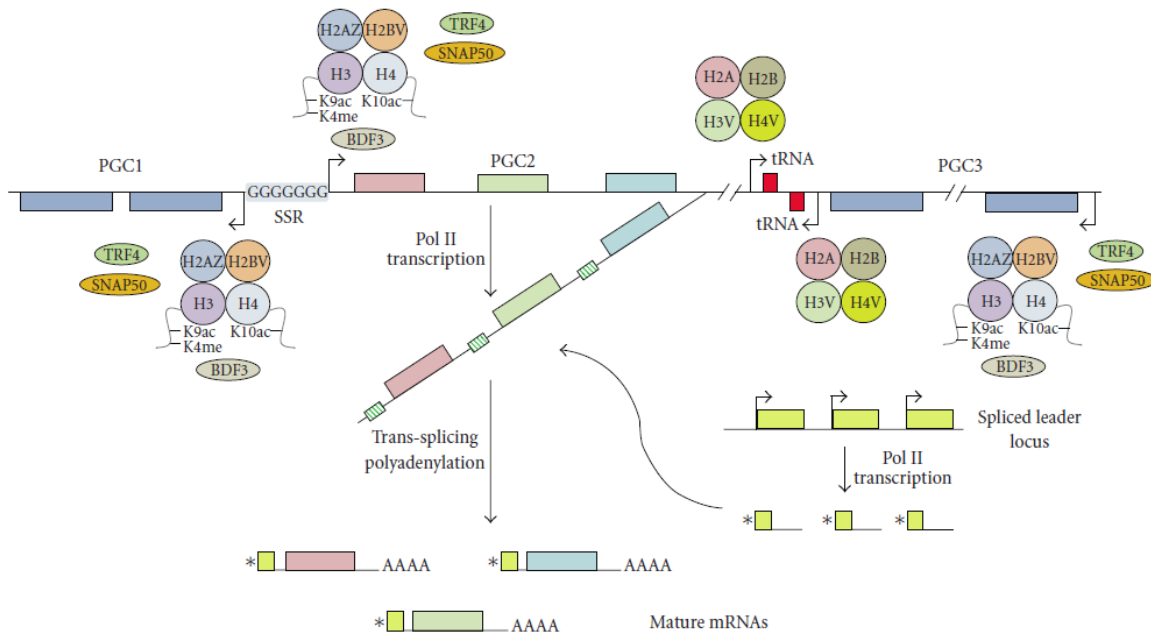


Figura 5: Transcrição e processamento de mRNA em tripanossomatídeos.

(Fonte: Martínez-Calvillo *et al.*, 2010)

1.5. Cinetoplasto

A ordem Kinetoplastida, a qual pertence o protozoário da espécie *Leishmania chagasi*, é caracterizada pela presença de uma organela diferenciada, chamada cinetoplasto. Possui forma de um disco, ligeiramente côncavo, sempre encontrado na base do flagelo, intimamente associado, mas não conectado ao corpo basal Simpson (1967).

Apesar de o cinetoplasto ter sido descrito há anos, somente era possível visualizá-lo em microscópio de luz, onde era possível observar apenas uma mancha sem maiores detalhes. Somente por volta da década de 1970 é que através do uso da microscopia eletrônica pode-se observar a estrutura em rede do material genético dos cinetoplastos. Esse material genético encontra-se entrelaçado em forma de rede e é composto por anéis de DNA, sendo estes divididos em dois tipos: os maxicírculos que encontram-se distribuídos as dezenas e minicírculos que encontram-se em centenas de cópias Liu *et al.* (2005).

Cada célula do protozoário possui somente um cinetoplasto que contém uma única rede de kDNA que está condensada dentro de uma estrutura em forma de disco. Este disco está posicionado em uma região especializada da matriz mitocondrial próximo ao corpo basal flagelar Liu *et al.* (2005).

Os maxicírculos são estrutural e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial da maioria dos outros eucariontes. São responsáveis por codificar RNAs ribossomais mitocondriais como os referentes às regiões 9S e 12S e muitas proteínas da membrana interna mitocondrial, requeridas para a respiração mitocondrial Rohrer *et al.*, (1987).

Até a década de 1990 a função genética dos minicírculos era desconhecida, até que Sturm & Simpson (1990) descreveram em *Leishmania tarentole* que os RNA produzidos a partir dos minicírculos estão envolvidos na edição dos transcritos dos maxicírculos. Durante este processo de expressão genética observa-se a cooperação entre transcritos de maxicírculos e minicírculos. Esta

cooperação é necessária porque os transcritos de maxicírculos requerem edição para a forma funcional de mRNA. Esta edição envolve a precisa inserção ou deleção de resíduos de uracila a sítios internos contidos nos maxicírculos transcritos. A especificidade desta edição é controlada por RNAs, que são denominados de RNAs-guia (gRNAs), provenientes da transcrição dos minicírculos, estes por sua vez servem como moldes para a inserção e deleção de uracilas.

Por causa da extensa edição de uma variedade de mRNAs provindos dos maxicírculos, muitos RNAs guias são necessários. Estes por sua vez são codificados por minicírculos que diferem em suas seqüências, explicando o grande repertório de seqüências de minicírculos na rede de kDNA e por que é necessária a manutenção deste vasto repertório de seqüências de minicírculo, pois a perda de uma dessas seqüências durante a replicação pode resultar na deleção de um RNA guia crucial podendo ser letal ao parasito Liu *et al.* (2005). Cada minicírculo codifica de uma três gRNAs, dependendo da espécie Brewster & Barker (2002).

Os minicírculos constituem cerca de 90% do material genético do cinetoplasto. Na maioria das espécies existe uma heterogeneidade nas seqüências de minicírculos e o seu grau parece refletir o número de gRNAs necessários para a edição dos maxicírculos. Em *Trypanosoma brucei* foram relatadas cerca de 250 diferentes classes, *L. tarentole* foram descritas cerca de 17 classes, já em *Crithidia fasciculada* mais de 90% dos minicírculos possuem a mesma seqüência Shapiro & Englund (1995). Os minicírculos são compostos por duas regiões:

- Região conservada: possui de 100 a 200pb e está presente em todas as classes de minicírculos, no entanto existem polimorfismos entre espécies. Dentro dessa região conservada ocorrem regiões bastante conservadas entre todos os tripanossomatídeos, chamadas de blocos, existem três blocos altamente conservados (Figura 6): CSB1 (GGGCGT), CSB2 (CCCCGTTC) e CSB3 (GGGGTTGGTGTA) Yurchenko *et al.* (1999), este último denominado de região de sequência universal de minicírculo, presente em todas as espécies de kinetoplastida, e onde se dá o início da replicação Simpson (1997). Esta organização dos minicírculos provê dois tipos de estratégias para a amplificação dos mesmos pela PCR: oligonucleotídeos desenhados a partir das regiões CSB1 e CSB2 amplifica a região variável adjacente aos blocos, ou oligonucleotídeos para a região CSB3 que amplifica tanto região conservada quanto variável Yurchenko *et al.* (1999).
- A segunda região é conhecida como variável (Figura 6), pois é nela que se encontra um alto grau de polimorfismo e é essa região que irá determinar a qual classe cada minicírculo pertence Simpson (1997).

Dentro de cada classe de minicírculos as sequências podem variar de 1 a 2% Barker (1987) e em 1992 Maslov *et al.* estimaram que são necessárias cerca de 60 classes de minicírculos para editar os pré-mRNAs transcritos a partir dos criptogenes, genes que geram mRNA que necessitam de edição pós-transcricional, dos maxicírculos; esse número pode ser estimado utilizando

técnicas de como a reassociação cinética, hibridização e digestão por enzima de restrição Brewster & Barker (2002). Essa variação de classes e suas frequências é tão alta que os padrões polimórficos de kDNA obtidos por enzima de restrição podem ser utilizados para caracterizar isolados, denominados de esquizodemas Brewster & Barker (2002), Alonso *et al.*, 2010. Há relatos que quando em cultura por muitos anos, algumas classes de minicírculos são perdidas, pois talvez não sejam requeridas nessas condições ideais de meio Thiemann *et al.* (1994).

Até o presente momento, não são encontrados trabalhos com sequenciamento de minicírculos de *Leishmania infantum chagasi*. Muito pouco é conhecido sobre sua diversidade, como ocorre a distribuição das classes, se podem ou não ter outras funções além de editar mRNAs dos maxicírculos. Este trabalho se propôs a analisar sequências das regiões variáveis de minicírculos para assim descrever sua distribuição entre as formas amastigotas e promastigotas e em amostras de provenientes de diferentes estados, Mato Grosso do Sul e Piauí.

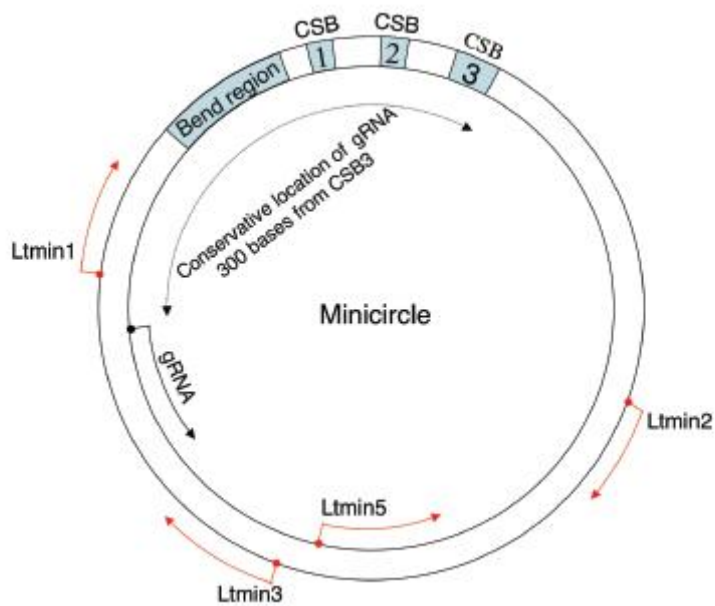


Figura 6: Figura representando a organização do genoma de um minicírculo, com a região sequências conservadas contendo três blocos (CSB1, CSB2 e CSB3) e a região variável (Fonte: Madej *et al.*, 2007).

2. Objetivo do Trabalho

2. OBJETIVO DO TRABALHO

- ✓ Descrever as seqüências dos diferentes mini-círculos encontrados em *Leishmania infantum chagasi* provindo de diferentes hospedeiros, em diferentes regiões do Brasil.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostragem

As amostras são constituídas por culturas de formas promastigotas, isoladas de cães e pacientes infectados pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi* e amostras de formas amastigotas de aspirado de medula óssea de cães contaminados. A coleta foi efetuada por profissionais competentes para tal, para isso contamos com a colaboração da Prof^a Dr^a Maria do Socorro Pires e Cruz da Universidade Federal do Piauí, cidade de Teresina, onde a Leishmaniose Visceral Americana é endêmica e o pesquisador Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, em Campo Grande (culturas de promastigotas). E uma amostra de flebótomo, de Teresina, que foi utilizado para xenodiagnóstico.

3.2. Extração do material genético

A extração do material genético das amostras de amastigotas foi realizada através de um kit illustra blood genomicPrep mini spin (GE Healthcare) conforme as instruções do fabricante. Já o material genético do flebótomo e das formas promastigotas em cultura, foi obtido por um processo simples de preparação do

DNA com a resina Chelex® (Bio-Rad): Alíquotas de 1ml das culturas são transferidas para tubos de 1,5 ml e centrifugadas por 1 min a 10000 rpm, o sobrenadante é então descartado e a fase sólida da amostra ressuspensa em 1ml de uma solução contendo 10% (m/v) da resina diluída em água. Posteriormente a amostra é mantida aquecida por 15 min a 95 °C, e decorrido esse intervalo a amostra é novamente centrifugada por 1 min a 10000 rpm, o sobrenadante contendo o DNA é então cuidadosamente aspirado (de maneira que toda a resina permaneça no tubo de origem), e armazenado em um novo tubo a -20 °C até o momento do uso.

3.3. Amplificação do kDNA pela PCR

A amplificação do material genético efetuou-se por uso dos oligonucleotídeos LIN R4 - forward (5'-GGT TGG TGT AAA ATA GGG-3') e LIN 19 - reverse (5'-GAA CGC CCC TAC CCG-3') que foram desenhados a partir de sequências dos blocos conservados CB1 e CB3 do minicírculo de cinetoplastos de *Leishmania* sp (Aransay *et al*, 2000). Estes oligonucleotídeos geram produtos de aproximadamente 720p.b (Figura 7). que correspondem a toda região variável de todos minicírculos. Para a reação foi utilizado: 2,5 µl de tampão 10x (Plantinum, Invitrogen Life Technologies), 1,0 µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl dNTPs (0,1 mM) (PCR nucleotide mix Invitrogen Life Technologies); 1,0 de cada oligonucleotideo (10 pmol/µl); 0,3 µl Taq Plantinum, Invitrogen Life Technologies (5 U/ µl) e 5,0 µl

da solução contendo DNA. Em seguida a reação foi levada ao termociclador (Bio-Rad) por 33 ciclos: para efetuar a desnaturação das fitas a reação: 95°C por 30s; o anelamento dos oligonucleotídeos ocorreu a 58°C por 30 s, o alongamento da fita foi a 72°C por 1 min e para finalizar o alongamento a 72°C por 7 minutos. Em seguida os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1% diluído em tampão TAE 1% e visualizados em luz U.V. após coloração com 2 µl de gel red (Biotium) para 40ml de gel.

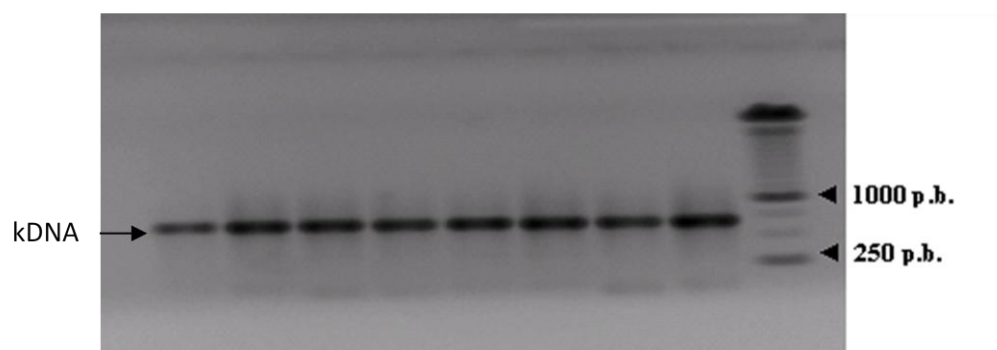
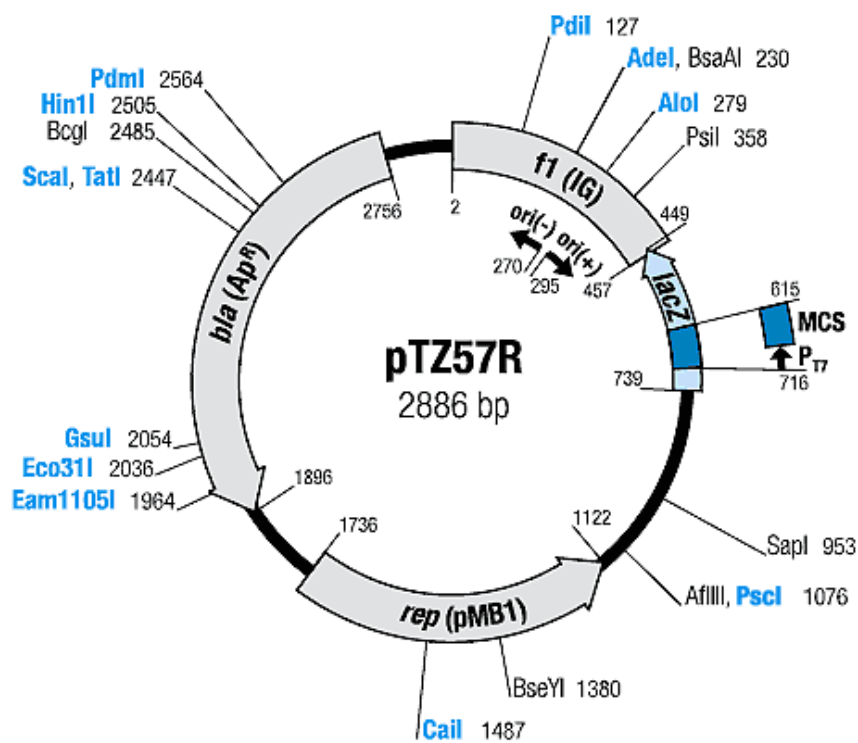


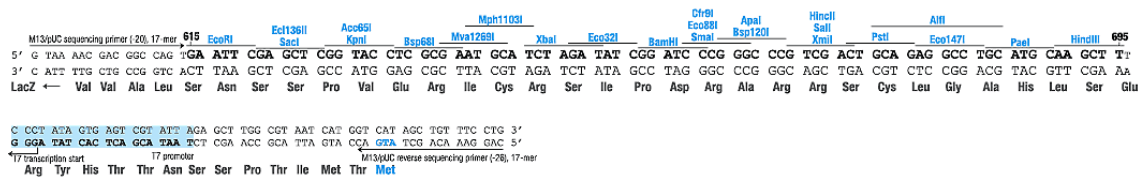
Figura 7: kDNA de minicírculos de *Leishmania chagasi* amplificados através do método de PCR, utilizando oligonucleotídeos LIN R4 e LIN 19 (Aransay et. al, 2000).

3.4. Clonagem

O produto da PCR foi purificado por filtração utilizando o kit Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, Millipore, e em seguida o fragmento de DNA foi inserido no vetor pTZ57R/T (Figuras 8 e 9), conforme o protocolo do Kit de clonagem InsTAclone PCR cloning, (Fermentas Life Science). Após a ligação do fragmento ao vetor, foi realizada a transformação por choque térmico, em células competentes de *Escherichia coli*, cepa DH5 α , armazenadas a -70°C. Estas são descongeladas em gelo, sem agitação em microtubos, de 1,5 ml, estéreis contendo 50 μ l de células competentes e 10 μ l da solução de DNA. Esta solução permanece 25 minutos em gelo, depois levada à estufa a 37°C por 5 minutos. Em seguida é colocada novamente no gelo durante 2 minutos. Para o crescimento das células, adicionou-se 500 μ l meio de cultura líquido LB, sem ampicilina, em seguida levou-se à estufa a temperatura de 37°C por 1 hora. Foi então plaqueada 50 μ l da cultura, utilizando uma alça de vidro, em meio LB-ágar com ampicilina [100 μ g/ml]. Para que as culturas de bactérias crescessem as placas permaneceram a 37°C, aproximadamente por 16h. Para a minipreparação dos plasmídeos, os clones foram repicados para um tubo contendo 3ml de meio LB líquido com ampicilina [100 μ g/ml] e levados à estufa por aproximadamente 16h sob temperatura de 37°C. Esse meio foi transferido para um tubo de 1,5 ml e centrifugado à aproximadamente 8000rpm por 3 minutos e em seguida os plasmídeos foram preparados por meio do **QIAprep Spin miniprep kit**, conforme o protocolo do fabricante para que seja realizada a reação de seqüenciamento.

Apesar de termos utilizado ampicilina para selecionar os clones que com inserto, algumas colônias resistentes à ampicilina não continham o fragmento, então, para verificar se todas as soluções finais das minipreparações continham o inserto de kDNA, foi feita a reação de PCR com os oligonucleotídeos M13 - Forward (5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3') e M13 - Reverse (5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3') que gerou um produto de aproximadamente 1000p.b. que continha o kDNA (~720p.b.) mais a região do plasmídeo onde foram desenhados os oligonucleotídeos M13F e M13R.





Figuras 8 e 9: Imagem ilustrativa do vetor pTZ57R

(fonte: <http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mapptz57r.htm>).

3.5. Sequenciamento dos minicírculos

Os produtos de PCR positivos para a presença do inserto desejado foram purificados com o kit de enzimas EXOSAP-IT (USB); 2 µl desta solução de PCR purificada teve sua concentração de DNA estimada através do espectrofotômetro NanoDropR (ND-1000). Essa solução então foi diluída a aproximadamente 30ng/µl e levadas ao o Laboratório de Diagnóstico Molecular e Sequenciamento / UNESP – Botucatu para o seqüenciamento. Para o sequenciamento utilizado o par de oligonucleotídeos M13 - Forward (5' - GTA AAA CGA CGG CCA G - 3') e M13 – Reverse(5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3') no sequenciador capilar 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) que utiliza o método “Sanger” no qual os dideoxinucleotídeos (não possuem o radical hidroxila na extremidade 3') estão marcados por fluorescência e são identificados pela incidência do *laser* sobre eles quer irá excitar a fluorescência emitindo diferentes sinais para os diferentes nucleotídeos.

3.6. Análise das seqüências

As sequências obtidas submetidas ao GENBANK (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparação com as sequências depositadas no mesmo. Em seguida foram alinhadas no programa computacional Clustal X2 (Larkin *et al.*, 2007). Então, foi confeccionada a árvore filogenética utilizando o *software* MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) e algoritmo escolhido foi UPGMA. A partir da árvore, as sequências foram analisadas ramo por ramo, alinhando separadamente todas que estão contidas dentro do mesmo ramo, para que pudéssemos observar com mais detalhes os polimorfismos. Considerando que as sequências podem variar entre 1 a 2% dentro de uma mesma classe de minicírculo, as sequências foram distribuídas dentro de diferentes classes. Para analisar de forma global as classes e suas distribuições entre as diferentes amostras, realizamos a ANÁLISE de COMPONENTE PRINCIPAL, através do programa computacional XLSTAT 2012, que por combinações matemáticas agrupa os dados.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O par de oligonucleotídeos LINR4 e LIN19 Aransay *et al.* (2000) tem sido utilizado em nosso laboratório desde 2004, por ser bastante sensível para detecção da presença de kDNA do parasita em amostras de diferentes tecidos de hospedeiros infectados por *Leishmania* sp, pois cada protozoário possui milhares de cópias de minicírculos Noyes *et al.* (1998). No entanto, por serem desenhados nas regiões universalmente conservadas para a grande maioria dos tripanossomatídeos, somente pelo produto da PCR não é possível identificar as diferentes espécies de *Leishmania* sp. Para identificação das diferentes espécies é necessária a análise por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), onde é possível diferenciar amostras de populações genéticas que apresentam pouco polimorfismo Laurent, *et al.* (2007); Nasereddin *et al.* (2009); Alonso *et al.* (2010). Alonso *et al.* (2010) utilizando a técnica de RFLP-PCR dos minicírculos de *Leishmania infantum chagasi* demonstrou padrões diferentes se esquizodemas para formas amastigotas de promastigota. Baseando-se neste polimorfismo dos minicírculos, foram selecionadas sete diferentes amostras para a PCR, sendo: Dog1 (cultura de promastigota de amostra de cão de Teresina), Dog 2 (aspirado de medula de cão de Teresina), Dog 3 (aspirado de medula de cão de Teresina), Humano (cultura de promastigota de amostra extraída de paciente infectado, Teresina), Flebótomo (utilizado para xenodiagnóstico, Teresina), MS2 (cultura de promastigota de amostra de cão de Campo Grande) e MS3 cultura de

promastigota de amostra de cão de Campo Grande). Para todas as amostras sete amostras a PCR foi positiva.

Todos os produtos da PCR foram clonados para selecionar os diferentes tipos de minicírculos e posteriormente sequenciados, no entanto para a amostra de flebotomíneo obtivemos somente dois clones com inserto, que foram sequenciados. No total foram sequenciados 182 clones de kDNA sendo 75 de formas e amastigotas e 107 de formas promastigotas de *Leishmania infantum chagasi*. Para cada amostra tentamos isolar o máximo de clones possível, portanto o número de sequências por amostra é bastante diversificado (Tabela 1).

Tabela 1: Ilustra o número de clones obtidos, o número de classes encontradas e a diversidade das classes para cada amostra.

Amostra	n° de Clones	n° de Classes	Diversidade
Dog 1	38	24	0,63
Dog 2	48	21	0,44
Dog 3	27	21	0,78
Human	17	14	0,82
MS2	31	11	0,35
MS3	19	9	0,47

Ao alinharmos todas as sequências, conseguimos alinhar apenas regiões onde os oligonucleotídeos foram desenhados, que são referentes às regiões conservadas do minicírculo, não sendo possível fazer uma análise mais minuciosa

dos polimorfismos. Ao contrário do demonstrou Brewster & Barker (2002), que observou sequências bastante conservadas entre diferentes espécies: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*.

Para visualizarmos a distribuição das sequências entre as diferentes amostras e formas de vida foi confeccionada uma árvore filogenética (Figura 10), onde podemos observar que dentro de alguns ramos agrupam-se sequências de uma mesma localidade, ou sequências de uma mesma forma de vida. Então, analisamos as sequências agrupadas em um mesmo ramo da árvore filogenética (Figura 10), alinhando-as separadamente para podermos observar os polimorfismos. Denominamos de classe cada um desses agrupamentos de sequências, que vão da 1 a 53. Para *L. tarentole* são previstas, hipoteticamente, que são necessárias cerca de 60 classes de minicírculos para editar pós-transcricionalmente os mRNAs dos criptogenes dos maxicírculos Maslov *et al.* (1992).

Todas as sequências estão depositadas no GENBANK, na tabela 3 encontram-se os respectivos números de acesso, assim como o hospedeiro, local de coleta da amostra. Como podemos observar na Tabela 1, as amostras que apresentaram maior diversidade de classes foram as amostras de Teresina/PI, de cultura de forma promastigota proveniente de humano (Human) e aspirado de medula de cão (Dog 3). E a menor diversidade foi observada em amostras de Campo Grande/MS.



Figura 10: Árvore filogenética das sequências obtidas, gerada pelo programa

MEGA 4.

Para discriminar de forma mais clara os dados sobre a distribuição das classes, foi feita a Análise de Componente Principal, uma análise matemática que por combinações numéricas agrupa os dados por suas semelhanças. Quando comparamos a distribuição das classes entre as diferentes amostras podemos observar que as sequências de cultura de formas promastigotas encontram-se próximas, indicando que há um padrão de distribuição de classes semelhante. Já as amostras de aspirado de medula, formas amastigotas, encontram-se em pontos isolados, indicando que há um padrão diversificado de distribuição das classes (Figura 11). Acreditamos que essa maior diversidade entre amostras de formas amastigotas e um padrão mais homogêneo entre formas promastigotas, se deve ao fato dessas últimas estarem em cultura; como descrito por Thiemann *et al.* (1994) em condições ideais algumas classes de minicírculos são perdidas, o que conseqüentemente diminui a diversidade. Ainda por Análise de Componente Principal, só que agora focando somente na distribuição das classes, podemos observar que as classes mais polimórficas são as que se encontram nas periferias do gráfico (Figura 12), classes: 1, 5, 12, 15, 34, 41, 47 e 53, estas classes apresentam haplótipos que diferenciam amostras de formas promastigotas de amastigotas, dado representado na Tabela 2. Entre essas classes mais discriminatórias podemos observar quatro classes (15, 34, 47 e 53) que possuem uma contribuição maior para a diversidade das classes (Figura 12), pois apresentam haplótipos exclusivos para promastigotas e amastigotas (Tabela 2).

Quanto à distribuição das classes entre as amostras, podemos observar nos gráficos (Figuras 13 a 18) que a frequência encontrada é bastante variável, e que

as amostras do Piauí apresentaram maior diversidade de classes que as amostras de Mato Grosso do Sul. As quatro classes destacadas anteriormente são as mais frequentes entre todas as amostras, no entanto, o número de sequências encontradas é bastante diversificado.

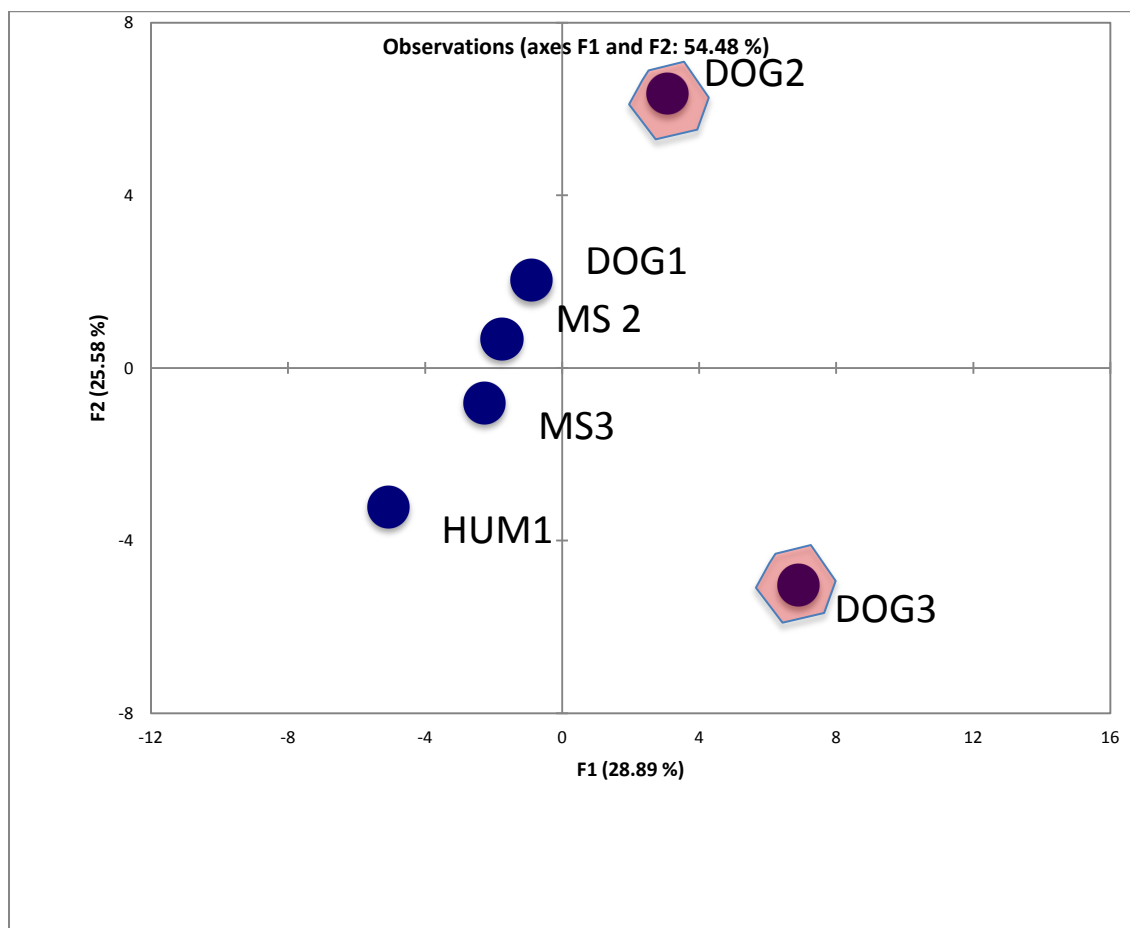


Figura 11: Gráfico comparando a distribuição das Classes de acordo com as amostras.

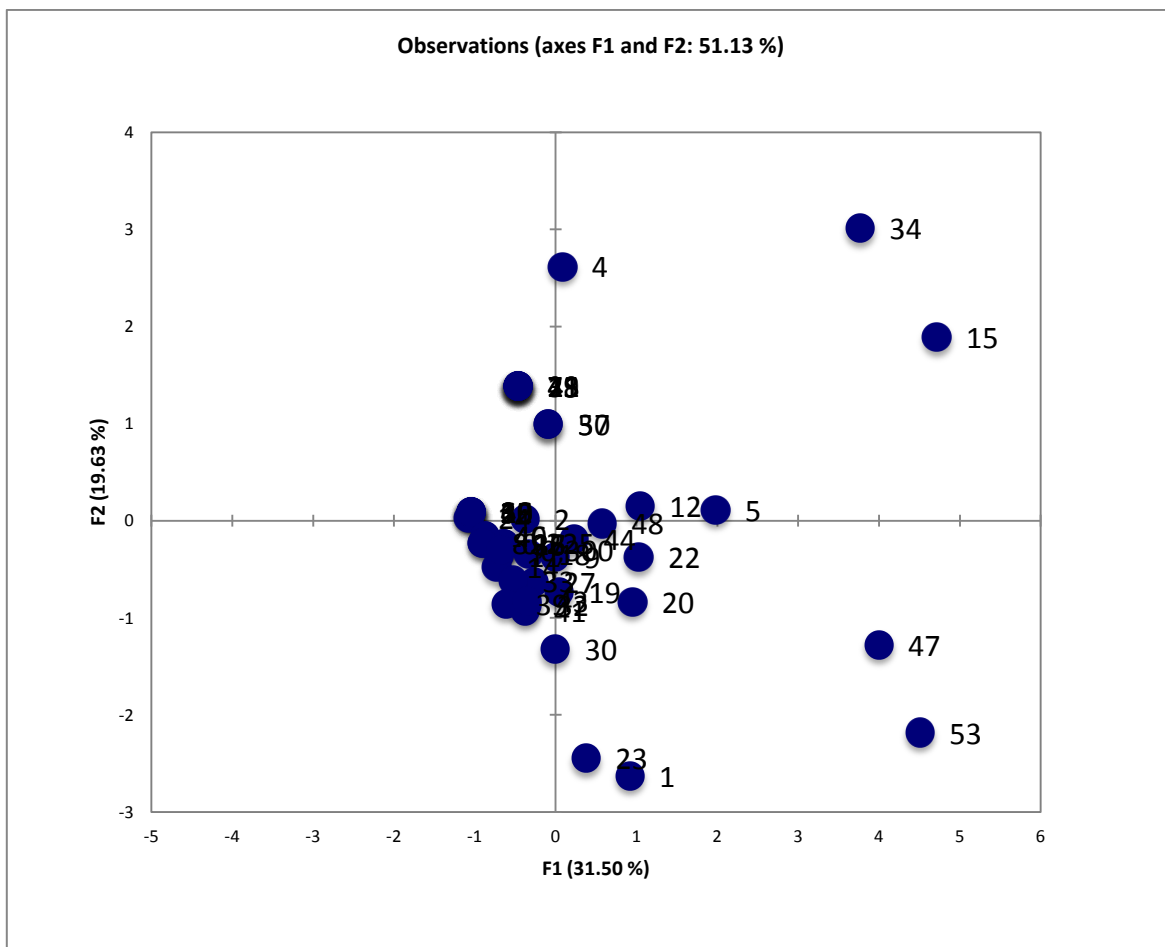


Figura 12: Gráfico representando a diversidade das classes.

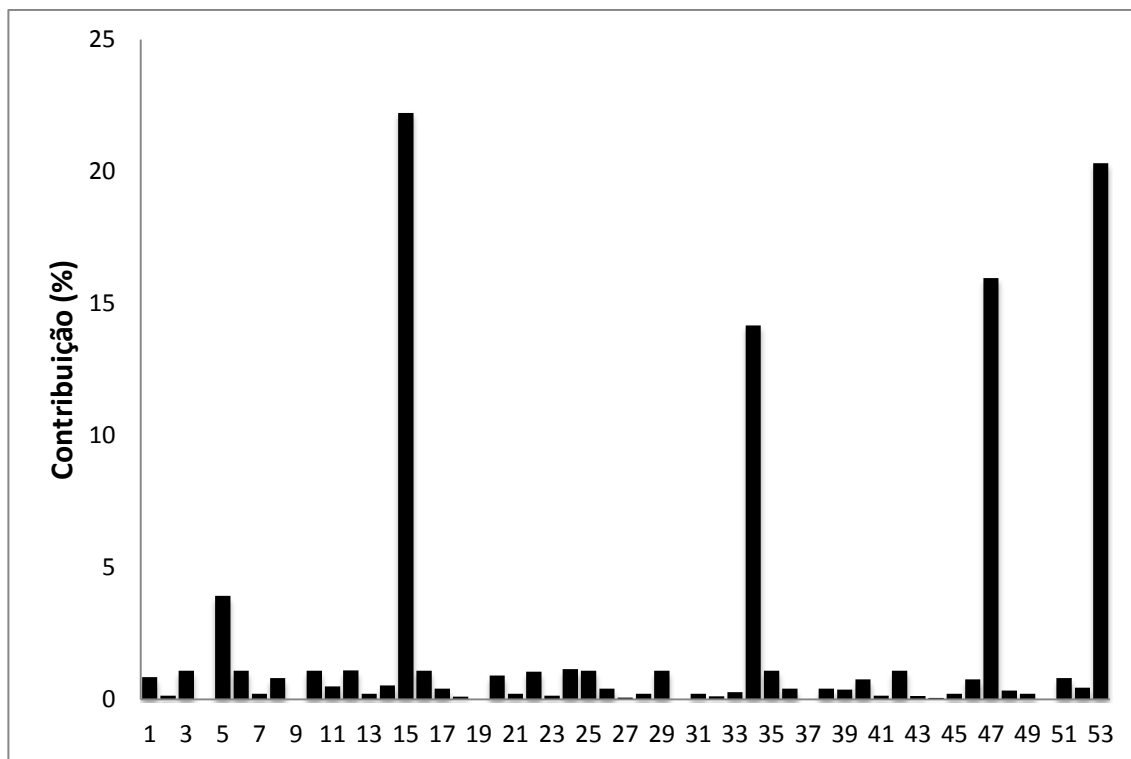


Figura 13: Gráfico representando a contribuição de cada classe para a diversidade dos minicírculos

Tabela 2: Representa o número de haplótipos encontrados em cada classe de minicírculo entre as formas de vida promastigota e amastigota.

Classe	n° de Haplótipos	Promastigota	Amastigota
1	10	3	7
2	1	1	0
3	1	0	1
4	2	2	0
5	7	6	1
6	1	0	1
7	1	1	0
8	2	0	2
9	2	2	0
10	1	1	0

11	3	1	2
12	5	5	0
13	1	1	0
14	2	0	2
15	17	12	5
16	1	0	1
17	1	0	1
18	3	2	1
19	6	3	3
20	6	2	4
21	2	2	0
22	3	3	0
23	8	3	5
24	2	0	2
25	1	0	1
26	1	1	0
27	2	2	0
28	1	1	0
29	1	0	1
30	5	2	3
31	1	1	0
32	2	0	2
33	4	3	1
34	12	11	1
35	1	0	1
36	1	0	1
37	2	2	0
38	1	1	0
39	4	1	3
40	1	0	1
41	4	0	4
42	1	1	0
43	5	1	4
44	3	3	0
45	2	1	1
46	2	1	1
47	11	11	0
48	4	2	2
49	2	2	0
50	2	2	0
51	2	1	1
52	2	0	2
53	14	12	2

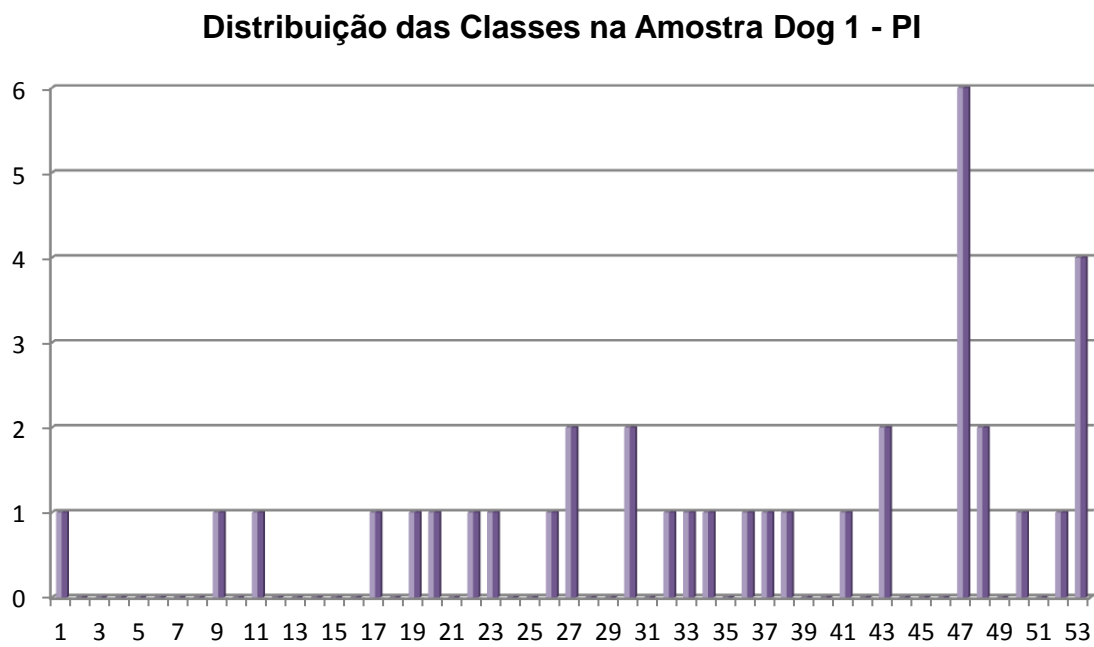


Figura 13: Gráfico representando a distribuição das classes na amostra de cultura da forma promastigota, em cão da cidade de Teresina/PI.

Distribuição das Classes na Amostra Dog 2 - PI

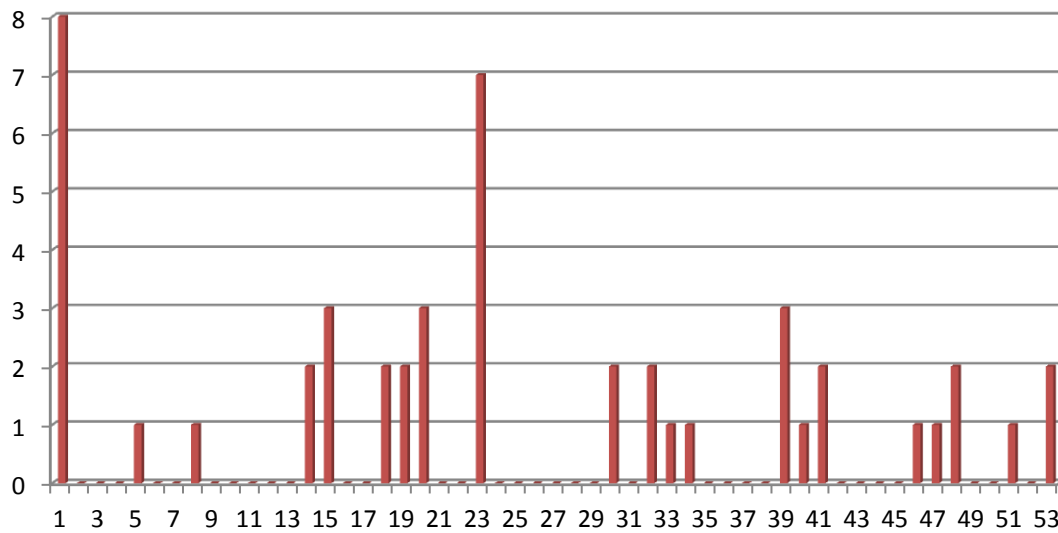


Figura 14: Gráfico representando a distribuição das classes na amostra de aspirado de medula (forma amastigota), em cão da cidade de Teresina/PI.

Distribuição das Classes na Amostra Dog 3 - PI

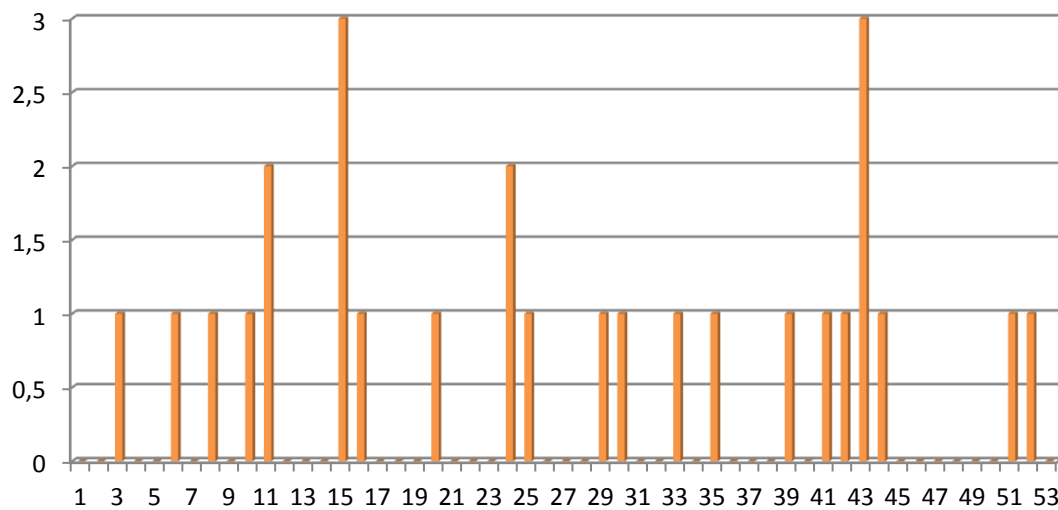


Figura 14: Gráfico representando a distribuição das classes na amostra de aspirado de medula (forma amastigota), em cão da cidade de Teresina/PI.

Distribuição das Classes na Amostra Humano - PI

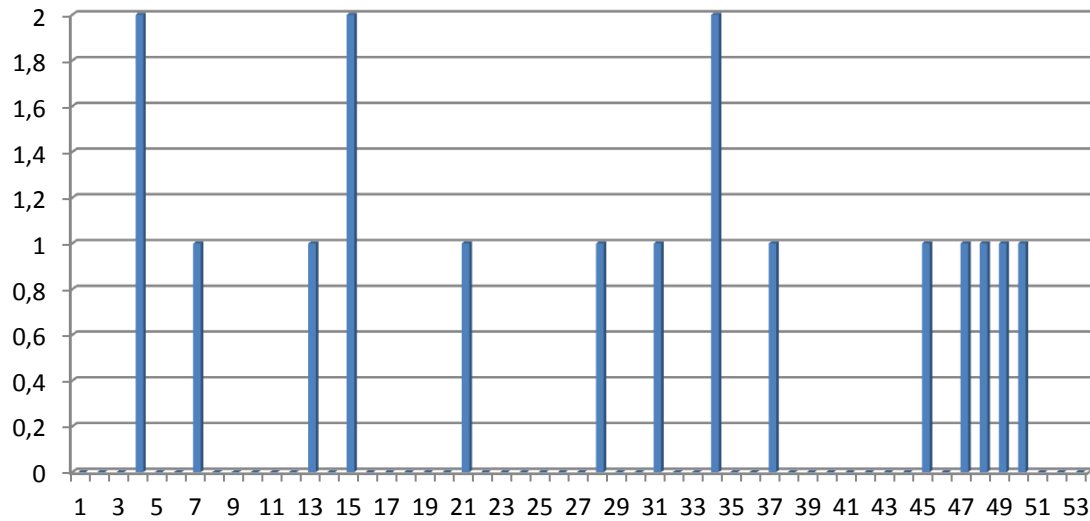


Figura 16: Gráfico representando a distribuição das classes na amostra cultura da forma promastigota, em humano, da cidade de Teresina/PI.

Distribuição das Classes na Amostra MS2 - MS

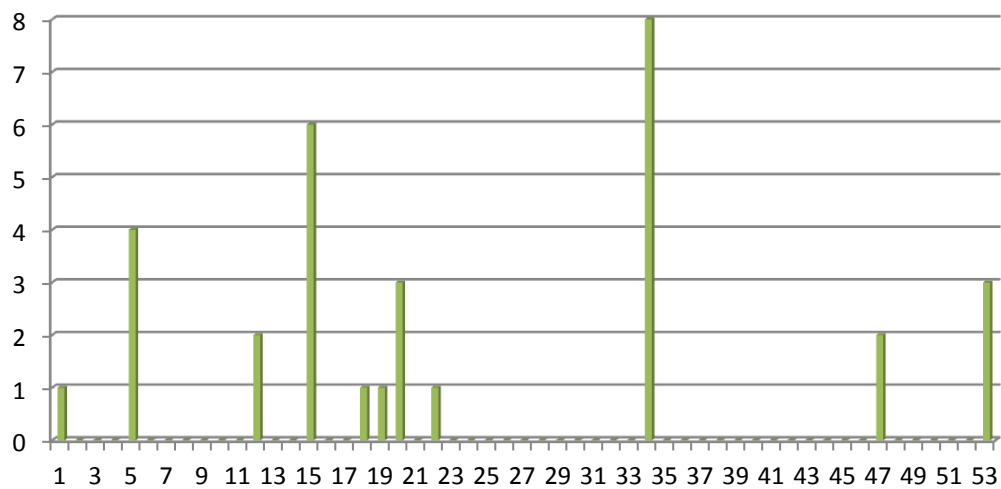


Figura 17: Gráfico representando a distribuição das classes na amostra de cultura da forma promastigota, em cão da cidade de Campo Grande/MS.

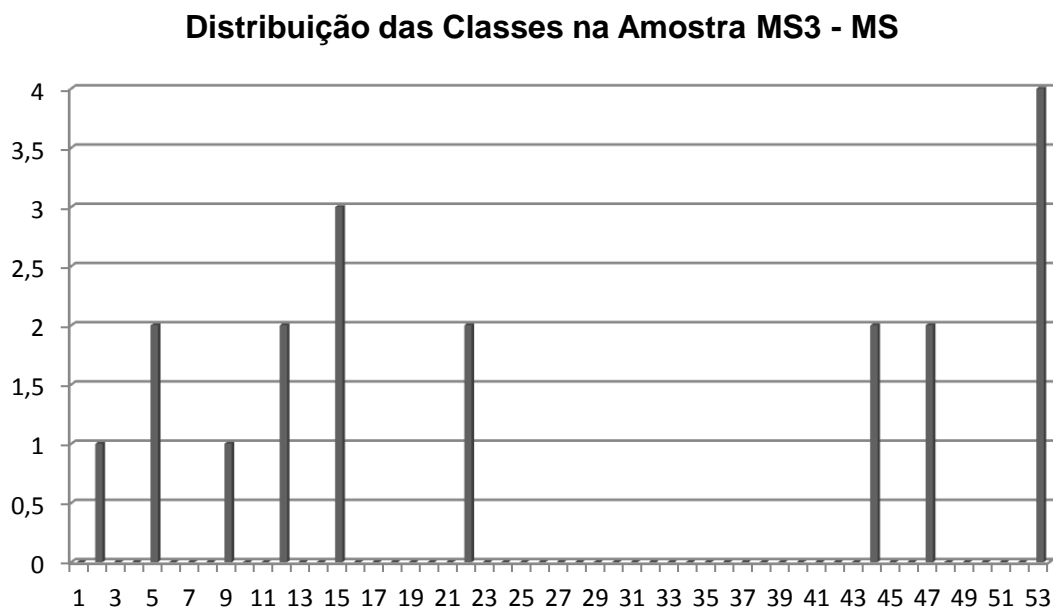


Figura 18: Gráfico representando a distribuição das classes na amostra de cultura da forma promastigota, em cão da cidade de Campo Grande/MS.

Ao serem analisadas mais detalhadamente, classe por classe, como podemos observar nas tabelas que descrevem as classes e seus polimorfismos (anexos), podemos observar alguns SNPs que nos chama a atenção, como na Classe 5 (Anexos: Tabela 6), nas posições 117, 436 e 603 ocorrem SNPs exclusivamente da amostra Dog2 Clone 48, que trata-se da única sequência de amastigota entre as outras seis da mesma classe, e ainda a única amostra proveniente de Campo Grande. Na classe 15 (Anexos: Tabela 16) também

podemos observar SNPs que ocorrem exclusivamente em amostras de MS, sítios 23,28, 34, 290, 355, 421 e 693. Classe 19 (Anexos: Tabela 20) ocorrem SNPs que discriminam amostras de MS e PI, amastigotas de promastigotas, posições 35, 261, 275, 556 e 706. Já na Classe 23 (Anexos: Tabela 24) apresentam SNPs que diferenciam formas amastigotas de promastigotas, sítios 585, 661, 679 e 707. A classe 33 (Anexos: Tabela 34) a única sequência de amastigota incluída nesta classe, apresenta dois SNPs nas posições 141 e 259; já a única sequência obtida a partir de uma amostra de flebotomíneo apresentou um SNP na posição 427. Na Classe 39 (Anexos: Tabela 40) somente a sequência proveniente de promastigota tem um SNP no sítio 100 da mesma forma que na Classe 43 (Anexos: Tabela 44), também ocorrem SNPs, posições 298 e 639, somente na única sequência de amostra promastigota. A maior parte dos SNPs observados na Classe 44 (Anexos: Tabela 45), foram encontrados na sequência da amostra oriunda de Teresina.

Apesar de o número de sequências por classe ser pequeno e à partir desses dados não ser possível afirmar que esses SNPs são capazes de discriminar populações ou formas evolutivas baseando-se nos polimorfismos encontrados, trata-se um indício de que seja possível diferenciar formas promastigotas de amastigotas por SNPs presentes dentro de algumas classes. Será importante analisar a frequência dos mesmos, pois, muitos trabalhos demonstram por enzima de restrição que há diferentes padrões para diferentes amostras Laurent, *et al.*, (2007); Nasereddin *et al.*, (2009); Alonso *et al.*, (2010). Neste mesmo laboratório foi comprovado por Alonso *et al.* (2010) que é possível diferenciar formas amastigotas de promastigotas por RFLP.

Quando comparamos as sequências obtidas neste trabalho com as depositadas no GENBANK encontramos, como esperado, similaridade com sequências de minicírculos de *Leishmania* SP. Mas, devido ao alto polimorfismo, obtivemos baixa cobertura, que é a relativa às regiões onde os oligonucleotídeos foram desenhados. Desde que se iniciaram experimentos com *Leishmania infantum chagasi* no laboratório, cerca de dez anos atrás, um dado intrigante é sempre observado quando comparadas as sequências obtidas com as depositadas no GENBANK, encontramos similaridade com sequências referentes ao DNA nuclear de *Leishmania donovani*. Até aproximadamente fevereiro de 2011, as sequências deste trabalho apresentavam similaridade com sequências dos cromossomos 7, 27 e 29 de *Leishmania infantum*, sendo que algumas apresentavam alta cobertura, chegando até 98%. No entanto, houve uma correção destas sequências e desde então os resultados foram alterados, agora a identidade é com o cromossomo 27 e algumas com o cromossomo 13 (tabela 1, anexos) de *Leishmania donovani*. Mesmo com essa alteração nos resultados, ainda acreditamos ser um dado importante, pois apesar de *L. donovani* ser uma espécie geográfica e filogeneticamente mais distante de *L. infantum chagasi*, o genoma das espécies é altamente conservados, Lynn & McMaster (2008) compararam o genoma de *L. major*, *L. infantum* e *L. brazilienses* e encontraram menos de 1% de genes espécie-específicos, o que nos possibilita a comparação dos dados.

A maior parte das sequências apresentou similaridade com sequências do cromossomo 27, o que nos leva a questionar se além do papel na regulação pós

transcricional dos produtos dos maxicírculos, os RNAs-guia dos minicírculos teriam também importância na regulação pós- transcricional de produtos nucleares também; pois é conhecido que a regulação pós – transcricional nuclear é de extrema importância para esse parasita Martínez-Calvillo, (2010). Em 1992 **Maslov et al.** também cogitou brevemente, essa possibilidade, através das suas observações, mas até o momento não foram feitos ensaios para confirmá-la.

Embora apresentem diferenças fenotípicas e comportamentais, como: vetor, órgãos alvo e os diferentes sintomas que essas espécies causam em seus hospedeiros, quando comparados os genomas não foi observado um alto grau de polimorfismos, revelando um material genético bastante conservado Peacock *et al.* (2007). Estaria, portanto a resposta para essa diversidade entre as espécies, nos minicírculos?

Lee *et al.* (1993) observou *in vitro* , em um teste de resistência a drogas, que a frequência das classes de minicírculos são alteradas quando os protozoários da espécie *Leishmania mexicana amazonensis* são expostos a drogas. Para *L. infantum chagasi* não há nenhum experimento semelhante, seria importante verificar se há esta correlação drogas e frequência das classes. Também é interessante testar amostras de cultura ao longo do tempo para observarmos quais classes são perdidas e recuperadas quando o protozoário é injetado nos camundongos. Outro dado muito importante é buscar dentro das seqüências de minicírculos as regiões codificadoras das diferentes seqüências de gRNAs para mapear os alvos da regulação de cada classe.

Após serem separadas em classes e depositadas no GENBANK (Tabela 3), será mais rápida a identificação da classe a qual pertence o minicírculo analisado. Será muito interessante classificar e descrever todas as classes que ocorrem nos diferentes gêneros de *Leishmania* sp. para uma melhor compreensão deste material genético tão peculiar e comparação da frequência das diferentes classes e dos SNPs presentes nas mesmas. Ainda são poucos os estudos sobre minicírculos, a grande parte dos artigos sobre o assunto tem como alvo *Trypanosoma* sp. e *L. tarentole*, para *Leishmania infantum chagasi* até o momento não existem artigos científicos descrevendo classes e suas frequências.

A descrição de diferentes classes de minicírculos gerou dados inéditos para *Leishmania infantum chagasi*, a partir dessa descrição esperamos que outras pesquisas mais específicas possam ser desenvolvidas, como a comprovação ou não de que os minicírculos de kDNA além de regular pós-transcricionalmente os produtos dos maxicírculos também regulem pós-transcricionalmente o mRNAs nucleares.

Esses resultados ainda são preliminares, mas revelam dados interessantes que serão futuramente testados para a conclusão deste trabalho. Apesar de ser um número amostral baixo, acreditamos que esses dados reflitam o que ocorre no ambiente, pois os clones provavelmente abrangeram as classes mais abundantes nas diferentes amostras. Portanto, os próximos passos serão, obter mais seqüências de kDNA de minicírculos, utilizando o seqüenciador Illumina, que irá eliminar a necessidade de clonagem e ampliará o número de seqüências, proporcionando assim um resultado mais preciso das classes que ocorrem de

acordo com as diferentes pressões ambientais, será possível avaliar a frequência de cada uma delas nas diferentes amostras e observar a frequência dos SNPs dentro das classes para avaliar se há correlação com as diferentes formas de vida, ou se é possível utilizar alguns como marcadores genéticos para estudos populacionais.

Tabela 3: Resumo dos dados referentes às sequências.

GenBank	Sample Code	Host	Clone	Isolation Source	Evolutionary form	Class
JX156446	Dog2	Dog	20	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156447	Dog2	Dog	35	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156448	Dog2	Dog	37	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156449	Dog2	Dog	15	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156450	Dog2	Dog	26	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156451	Dog2	Dog	34	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156452	Dog2	Dog	44	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156453	Dog2	Dog	29	Teresina_PI	Amastigote	1
JX156454	Dog1	Dog	28	Teresina_PI	Promastigote	1
JX156455	MS2Dog	Dog	16	Campo Grande_MS	Promastigote	1
JX156456	MS3Dog	Dog	20	Campo Grande_MS	Promastigote	2
JX156457	Dog3	Dog	42	Teresina_PI	Amastigote	3
JX156458	Human	Human	12	Teresina_PI	Promastigote	4
JX156459	Human	Human	18	Teresina_PI	Promastigote	4
JX156460	Dog2	Dog	48	Teresina_PI	Amastigote	5
JX156461	MS2Dog	Dog	43	Campo Grande_MS	Promastigote	5
JX156462	MS2Dog	Dog	50	Campo Grande_MS	Promastigote	5
JX156463	MS2Dog	Dog	53	Campo Grande_MS	Promastigote	5
JX156464	MS2Dog	Dog	71	Campo Grande_MS	Promastigote	5
JX156465	MS3Dog	Dog	8	Campo Grande_MS	Promastigote	5
JX156466	MS3Dog	Dog	30	Campo Grande_MS	Promastigote	5
JX156467	Dog3	Dog	14	Teresina_PI	Amastigote	6
JX156468	Human	Human	8	Teresina_PI	Promastigote	7
JX156469	Dog3	Dog	46	Teresina_PI	Amastigote	8
JX156470	Dog2	Dog	13	Teresina_PI	Amastigote	8
JX156471	Dog1	Dog	46	Teresina_PI	Promastigote	9
JX156472	MS3Dog	Dog	27	Campo Grande_MS	Promastigote	9
JX156473	Dog3	Dog	11	Teresina_PI	Amastigote	10
JX156474	Dog1	Dog	11	Teresina_PI	Promastigote	11

JX156475	Dog3	Dog	16	Teresina_PI	Amastigote	11
JX156476	Dog3	Dog	44	Teresina_PI	Amastigote	11
JX156477	Lu longipalpis	Lu longipalpis	3	Teresina_PI	Promastigote	12
JX156478	MS2Dog	Dog	67	Campo Grande_MS	Promastigote	12
JX156479	MS2Dog	Dog	72	Campo Grande_MS	Promastigote	12
JX156480	MS3Dog	Dog	5	Campo Grande_MS	Promastigote	12
JX156481	MS3Dog	Dog	10	Campo Grande_MS	Promastigote	12
JX156482	Human	Human	21	Teresina_PI	Promastigote	13
JX156483	Dog2	Dog	28	Teresina_PI	Amastigote	14
JX156484	Dog2	Dog	38	Teresina_PI	Amastigote	14
JX156485	Dog3	Dog	9	Teresina_PI	Amastigote	15
JX156486	MS2Dog	Dog	22	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156487	Dog2	Dog	27	Teresina_PI	Amastigote	15
JX156488	Human	Human	14	Teresina_PI	Promastigote	15
JX156489	Human	Human	5	Teresina_PI	Promastigote	15
JX156490	MS2Dog	Dog	51	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156491	Dog2	Dog	33	Teresina_PI	Amastigote	15
JX156492	MS2Dog	Dog	54	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156493	Dog3	Dog	21	Teresina_PI	Amastigote	15
JX156494	MS2Dog	Dog	8	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156495	MS2Dog	Dog	38	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156496	Dog3	Dog	29	Teresina_PI	Amastigote	15
JX156497	MS3Dog	Dog	8	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156498	MS2Dog	Dog	28	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156499	MS3Dog	Dog	69	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156500	MS3Dog	Dog	7	Campo Grande_MS	Promastigote	15
JX156501	Dog2	Dog	16	Teresina_PI	Amastigote	15
JX156502	Dog3	Dog	25	Teresina_PI	Amastigote	16
JX156503	Dog1	Dog	19	Teresina_PI	Promastigote	17
JX156504	Dog2	Dog	20	Teresina_PI	Amastigote	18
JX156505	MS2Dog	Dog	39	Campo Grande_MS	Promastigote	18
JX156506	Dog2	Dog	23	Teresina_PI	Amastigote	18
JX156507	Dog2	Dog	14	Teresina_PI	Amastigote	19
JX156508	Dog2	Dog	23	Teresina_PI	Amastigote	19
JX156509	MS2Dog	Dog	36	Campo Grande_MS	Promastigote	19
JX156510	MS2Dog	Dog	11	Campo Grande_MS	Promastigote	19
JX156511	MS2Dog	Dog	26	Campo Grande_MS	Promastigote	19
JX156512	Dog1	Dog	62	Teresina_PI	Promastigote	19
JX156513	Dog1	Dog	33	Teresina_PI	Promastigote	20
JX156514	Dog2	Dog	42	Teresina_PI	Amastigote	20
JX156515	Dog2	Dog	8	Teresina_PI	Amastigote	20
JX156516	Dog2	Dog	21	Teresina_PI	Amastigote	20
JX156517	Dog3	Dog	41	Teresina_PI	Amastigote	20

JX156518	Dog1	Dog	39	Teresina_PI	Promastigote	20
JX156519	Human	Human	9	Teresina_PI	Promastigote	21
JX156520	MS2Dog	Dog	4	Campo Grande_MS	Promastigote	21
JX156521	MS3Dog	Dog	25	Campo Grande_MS	Promastigote	22
JX156522	MS3Dog	Dog	22	Campo Grande_MS	Promastigote	22
JX156523	Dog1	Dog	26	Teresina_PI	Promastigote	22
JX156524	Dog1	Dog	21	Teresina_PI	Promastigote	23
JX156525	Dog2	Dog	36	Teresina_PI	Amastigote	23
JX156526	Dog2	Dog	45	Teresina_PI	Amastigote	23
JX156527	Dog2	Dog	22	Teresina_PI	Amastigote	23
JX156528	Dog2	Dog	30	Teresina_PI	Amastigote	23
JX156529	Dog2	Dog	31	Teresina_PI	Amastigote	23
JX156530	Dog2	Dog	46	Teresina_PI	Amastigote	23
JX156531	Dog2	Dog	6	Teresina_PI	Amastigote	23
JX156532	Dog3	Dog	26	Teresina_PI	Amastigote	24
JX156533	Dog3	Dog	29	Teresina_PI	Amastigote	24
JX156534	Dog3	Dog	2	Teresina_PI	Amastigote	25
JX156535	Dog1	Dog	6	Teresina_PI	Promastigote	26
JX156536	Dog1	Dog	15	Teresina_PI	Promastigote	27
JX156537	Dog1	Dog	38	Teresina_PI	Promastigote	27
JX156538	Human	Human	17	Teresina_PI	Promastigote	28
JX156539	Dog3	Dog	17	Teresina_PI	Amastigote	29
JX156540	Dog1	Dog	31	Teresina_PI	Promastigote	30
JX156541	Dog1	Dog	47	Teresina_PI	Promastigote	30
JX156542	Dog2	Dog	50	Teresina_PI	Amastigote	30
JX156543	Dog3	Dog	34	Teresina_PI	Amastigote	30
JX156544	Dog2	Dog	24	Teresina_PI	Amastigote	30
JX156545	Human	Human	31	Teresina_PI	Promastigote	31
JX156546	Dog2	Human	9	Teresina_PI	Amastigote	32
JX156547	Dog2	Dog	47	Teresina_PI	Amastigote	32
JX156548	Dog1	Dog	19	Teresina_PI	Promastigote	32
JX156549	Dog1	Dog	10	Teresina_PI	Promastigote	33
JX156550	Lu longipalpis	Lu longipalpis	14	Teresina_PI	Promastigote	33
JX156551	Dog3	Dog	8	Teresina_PI	Amastigote	33
JX156552	Dog2	Dog	28	Teresina_PI	Amastigote	33
JX156553	MS2Dog	Dog	5	Teresina_PI	Promastigote	34
JX156554	MS2Dog	Dog	63	Campo Grande_MS	Promastigote	34
JX156555	Human	Human	20	Teresina_PI	Promastigote	34
JX156556	MS2Dog	Dog	17	Campo Grande_MS	Promastigote	34
JX156557	MS2Dog	Dog	34	Campo Grande_MS	Promastigote	34
JX156558	MS2Dog	Dog	30	Campo Grande_MS	Promastigote	34
JX156559	Human	Human	11	Teresina_PI	Promastigote	34
JX156560	MS2Dog	Dog	45	Campo Grande_MS	Promastigote	34

JX156561	MS2Dog	Dog	32	Campo Grande_MS	Promastigote	34
JX156562	MS2Dog	Dog	33	Campo Grande_MS	Promastigote	34
JX156563	Dog1	Dog	10	Campo Grande_MS	Promastigote	34
JX156564	Dog2	Dog	7	Teresina_PI	Amastigote	34
JX156565	Dog3	Dog	27	Teresina_PI	Amastigote	35
JX156566	Dog1	Dog	17	Teresina_PI	Promastigote	36
JX156567	Dog1	Dog	41	Teresina_PI	Promastigote	37
JX156568	Human	Human	15	Teresina_PI	Promastigote	37
JX156569	Dog1	Dog	32	Teresina_PI	Promastigote	38
JX156570	Dog2	Dog	2	Teresina_PI	Amastigote	39
JX156571	Dog2	Dog	40	Teresina_PI	Amastigote	39
JX156572	Dog2	Dog	43	Teresina_PI	Amastigote	39
JX156573	Dog3	Dog	30	Teresina_PI	Amastigote	39
JX156574	Dog2	Dog	12	Teresina_PI	Amastigote	40
JX156575	Dog2	Dog	45	Teresina_PI	Amastigote	41
JX156576	Dog2	Dog	54	Teresina_PI	Amastigote	41
JX156577	Dog3	Dog	15	Teresina_PI	Amastigote	41
JX156578	Dog1	Dog	37	Teresina_PI	Promastigote	41
JX156579	Dog3	Dog	32	Teresina_PI	Amastigote	42
JX156580	Dog1	Dog	37	Teresina_PI	Promastigote	43
JX156581	Dog3	Dog	36	Teresina_PI	Amastigote	43
JX156582	Dog3	Dog	40	Teresina_PI	Amastigote	43
JX156583	Dog3	Dog	18	Teresina_PI	Amastigote	43
JX156584	Dog1	Dog	2	Teresina_PI	Promastigote	43
JX156585	MS3Dog	Dog	18	Campo Grande_MS	Promastigote	44
JX156586	MS3Dog	Dog	29	Campo Grande_MS	Promastigote	44
JX156587	Dog3	Dog	20	Teresina_PI	Amastigote	44
JX156588	Human	Human	13	Teresina_PI	Promastigote	45
JX156589	Dog2	Dog	51	Teresina_PI	Amastigote	46
JX156590	MS2Dog	Dog	14	Campo Grande_MS	Promastigote	47
JX156591	Dog1	Dog	4	Teresina_PI	Promastigote	47
JX156592	Dog1	Dog	7	Teresina_PI	Promastigote	47
JX156593	Dog1	Dog	13	Teresina_PI	Promastigote	47
JX156594	Dog1	Dog	16	Teresina_PI	Promastigote	47
JX156595	Dog1	Dog	19	Teresina_PI	Promastigote	47
JX156596	Dog1	Dog	34	Teresina_PI	Promastigote	47
JX156597	Human	Human	19	Teresina_PI	Promastigote	47
JX156598	Dog2	Dog	42	Teresina_PI	Amastigote	47
JX156599	MS2Dog	Dog	60	Campo Grande_MS	Promastigote	47
JX156600	MS3Dog	Dog	2	Campo Grande_MS	Promastigote	47
JX156601	MS3Dog	Dog	13	Campo Grande_MS	Promastigote	47
JX156602	Dog1	Dog	27	Teresina_PI	Promastigote	48
JX156603	Dog1	Dog	44	Teresina_PI	Promastigote	48

JX156604	Dog2	Dog	4	Teresina_PI	Amastigote	48
JX156605	Dog2	Dog	49	Teresina_PI	Amastigote	48
JX156606	Human	Human	6	Teresina_PI	Promastigote	48
JX156607	Dog1	Dog	43	Teresina_PI	Promastigote	48
JX156608	Human	Human	2	Teresina_PI	Promastigote	49
JX156609	Human	Human	3	Teresina_PI	Promastigote	50
JX156610	Dog1	Dog	22	Teresina_PI	Promastigote	50
JX156611	Dog2	Dog	17	Teresina_PI	Amastigote	51
JX156612	Dog3	Dog	22	Teresina_PI	Amastigote	51
JX156613	Dog3	Dog	25	Teresina_PI	Amastigote	52
JX156614	Dog1	Dog	5	Teresina_PI	Promastigote	52
JX156615	Dog1	Dog	23	Teresina_PI	Promastigote	53
JX156616	Dog1	Dog	24	Teresina_PI	Promastigote	53
JX156617	MS2Dog	Dog	64	Campo Grande_MS	Promastigote	53
JX156618	MS3Dog	Dog	1	Campo Grande_MS	Promastigote	53
JX156619	Dog2	Dog	1	Teresina_PI	Amastigote	53
JX156620	MS3Dog	Dog	14	Campo Grande_MS	Promastigote	53
JX156621	MS3Dog	Dog	11	Campo Grande_MS	Promastigote	53
JX156622	MS2Dog	Dog	24	Campo Grande_MS	Promastigote	53
JX156623	Dog1	Dog	48	Teresina_PI	Promastigote	53
JX156624	Dog2	Dog	9	Teresina_PI	Amastigote	53
JX156625	Dog1	Dog	49	Teresina_PI	Promastigote	53
JX156626	MS3Dog	Dog	3	Campo Grande_MS	Promastigote	53
JX156627	MS2Dog	Dog	28	Campo Grande_MS	Promastigote	53

5. Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

Alonso DP, Costa DL, de Mendonça IL, Costa CH, Ribolla PE. Heterogeneity of *Leishmania infantum* chagasi kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop Med Hyg.* v. 82(5):819-21, 2010.

Aransay A.M., Scoulica E., Tseletis Y. Detections and identifications of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR and minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* v.66 (5): p.1933-1938, 2000.

Barker, D.C. DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today.* v.3: p.177-184, 1987.

Borovisky (1898) apud ____ Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesus, M.N., Marzal, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. *Química Nova.* v. 26(4): p. 550-555, 2003.

Brewster, S. and Barker, D.C. Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* v.96: Supplement 1; S1/55-S1/63, 2002.

Chappuis F., Sundar S., Hailu A., Ghalib H., Rijal S., Peeling R.W., Alvar J. and Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology.* v. 5: p.7-16, 2007.

Cunha, A. M. & Chagas, E.1937. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênico para o homem (nota prévia). *O Hospital* v. XI (2) p: 5-9

Cunningham (1885) apud ____ Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesus, M.N., Marzal, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. *Química Nova* v. 26(4): p. 550-555, 2003.

Desjeux, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology,* v. 14: p. 417-423, 1996.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 27: 305–318 2004.

Donovan, C. On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in Índia. *BMJ,* v. 2: p. 79, 1903.

El-Sayed N.M. et al. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science*, v.309 p: 404-409, 2005.

Fisa R., Rieira C., Gállego M., Manubens J., Portús M, Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, v. 99 p: 105-111, 2001.

Fundação Nacional De Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (Calazar): Normas técnicas. Ministério da Saúde. Brasília, 2003.

Galati, Eab. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In Rangel EF, Lainson R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, Fiocruz. pg. 55, 2003.

Genaro, O & Michalick, M. S. M. Leishmaniose visceral americana. In: Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Editora Ateneu. 11^a ed.cap. 10: 67-83, 2005.

Grimaldi, G. Jr., & Tesh, R. B. L. Leishmaniasis of the new World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiol Review*. v. 6: 230-250, 1993.

Haile, S. and Papadopoulou, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*. v.10(6): p.569-577, 2007.

Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *TRENDS in Parasitology* v.22 (9): 439-445, 2006.

Lainson R. and Shaw, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press Inc., London v.1, p. 1-120, 1987.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948, 2007.

Laurent, M. and Steinert, M. (1970) Electron microscopy of kinetoplastic DNA from *Trypanosoma mega*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. v.66:419–424

Laveran & Mesnil (1903) apud ____ Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesus, M.N., Marzal, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. Química Nova v. 26(4): 550-555, 2003.

Lee, S. T., Tarn, C. & Chang, K. P. Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. Molecular and Biochemical Parasitology. v.58:187-204, 1993.

Leishman, W. B. On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in Índia. BMJ, v. 2: 79, 1903.

Liu B., Liu Y., Motyka S.A., Agbo E.E.C And Englund P.T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. TRENDS in Parasitology, v.21 (8): 363-369, 2005.

Lutz A. and Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 4: 84-95, 1912. TRENDS in Parasitology, v.24 (3): 103- 105, 2008.

Lynn M.A. and McMaster WR. *Leishmania*: conserved evolution – diverse diseases.

Marfurt, J., Niederwieser, I., Makia, N. D., Beck, H-P., Felger, I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 46: 115-124, 2003.

Martínez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J.C., Florencio-Martínez L.E., Manning-Cela R. G. and Figueroa-Ângulo E.E. Gene expression in Trypanosomatid Parasites. Journal of Biomedicine and Biothechnology, v.2010:1-15, 2010.

Maslov, D.A., Sturm, N.R., Niner, B.M., Gruszyinsk, E.S., Peris, M. and Simpson, L. An intergenic G-rich region in *Leishmania tarentole* kinetoplast maxicircle DNA is a pan-edited cryptogene encoding ribosomal protein S12. Molecular and Cellular Biology. v.12:56-57, 1992.

Myler, P.J., Audleman, L., Devos, T. et al. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has a unusual distribution of protein-coding genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.96(6): p.2902-2906, 1999.

Nasereddin, A., et al., Kinetoplast DNA heterogeneity among *Leishmania infantum* strains in central Israel and Palestine. *Vet. Parasitology*. v.(161): 126-130, 2009.

Noyes, A. H., Reyburn, H., Bailey, J.W. and Smith, D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*. v.36(10): p.2877-2881, 1998.

Parsons, M., Nelson, R.G., Watkins, K.P. and Agabian, N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell*. v.38 (1): p.309-316, 1984.

Peacock C. S., et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*. v.39(7):839-47, 2007.

Penna, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil Médico*, v.48: 949-950, 1934.

Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesus, M.N., Marzal, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. *Química Nova* v. 26(4): 550-555, 2003.

Renger, H.C. and Wolstenholme, D.R. (1970) Kinetoplast deoxyribonucleic acid of the hemoflagellate *Trypanosoma lewisi*. *J. Cell Biol.* v.47: 689–702.

Rey, L. O Complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaníase Visceral In:Parasitologia. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. 3ªed. Cap. 19, 253-266, 2001.

Riou, G. and Delain, E. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.62 : 210–217, 1969.

Rogers, L Preliminary note on the development of Trypanossoma in cultures of Cunningham-Leshman-Donovan bodies of cachexial fever and kala-azar. Lancet v.2:215-216, 1904.

Rohrer, S.P., Michelotti, E.F., Torri, A.F. and Hajduk, S.L. Transcription of kinetoplast DNA minicircles. Cell. v.49:625-632, 1987.

Ross apud ____ Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesus, M.N., Marzal, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. Química Nova v. 26(4): p. 550-555, 1903.

Shapiro, T.A. and Englund, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu. Rev. Microbiol. v. 49:117-143, 1995.

Simpson, L. Morphogenesis and the function of the kinetoplast in "Leishmania". Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica. v. 6 (Patologia): 231-234, 1967.

Simpson, L. and Silva, A. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *Leishmania tarentolae*. J. Mol. Biol. 56, 443–473, 1971.

Simpson, L. The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. Molecular and Biochemical Parasitology. v.86:133-141, 1997.

Sturm, N. R. and Simpson, L. Cell, 61: 879-884, 1990.

Sturm, N. R. and Simpson, L. Nucleic Acids Research. v.19(22): 6277-6281, 1991.

Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol Biol Evol v.24 (8): 1596-1599, 2007.

Thiemann, O.H., Maslov, D.A. & Simpson, L. Disruption of RNA editing in *Leishmania tarentole* by the loss of minicircle-encoded guide RNA genes. EMBO Journal. v.13:5689-5700, 1994.

Yurchenko, V.Y., Merzlyak, E.M., Kolesnikov, A.A., Martinkina, L.P., Vengerov, Y.Y. J Clin Microbiol. v.37(5):1656-7, 1999.

Williams, P & Dias, E. S. Psychodidae. In: Neves, D. P. Parasitologia Humana. São Paulo, Editora Ateneu. 11^a ed. Cap. 42: 345 - 353, 2005.

Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., et al. The Leishmania genoma comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Research, v.24(9): p.1699-1694, 1996.

(WHO). World Health Organization/ Disease Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/tdr/research/ntd/visceral_leishmaniasis/en/ _acessado dia 02/07/2012.

6. Anexos

6. Anexos

Tabela 1: Sequencias obtidas no tabalho comparadas com as depositadas no GENBANK (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

Amostra	Nome da Amostra	Acesso NCBI	Descrição	Query Coverage	Max Ident
Dog 1	Beer – Clone 1	AJ010086.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IN/80/DD8	8%	93%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	8%	90%
Dog 2	Beer – Clone 2	AF082587.1	Leishmania donovani strain GD329 Clone GD329-2 kinetoplast minicircle DNA, partial sequence	50%	86%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	11%	90%
Dog 4	Beer – Clone 3	AF190882.1	Leishmania infantum isolate MHOM/ES/81/LEM307 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	11%	90%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	5%	100%
Dog 5	Beer – Clone 4	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, Clone 591	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	85%
Dog 6	Beer – Clone 5	AJ010076.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 18	53%	80%
		FR799614.1		20%	97%

			Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27		
Dog 7	Beer – Clone 6	EU437406.1 FR799614.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_8 kinetoplast minicircle, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	11% 5%	90% 100%
Dog 9	Beer – Clone 7	Z35272.1 FR799614.1	L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 21%	100% 89%
Dog 10	Beer – Clone 9	AJ270119.1 FR799614.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly G319 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	15% 25%	97% 86%
Dog 11	Beer – Clone 10	AF190883.1 FR799614.1	Leishmania infantum isolate MHOM/FR/91/LEM-2298 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	5% 27%	100% 79%
Dog 13	Beer – Clone 11	AF103737.1 FR799614.1	Leishmania donovani strain MHOM/SD/97/RLD1 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	6% 5%	97% 97%
Dog 14	Beer – Clone 12	AF168356.1 FR799614.1	Leishmania donovani isolate MHOM/IQ/88/RTC6 kinetoplast minicircle, sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14% 25%	98% 86%
Dog 15	Beer – Clone 13	AJ275331.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, Clone 576	100%	98%
Dog 16	Beer – Clone 14	EU437406.1 FR799614.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_8 kinetoplast minicircle, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	11% 5%	90% 100%
Dog 17	Beer – Clone 15	AJ275330.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, Clone 575	8%	95%
Dog 19	Beer – Clone 16	EU437406.1 FR799614.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_8 kinetoplast minicircle, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	11% 5%	90% 100%
Dog 20	Beer – Clone 17	AJ010081.1 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 12 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 9%	97% 86%
Dog 21	Beer – Clone 18	AF169138.1 FR799614.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 13%	98% 97%
Dog 22	Beer – Clone 19	AJ010074.2 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 11 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12% 17%	89% 100%
Dog 23	Beer – Clone 20	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, Clone 591	100%	98%

		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	85%
Dog 24	Beer – Clone 21	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, Clone 591	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	85%
Dog 27	Beer – Clone 22	AF239704.1	Leishmania donovani isolate MHOM/KE/79/GG996 kinetoplast minicircle sequence	14%	91%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	97%
Dog 28	Beer – Clone 23	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 5	10%	88%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	9%	90%
Dog 31	Beer – Clone 24	AJ010074.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 11	12%	87%
Dog 32	Beer – Clone 27	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	34%	87%
Dog 33	Beer – Clone 28	AJ270147.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolated parasites	11%	90%
Dog 34	Beer – Clone 29	EU437406.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_8 kinetoplast minicircle, complete sequence	11%	90%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	5%	100%
Dog 36	Beer – Clone 31	AF169138.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	13%	97%
Dog 37	Beer – Clone 32	AJ275333.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, Clone 578	12%	95%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	91%
Dog 38	Beer – Clone 33	AJ275331.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, Clone 576	100%	98%
Dog 41	Beer – Clone 34	AJ275330.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, Clone 575	8%	95%
Dog 42	Beer – Clone 36	AJ270147.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolated parasites	11%	90%
Dog 43	Beer – Clone 37	AJ010080.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 7	15%	86%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	10%	93%
Dog 44	Beer – Clone 38	AF239704.1	Leishmania donovani isolate MHOM/KE/79/GG996 kinetoplast minicircle sequence	14%	91%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	97%

Dog 45	Beer – Clone 39	AF169138.1 FR799614.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 13%	98% 97%
Dog 46	Beer – Clone 40	AF082584.1 FR799614.1	Leishmania donovani strain UM48 Clone UM48-1 kinetoplast minicircle DNA, partial sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	9% 5%	95% 97%
Dog 47	Beer – Clone 41	AJ010074.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 11	12%	87%
Dog 48	Beer – Clone 42	AJ275334.1 FR799614.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, Clone 591 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 14%	98% 85%
Dog 49	Beer – Clone 43	AJ275334.1 FR799614.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, Clone 591 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 14%	98% 85%
Insect 3	Flebótomo – Clone 3	AF308683.1 FR799614.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	98% 5%	96% 100%
Insect 8	Flebótomo – Clone 8	AF168356.1	Leishmania donovani isolate MHOM/IQ/88/RTC6 kinetoplast minicircle, sequence	14%	98%
Human 2	1024 – Clone 1	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 5	100%	97%
Human 3	1024 – Clone 2	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 5	100%	97%
Human 4	1024 – Clone 3	Z35272.1	L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA	99%	100%
Human 5	1024 – Clone 4	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
Human 6	1024 – Clone 5	AJ010080.2 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 7c Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	15% 16%	86% 97%
Human 8	1024 – Clone 6	EU437404.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_5 kinetoplast minicircle, complete sequence	91%	81%
Human 9	1024 – Clone 7	AF168358.1	Leishmania donovani isolate MHOM/CN/80/STRAIN-A kinetoplast minicircle, sequence	10%	91%
Human11	1024 – Clone 8	AJ010086.1 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IN/80/DD8 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	8% 8%	93% 90%
Human12	1024 – Clone 9	DQ276852.1	Leishmania sp. SL/R/5 from Sri Lanka minicircle sequence; kinetoplast Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100%	82%

		FR799614.1		22%	88%
Human13	1024 – Clone 10	AF239704.1	Leishmania donovani isolate MHOM/KE/79/GG996 kinetoplast minicircle sequence	100%	80%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	97%
Human14	1024 – Clone 11	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	96%
Human15	1024 – Clone 12	AJ270144.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle DNA, strain LEM 235	100%	96%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	96%
Human17	1024 – Clone 13	EU437403.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_4 kinetoplast minicircle, complete sequence	58%	96%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	84%
Human18	1024 – Clone 14	DQ276852.1	Leishmania sp. SL/R/5 from Sri Lanka minicircle sequence; kinetoplast	100%	82%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	22%	88%
Human19	1024 – Clone 15	EU437406.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_8 kinetoplast minicircle, complete sequence	11%	90%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	5%	100%
Human20	1024 – Clone 16	AJ010086.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IN/80/DD8	7%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	5%	100%
Human21	1024 – Clone 17	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	100%	96%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	23%	80%

Sequencias de Amastigotas

Amostra	Nome	Acesso Blast	Description	Query Coverage	Max Ident
Dog 2 Clone 1	Huck Clone 1	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	98%
		FR796459.1	Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 27	7%	95%
Dog 2 Clone 2	Huck Clone 2	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	69%	85%
		AJ010076.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 18	21%	92%
Dog 2 Clone 4	Huck Clone 4	AF239704.1	L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA	14%	91%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	97%

Dog 2 Clone 5	Huck Clone 5	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	33%	79%
Dog 2 Clone 6	Huck Clone 6	AF169138.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	100%	99%
Dog 2 Clone 7	Huck Clone 7	AF188701.1	Leishmania infantum isolate MHOM/ES/81/LEM307 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	10%	87%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	5%	97%
Dog 2 Clone 8	Huck Clone 8	AJ270147.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolated parasites	11%	90%
Dog 2 Clone 9	Huck Clone 9	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	85%
Dog 2 Clone 12	Huck Clone 12	AJ010080.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 7	12%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	25%	91%
Dog 2 Clone 13	Huck Clone 13	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 5	9%	92%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	10%	89%
Dog 2 Clone 14	Huck Clone 14	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	80%
		Z35500.1	L.infantum (MCAN/ES/97/LLM-32) kinetoplast DNA, 767 bp	14%	100%
Dog 2 Clone 15	Huck Clone 15	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 5	10%	88%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	9%	90%
Dog 2 Clone 17	Huck Clone 17	AJ010074.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 11	20%	90%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	89%
Dog 2 Clone 19	Huck Clone 19	AJ010076.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 18	100%	72%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	21%	88%
Dog 2 Clone 20	Huck Clone 20	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 5	10%	88%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	9%	90%
Dog 2 Clone 21	Huck Clone 21	AF167715.1	Leishmania donovani isolate MHOM/BD/93/TANGAIL kinetoplast minicircle	15%	96%
Dog 2 Clone 22	Huck Clone 22	AF169138.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 14	100%	99%

		FR796446.1		6%	78%
Dog 2 Clone 23	Huck Clone 23	FR799614.1 Z35500.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27 L.infantum (MCAN/ES/97/LLM-32) kinetoplast DNA, 767 bp	17% 14%	80% 100%
Dog 2 Clone 24	Huck Clone 24	AJ010074.2 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 11 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12% 16%	87% 97%
Dog 2 Clone 25	Huck Clone 25	DQ276851.1 Z35272.1	Leishmania sp. SL/R/2 from Sri Lanka minicircle sequence; kinetoplast L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA	100% 21%	80% 96%
Dog 2 Clone 26	Huck Clone 26	AJ010079.2 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 5 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	10% 9%	88% 90%
Dog 2 Clone 27	Huck Clone 27	U48802.1 FR799614.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 17%	97% 96%
Dog 2 Clone 28	Huck Clone 28	AJ270143.1 FR799614.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly B8 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	95% 15%	97% 83%
Dog 2 Clone 29	Huck Clone 29	AJ010079.2 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 5 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	10% 9%	88% 90%
Dog 2 Clone 30	Huck Clone 30	AF169138.1 FR799601.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 14	100% 6%	99% 78%
Dog 2 Clone 31	Huck Clone 31	AF169138.1 FR796446.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 14	100% 6%	99% 78%
Dog 2 Clone 33	Huck Clone 33	FR799614.1 FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20% 9%	92% 90%
Dog 2 Clone 34	Huck Clone 34	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 5	10%	88%
Dog 2 Clone 35	Huck Clone 35	AF082584.1 FR799614.1	Leishmania donovani strain UM48 Clone UM48-1 kinetoplast minicircle Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	39% 13%	73% 85%

Dog 2 Clone 36	Huck Clone 36	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	80%
		Z35500.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly N45	14%	100%
Dog 2 Clone 37	Huck Clone 37	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 5	10%	87%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27		
Dog 2 Clone 38	Huck Clone 38	AJ270143.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly B8	95%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	15%	84%
Dog 2 Clone 39	Huck Clone 39	AJ010081.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 12	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	23%	86%
Dog 2 Clone 40	Huck Clone 40	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	34%	87%
		AF308686.1	Leishmania donovani strain MHOM/SD/92/18 kinetoplast minicircle DNA	8%	93%
Dog 2 Clone 41	Huck Clone 41	AJ270147.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolated parasites	20%	91%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	19%	90%
Dog 2 Clone 42	Huck Clone 42	AF190882.1	Leishmania infantum isolate MHOM/ES/81/LEM307 kinetoplast minicircle	22%	90%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	100%
Dog 2 Clone 43	Huck Clone 43	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	34%	87%
		EU437404.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_5 kinetoplast minicircle, complete sequence	9%	91%
Dog 2 Clone 44	Huck Clone 44	AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 5	10%	88%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	9%	90%
Dog 2 Clone 45	Huck Clone 45	AJ275325.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/98/LLM-735, clone 107	12%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	25%	91%
Dog 2 Clone 46	Huck Clone 46	AF169138.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	100%	99%
Dog 2 Clone 47	Huck Clone 47	AJ010076.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/IQ/88/RTC6, Clone 18	100%	72%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20%	97%
Dog 2 Clone 48	Huck Clone 48	AJ275333.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, Clone 578	12%	97%

		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	13%	97%
Dog 2 Clone 49	Huck Clone 49	AF239704.1	Leishmania donovani isolate MHOM/KE/79/GG996 kinetoplast minicircle sequence	14%	91%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	97%
Dog 2 Clone 50	Huck Clone 50	AJ275335.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, Clone 592	10%	91%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	23%	84%
Dog 2 Clone 51	Huck Clone 51	AJ010078.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 16	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	7%	92%
Dog 2 Clone 54	Huck Clone 54	AJ010080.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 7	12%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	25%	90%
Dog 3 Clone 2	Huck Clone 2	Z35501.1	L.infantum (MCAN/ES/87/LLM-32) kinetoplast DNA, 774 bp	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	100%
Dog 3 Clone 8	Flash Clone 8	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	96%
Dog 3 Clone 9	Flash Clone 9	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	96%
Dog 3 Clone 11	Flash Clone 11	AJ275325.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/98/LLM-735, Clone 107	15%	82%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	13%	82%
Dog 3 Clone 14	Flash Clone 14	Z35501.1	L.infantum (MCAN/ES/87/LLM-32) kinetoplast DNA, 774 bp	9%	94%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	4%	100%
		FR796450.1	Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 18	7%	77%
		FR796459.1	Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 27	3%	90%
Dog 3 Clone 15	Flash Clone 15	AJ010080.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 7	21%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14%	90%
Dog 3 Clone 16	Flash Clone 16	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	28%	87%
		FR796445.1	Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 13	10%	88%
Dog 3 Clone	Flash	AJ275327.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain	100%	98%

17	Clone 17	FR799614.1	MHOM/ES/97/LLM-719, clone 572 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	11%	84%
Dog 3 Clone 18	Flash Clone 18	Z35272.1 FR796439.1	L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 7	20% 4%	91% 88%
Dog 3 Clone 19	Flash Clone 19	Z35272.1 FR799614.1	L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12% 16%	95% 100%
Dog 3 Clone 20	Flash Clone 20	AF239704.1 FR799614.1	Leishmania donovani isolate MHOM/KE/79/GG996 kinetoplast minicircle Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 16%	80% 97%
Dog 3 Clone 21	Flash Clone 21	U48802.1 FR799614.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	100% 17%	97% 96%
Dog 3 Clone 22	Flash Clone 22	AF082584.1 FR799614.1	Leishmania donovani strain UM48 Clone UM48-1 kinetoplast minicircle Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	53% 22%	72% 85%
Dog 2 Clone 25	Flash Clone 25	AJ275335.1 FR799614.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 592 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	9% 9%	93% 90%
Dog 3 Clone 26	Flash Clone 26	AJ270103.1 FR799614.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly G12 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	23% 23%	88% 81%
Dog 3 Clone 27	Flash Clone 27	AF308682.1 FR799614.1	Leishmania chagasi kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	22% 13%	89% 89%
Dog 3 Clone 28	Flash Clone 28	EU437407.1 FR796459.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_9 Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 27	22% 4%	100% 86%
Dog 3 Clone 29	Flash Clone 29	AJ010079.2 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 5 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	10% 8%	87% 85%
Dog 3 Clone 30	Flash Clone 30	Z35272.1 FR799614.1	L.infantum (AJS-IPTKP) kinetoplast DNA Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	15% 15%	95% 100%
Dog 3 Clone 32	Flash Clone 32	AJ010080.2 FR799614.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, Clone 7 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17% 12%	97% 91%
Dog 3 Clone 34	Flash	EU437407.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 Clone LinGpja_9 kinetoplast minicircle, complete sequence	18%	96%

	Clone 34	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	22%	84%
Dog 3 Clone 36	Flash Clone 36	AJ275333.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, clone 578	12%	96%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	92%
Dog 3 Clone 39	Flash Clone 39	AJ270147.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolated parasites	11%	90%
		FR796450.1	Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 18	7%	77%
Dog 3 Clone 40	Flash Clone 40	AJ275333.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, clone 578	12%	96%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	92%
Dog 3 Clone 42	Flash Clone 42	AJ010078.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 16	17%	94%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	5%	100%
Dog 3 Clone 44	Flash Clone 44	EU437407.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_9 kinetoplast minicircle, complete sequence	10%	92%
		FR796445.1	Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 13	10%	88%
Dog 3 Clone 46	Flash Clone 46	AF027578.1	Leishmania infantum minicircle DNA, partial sequence	18%	100%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	8%	91%
MS2 clone8		U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
MS2 clone10		AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%
MS2 clone11		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	22%	100%
MS2 clone14		AJ010078.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/SD/85/FORSTER, clone 16	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	18%	93%
MS2 clone 16		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	13%	100%
		AJ010079.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate		96%

		AB678349.1	MHOM/SD/85/FORSTER, clone 5 Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	13%	100%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	8%	100%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	13%	100%
MS2 clone17		AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	9%	84%
MS2 clone22		U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	97%
		AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	13%	91
MS2 clone23		AJ010081.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate MHOM/	100%	98%
MS2 clone24		AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	99%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	86%
		FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-C12D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	14%	92%
MS2 clone25		U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	93%

MS2 clone26	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	22%	100%
	AJ010083.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate IMAR/KE/62/LRC-L57	14%	96%
	FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-C12D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	12%	100%
MS2 clone28	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 59	100%	99%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	86%
MS2 clone29	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	97%
	AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	13%	91%
MS2 clone30	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20%	90%
	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	9%	84%
MS2 clone32	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20%	90%
	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	9%	84%
MS2	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%

clone33	FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-CI2D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	13%	82%
	FR799614.1		20%	90%
	AB678348.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27 Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	9%	84%
MS2 clone34	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20%	90%
MS2 clone38	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	97%
	AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	13%	91%
MS2 clone43	DQ276855.1	Leishmania sp. SL/R/8 from Sri Lanka minicircle sequence; kinetoplast	14%	93%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	89%
	AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	15%	87%
MS2 clone45	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20%	90%
	X60509.1	L.tarentolae kinetoplast minicircle DNA for guide RNA (gRNA)	9%	85%
	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	9%	84%

MS2 clone50	DQ276855.1 FR799614.1 X60509.1 AB678349.1	Leishmania sp. SL/R/8 from Sri Lanka minicircle sequence; kinetoplast Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27 L.tarentolae kinetoplast minicircle DNA for guide RNA (gRNA) Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	14% 16% 9% 15%	93% 89% 83% 87%
MS2 clone51	U48802.1 FR799614.1 AB678349.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27 Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	100% 17% 13%	97% 97% 91%
MS2 clone53	DQ276855.1 FR799614.1	Leishmania sp. SL/R/8 from Sri Lanka minicircle sequence; kinetoplast Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	14% 16%	92% 89%
MS2 clone54	U48802.1 FR799614.1 AB678349.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27 Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	100% 17% 13%	97% 93% 88%
MS2 clone60	AF190882.1 AB678348.1 FR799614.1	Leishmania infantum isolate MHOM/ES/81/LEM307 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	22% 13% 16%	90% 96% 97%

MS2 clone62	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27		
	AJ010083.2	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, isolate IMAR/KE/62/LRC-L57	22%	100%
	AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	14%	96%
MS2 clone63	AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	14%	97%
	AF291093.1	Leishmania infantum kinetoplast minicircle sequence	30%	83%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	20%	90%
MS2 clone64	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	9%	84%
	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	99%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	86%
MS2 clone67	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	13%	100%
	AJ270141.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly N15	100%	100%
	FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-CI2D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	15%	93%
MS2 clone69	AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	15%	97%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	100%
	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
	FR799614.1		16%	100%

			Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27		
MS2 clone71		EU437405.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_7 kinetoplast minicircle, complete sequence	12%	100%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	89%
MS2 clone72		AJ270141.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly N15		
		FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-CI2D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	100%	100%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	15%	93%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	17%	100%
MS3 clone1		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	100%
		AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	98%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	27%	84%
MS3 clone2		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	13%	100%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	100%
		AF190882.1	Leishmania infantum isolate MHOM/ES/81/LEM307 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	22%	90%

MS3 clone3	AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	98%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	84%
	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	13%	100%
MS3 clone5	AJ270141.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly N15	100%	100%
	FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-CI2D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	15%	93%
	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	17%	100%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	100%
MS3 clone7	U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	99%	97%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	13%	81%
MS3 clone8	AJ275333.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-719, clone 578	14%	95%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	89%
MS3 clone10	AJ270141.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly N15	100%	100%
	FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-CI2D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	15%	93%
	AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	17%	100%
	FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	12%	100%

			Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27		
MS3 clone11		AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	84%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	13%	100%
MS3 clone13		EU437406.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_8 kinetoplast minicircle, complete sequence	15%	100%
		AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	16%	88%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	100%
MS3 clone14		AJ275334.1	Leishmania infantum kinetoplast partial minicircle DNA, strain MHOM/ES/97/LLM-710, clone 591	100%	98%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	84%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	13%	100%
MS3 clone16		U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	13%	81%
MS3 clone18		AF082587.1	Leishmania donovani strain GD329 clone GD329-2 kinetoplast minicircle DNA, partial sequence	50%	86%
		FR799614.1		16%	95%
		AB678349.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	22%	88%

			Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj		
MS3 clone20		DQ276855.1	Leishmania sp. SL/R/8 from Sri Lanka minicircle sequence; kinetoplast	100%	82%
		FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-CI2D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	13%	100%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	27%	84%
		AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	25%	82%
MS3 clone22		U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	100%
MS3 clone26		U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	100%
MS3 clone27		AJ270119.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolate sandfly G319	24%	91%
		AB678348.1	Leishmania infantum kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWinf	13%	100%
		FJ416603.1	Leishmania donovani isolate MHOM/SD/62/1S-CI2D maxicircle, partial sequence; kinetoplast	15%	95%
		AB678349.1	Leishmania major kinetoplast DNA, non-protein coding region, partial sequence, isolate: IranJWmaj	21%	92%
MS3 clone28		U48802.1	Leishmania infantum strain tortosa kinetoplastid minicircle sequence	100%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	100%

MS3 clone29		AF082587.1	Leishmania donovani strain GD329 clone GD329-2 kinetoplast minicircle DNA, partial sequence	50%	86%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	95%
MS3 clone30		AF308686.1	Leishmania donovani strain MHOM/SD/92/18 kinetoplast minicircle DNA, complete sequence	14%	97%
		FR799614.1	Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 27	16%	89%

Tabela 2: Classe 1 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos						
		162	169	170	221	277	564	629
Dog 2 Clone 20	Amastigota	G	-	-	A	A	T	T

MS2 Clone 16	Promastigota	G	T	-	A	A	C	T
Dog 2 Clone 44	Amastigota	G	T	-	A	A	C	T
Dog 2 Clone 15	Amastigota	G	T	-	A	A	C	T
Dog 2 Clone 26	Amastigota	G	T	-	A	A	C	T
Dog 2 Clone 34	Amastigota	G	T	-	A	A	C	T
Dog 2 Clone 37	Amastigota	G	T	-	A	A	C	C
Dog 2 Clone 29	Amastigota	G	T	-	A	A	C	C
Dog Clone 28	Promastigota	G	T	-	A	G	C	T
Dog 2 Clone 35	Amastigota	A	T	T	G	A	C	T

Tabela 3: Classe 2 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
MS3 Clone 20	Promastigota

Tabela 4: Classe 3 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 3 clone 42	Amastigota

Tabela 5: Classe 4 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos		
		185	293	478
Human Clone 12	Promastigota	G	C	A
Human Clone 18	Promastigota	A	-	G

Tabela 6: Classe 5 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos															
		117	118	131	133	134	135	139	159	228	248	427	436	576	603	668	676
MS2 Clone 71	Promastigota	G	A	T	A	G	T	T	A	A	T	A	A	A	A	C	T
MS3 Clone 8	Promastigota	G	A	T	A	G	T	T	A	A	T	A	A	A	A	C	C
MS3 Clone 30	Promastigota	G	A	T	A	G	T	-	A	A	T	A	A	A	A	C	T
Dog 2 clone 48	Amastigota	A	A	G	G	A	G	T	G	A	T	A	G	A	G	C	T
MS2 Clone 53	Promastigota	G	G	G	G	A	G	T	G	T	C	G	A	G	A	T	T
MS2 Clone 50	Promastigota	G	G	G	G	A	G	T	G	T	C	G	A	G	A	T	T
MS2 Clone 43	Promastigota	G	G	G	G	A	G	T	G	T	C	G	A	G	A	T	T

Tabela 7: Classe 6 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida

Dog 3 clone 14	Amastigota
----------------	------------

Tabela 8: Classe 7 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida
Human Clone 8	Promastigota

Tabela 9: Classe 8 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos						
		47	48	64	359	560	593	656
Dog 3 Clone 46	Amastigota	C	C	A	T	T	T	A
Dog 2 Clone 13	Amastigota	G	-	G	C	-	-	-

Tabela 10: Classe 9 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos		
		227	692	713
Dog Clone 46	Promastigota	G	-	T
MS3 Clone 27	Promastigota	A	A	C

Tabela 11: Classe 10 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 3 Clone 11	Amastigota

Tabela 12: Classe 11 de Mínicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos	
		308	674
Dog 3 Clone 16	Amastigota	A	T
Dog 3 Clone 44	Amastigota	G	T
Dog Clone 11	Promastigota	G	C

Tabela 13: Classe 12 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos									
		80	154	270	426	427	431	592	602	605	632
MS2 Clone 72	Promastigota	C	T	G	G	G	T	G	A	T	C
MS3 Clone 5	Promastigota	C	T	G	G	G	T	G	A	T	C
MS3 Clone 10	Promastigota	C	T	G	G	G	T	G	A	T	C
MS2 Clone 67	Promastigota	C	T	G	G	G	T	G	A	T	C
Insect Clone 3	Promastigota	-	-	A	A	A	C	-	G	C	G

Tabela 14: Classe 13 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida
Human Clone 21	Promastigota

Tabela 15: Classe 14 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos									
		75	132	181	257	340	364	537	673	679	680
Dog 2 Clone 28	Amastigota	G	T	G	T	C	G	G	T	T	C
Dog 2 Clone 38	Amastigota	-	-	C	C	T	A	A	-	-	-

Tabela 16: Classe 15 de Mínicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos												
		23	28	29	34	100	290	348	355	402	415	421	548	693
MS2 Clone 38	Promastigota	G	-	-	A	A	G	-	A	A	A	T	A	C
MS2 Clone 29	Promastigota	G	-	-	A	A	G	-	A	A	A	T	A	C
MS2 Clone 8	Promastigota	G	-	-	A	A	G	-	A	A	A	T	A	C
MS2 Clone 51	Promastigota	G	-	-	A	A	G	-	A	A	A	T	A	C
MS2 Clone 22	Promastigota	G	-	-	A	A	G	-	A	A	A	T	A	C

MS2 Clone 54	Promastigota	A	-	-	A	A	G	-	A	A	A	T	A	C
Dog 3 Clone 9	Amastigota	G	-	-	A	A	A	T	A	A	-	T	G	C
Dog 3 Clone 8	Amastigota	G	-	-	A	A	A	T	A	G	-	T	A	C
Dog 2 Clone 27	Amastigota	G	-	-	A	A	A	T	A	A	-	T	A	C
Dog 2 Clone 33	Amastigota	G	-	-	A	A	A	T	A	A	-	T	A	C
Human 14	Promastigota	G	-	-	A	A	A	T	A	A	-	T	A	C
Human 5	Promastigota	G	-	-	A	A	A	T	A	A	-	T	A	C
Dog 3 Clone 21	Amastigota	G	-	-	A	A	A	T	A	A	-	T	A	C
MS3 Clone 7	Promastigota	G	-	T	G	C	A	T	G	A	A	C	A	T
MS3 Clone 16	Promastigota	G	G	T	G	C	A	T	G	A	A	C	A	T
MS2 Clone 69	Promastigota	G	G	T	G	C	A	T	G	A	A	C	A	T
MS3 Clone 28	Promastigota	G	G	T	G	C	A	T	G	A	A	C	A	T

Tabela 17: Classe 16 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 2 Clone 25	Amastigota

Tabela 18: Classe 17 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 3 Clone 19	Amastigota

Tabela 19: Classe 18 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos
Dog Clone 20	Promastigota	-
Dog 2 Clone 39	Amastigota	-
MS2 Clone 23	Promastigota	-

Tabela 20: Classe 19 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos								
		35	40	253	275	261	504	556	620	706
MS2 Clone 11	Promastigota	G	G	A	A	C	T	A	A	T
MS2 Clone 26	Promastigota	G	G	G	A	C	T	A	A	T
MS2 Clone 62	Promastigota	G	G	G	A	T	T	A	A	T
Dog 2 Clone 14	Amastigota	A	G	G	G	T	C	G	A	C
Dog 2 Clone 36	Amastigota	A	G	G	G	T	C	G	G	C
Dog 2 Clone 23	Amastigota	A	-	G	G	T	T	G	A	C

Tabela 21: Classe 20 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos							
		20	39	231	402	452	610	641	653
Dog 2 Clone 8	Amastigota	-	G	G	A	T	G	-	A
Dog 2 Clone 41	Amastigota	C	G	G	A	T	A	T	A
Dog 2 Clone 21	Amastigota	-	G	G	A	T	A	-	A
Dog Clone 42	Promastigota	-	G	G	A	T	A	-	G
Dog 3 Clone 39	Amastigota	-	G	-	G	T	A	-	G
Dog Clone 33	Promastigota	-	T	G	A	C	A	-	G

Tabela 22: Classe 21 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos		
		1	138	287
Dog Clone 9	Promastigota	G	G	G
Human Clone 4	Promastigota	T	A	A

Tabela 23: Classe 22 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos

		13	285	351	361	415	606	672	677	678	691
MS3 Clone 22	Promastigota	A	G	C	A	T	G	C	A	C	-
MS3 Clone 26	Promastigota	A	G	C	A	T	G	C	A	C	-
MS2 Clone 25	Promastigota	G	A	T	-	C	T	T	-	-	C

Tabela 24: Classe 23 de Minicirculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos					
		150	223	585	661	679	707
Dog 2 Clone 30	Amastigota	C	G	G	G	G	C
Dog 2 Clone 6	Amastigota	C	A	G	G	G	C
Dog 2 Clone 31	Amastigota	C	G	G	G	G	C
Dog 2 Clone 22	Amastigota	C	G	G	G	G	C
Dog 2 Clone 46	Amastigota	T	G	G	G	G	C
Dog Clone 21	Promastigota	T	G	A	A	A	T
Dog Clone 36	Promastigota	T	G	A	A	A	T
Dog Clone 45	Promastigota	T	G	A	A	A	T

Tabela 25: Classe 24 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos
Dog 3 Clone 26	Amastigota	-
Dog 3 Clone 29	Amastigota	-

Tabela 26: Classe 25 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 3 Clone 2	Amastigota

Tabela 27: Classe 26 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog Clone 6	Promastigota

Tabela 28: Classe 27 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos
Dog Clone 15	Promastigota	-
Dog Clone 38	Promastigota	-

Tabela 29: Classe 28 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Human Clone 17	Promastigota

Tabela 30: Classe 29 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 3 Clone 17	Amastigota

Tabela 31: Classe 30 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismo		
		45	543	685
Dog Clone 31	Promastigota	A	T	C
Dog Clone 47	Promastigota	A	T	C
Dog 3 Clone 34	Amastigota	A	A	C
Dog 2 Clone 24	Amastigota	A	T	C
Dog 2 Clone 50	Amastigota	G	T	T

Tabela 32: Classe 31 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Human Clone 9	Promastigota

Tabela 33: Classe 32 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos				
		44	202	374	587	588
Dog 2 Clone 19	Amastigota	-	G	T	-	-
Dog 2 Clone 47	Amastigota	G	-	A	T	A

Tabela 34: Classe 33 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vidas	Polimorfismos			
		141	259	427	579

Insect Clone 8	Promastigota	C	T	G	T
Dog 3 Clone 28	Amastigota	T	C	A	T
Dog Clone 10	Promastigota	C	T	A	C
Dog Clone 14	Promastigota	C	T	A	C

Tabela 35: Classe 34 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos						
		71	149	220	358	433	579	670
MS2 Clone 34	Promastigota	T	A	C	T	A	C	T
MS2 Clone 30	Promastigota	T	A	C	T	A	C	T
MS2 Clone 32	Promastigota	T	A	C	T	A	C	T
MS2 Clone 63	Promastigota	T	A	C	T	A	C	T
MS2 Clone 45	Promastigota	T	A	C	T	A	C	T
Human Clone 20	Promastigota	T	A	C	T	G	C	C
Human Clone 11	Amastigota	T	A	C	T	G	C	T
MS2 Clone 33	Promastigota	T	A	C	T	A	C	T
MS2 Clone 10	Promastigota	T	A	C	T	A	C	T
MS2 Clone 17	Promastigota	C	A	C	T	A	C	T

Dog Clone 1	Promastigota	T	G	C	T	A	T	T
Dog 2 Clone 5	Promastigota	T	G	T	C	A	C	T

Tabela 36: Classe 35 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 2 Clone 7	Amastigota

Tabela 37: Classe 36 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog 3 Clone 27	Amastigota

Tabela 38: Classe 37 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismo
		330
Dog Clone 17	Promastigota	A
Dog Clone 41	Promastigota	G

Tabela 39: Classe 38 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Human Clone 15	Promastigota

Tabela 40: Classe 39 de Minicírculos

Amostras	Formas de Vida	Polimorfimos			
		19	100	261	664
Dog 2 Clone 2	Amastigota	C	A	A	T
Dog 2 Clone 40	Amastigota	T	A	A	T
Dog Clone 32	Promastigota	T	G	A	T
Dog 2 Clone 43	Amastigota	T	A	C	C

Tabela 41: Classe 40 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
----------------	----------------------

Dog 3 Clone 30	Amastigota

Tabela 42: Classe 41 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos			
		21	29	415	712
Dog 3 Clone 15	Amastigota	G	G	-	T
Dog 2 Clone 54	Amastigota	G	G	-	T
Dog 2 Clone 12	Amastigota	A	G	-	T
Dog 2 Clone 45	Amastigota	G	A	C	C

Tabela 43: Classe 42 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida
Dog Clone 37	Promastigota

Tabela 44: Classe 43 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos											
		31	39	43	53	61	62	64	72	298	339	554	639
Dog 3 Clone 36	Amastigota	C	T	T	A	T	C	A	G	A	T	T	G
Dog 3 Clone 40	Amastigota	C	T	T	A	T	C	A	G	A	T	T	G
Dog Clone 37	Promastigota	C	T	C	A	T	C	A	G	G	T	T	A
Dog 3 Clone 32	Amastigota	C	T	C	A	T	C	A	G	A	T	T	G
Dog 3 Clone 18	Amastigota	T	G	C	G	C	T	T	A	A	G	C	G

Tabela 45: Classe 44 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos													
		184	229	256	268	309	341	364	428	443	495	550	587	623	646
MS3 Clone 18	Promastigota	T	G	C	T	A	-	A	C	T	G	G	C	G	-
MS3 Clone 29	Promastigota	T	G	C	T	G	-	A	C	T	G	G	C	G	-
Dog Clone 2	Promastigota	C	-	T	G	G	C	G	T	C	A	A	A	A	A

Tabela 46: Classe 45 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos									
		29	31	34	140	168	243	279	291	344	529
Human Clone 13	Promastigota	G	T	A	G	-	T	T	G	A	C
Dog 3 Clone 20	Amastigota	A	C	G	A	T	C	C	-	C	T

Tabela 47: Classe 46 de Minicírculos

Amostra	Forma de Vida	Polimorfismos				
		395	411	493	517	601
Dog 2 Clone 51	Amastigota	T	A	G	T	G
MS2 Clone 14	Promastigota	C	G	A	C	A

Tabela 48: Classe 47 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos																				
		64	146	153	250	359	360	373	446	448	537	611	612	688	689	690	693	694	695	696	697	698
		Human Clone 19	Promastigota	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	-	-	T	A	G	G	C	G	T
MS2 Clone 60	Promastigota	T	A	T	T	G	C	A	A	C	A	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
MS3 Clone 2	Promastigota	C	A	T	C	-	T	A	A	T	A	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
MS3 Clone 13	Promastigota	C	A	T	C	-	T	A	A	T	A	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
Dog Clone 34	Promastigota	T	A	T	T	G	C	G	A	C	G	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
Dog Clone 4	Promastigota	T	A	T	T	G	C	G	A	C	G	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
Dog Clone 16	Promastigota	T	A	T	T	G	C	G	G	C	G	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
Dog Clone 19	Promastigota	T	A	T	T	G	C	G	G	C	G	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
Dog Clone 7	Promastigota	T	A	T	T	G	C	G	A	C	G	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C

Dog 2 Clone 42	Promastigota	T	A	C	T	G	C	G	A	C	G	A	G	T	A	G	G	C	G	T	T	C
Dog Clone 13	Promastigota	T	A	C	T	G	C	G	A	C	G	A	G	A	T	C	A	T	C	C	C	G

Tabela 49: Classe 48 de Minicírculos

Amostras	Formas de Vida	Polimorfismos		
		197	451	635
Dog Clone 27	Promastigota	T	C	G
Dog 2 Clone 49	Amastigota	T	C	G
Dog 2 Clone 4	Amastigota	C	C	G
Dog Clone 44	Promastigota	T	T	A

Tabela 50: Classe 49 de Minicírculos

Amostras	Formas de Vida	Polimorfismos		
		677	694	718
Dog Clone 43	Promastigota	-	-	-
Human Clone 6	Promastigota	A	A	G

Tabela 51: Classe 50 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos
Human Clone 2	Promastigota	-
Human Clone 3	Promastigota	-

Tabela 52: Classe 51 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos	
		453	700
Dog 2 Clone 17	Amastigota	T	C
Dog Clone 22	Promastigota	C	T

Tabela 53: Classe 52 de Minicírculos

Amostras	Forma de Vida	Polimorfismos					
		127	360	517	667	680	708
Dog 3 Clone 22	Amastigota	G	T	G	A	G	C
Dog 3 Clone 25	Amastigota	A	C	A	-	-	T

Tabela 54: Classe 53 de Minicírculos

Amostras	Formas de Vida	Polimorfismos											
		30	171	203	276	325	389	489	517	521	639	678	679
Dog Clone 5	Promastigota	T	T	C	A	T	A	C	A	A	G	C	T
Dog Clone 24	Promastigota	T	T	C	A	T	A	C	A	A	G	C	T
Dog Clone 48	Promastigota	T	T	C	A	T	G	C	A	A	G	C	T
Dog Clone 49	Promastigota	T	T	C	A	T	A	C	A	A	G	C	C
Dog Clone 23	Promastigota	T	T	C	A	T	G	C	A	A	G	C	C
Dog 2 Clone 1	Amastigota	T	T	C	A	T	G	C	A	A	G	C	C
Dog 2 Clone 9	Amastigota	T	T	C	G	T	G	C	A	A	G	C	C
MS2 Clone 24	Promastigota	T	T	C	G	T	G	C	A	A	G	C	C
MS2 Clone 28	Promastigota	T	T	C	G	T	G	C	A	A	G	C	C
MS2 Clone 64	Promastigota	T	T	C	G	T	G	C	A	A	G	C	C

MS3 Clone 1	Promastigota	A	C	T	G	C	G	T	C	G	A	T	C
MS3 Clone 14	Promastigota	A	C	T	G	C	G	T	C	G	A	T	C
MS3 Clone 3	Promastigota	A	C	T	G	C	G	T	C	G	A	T	C
MS3 Clone 11	Promastigota	A	C	T	G	C	G	T	C	G	A	T	C