



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLGIA



**DIVERSIDADE GENÔMICA DE *Leishmania infantum* ISOLADOS DE
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS NO MUNICÍPIO DE
JANUÁRIA, MINAS GERAIS, BRASIL**

Ramon Vieira Nunes

Belo Horizonte
2020

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Diversidade genômica de *Leishmania infantum* isolados de cães
naturalmente infectados no município de Januária, Minas Gerais, Brasil**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Aluno: Ramon Vieira Nunes

Orientadora: Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Co-Orientadora: Daniella Castanheira Bartholomeu

Belo Horizonte

2020

043

Nunes, Ramon Vieira.

Diversidade genômica de *Leishmania infantum* isolados de cães naturalmente infectados no município de Januária, Minas Gerais, Brasil [manuscrito] / Ramon Vieira Nunes. – 2020.

103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dra. Héli da Monteiro de Andrade. Coorientadora: Daniella Castanheira Bartholomeu.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. *Leishmania infantum*. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Cães. 4. Sequenciamento Completo do Genoma. 5. Variação Genética. Andrade, Héli da Monteiro de. II. : Bartholomeu, Daniella Castanheira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Ramon Vieira Nunes

Às quatorze horas do dia 29 de setembro do ano de 2020, reuniu-se, por videoconferência, sala

<https://meet.google.com/vjb-uokr-cek>, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Diversidade genômica de *Leshmania infantum* isolados de cães naturalmente infectados no Município de Januária, Minas Gerais, Brasil, área de concentração: Protozoologia.** Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Héliida Monteiro de Andrade**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Héliida Monteiro de Andrade	UFMG	APROVADO
Dr. Alexandre Barbosa Reis	UFOP	APROVADO
Dra. Patrícia Flavia Quaresma	UFSC	APROVADO
Dr. João Luís Reis Cunha	UFMG	APROVADO
Dr. Maurício Roberto Viana Santana	UFMG	APROVADO
Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu	UFMG	APROVADO

Expedição do resultado final.**CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO O CANDIDATO:**

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Transmitidas ao candidato

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 29 de setembro de 2020.

Dra. Héliida Monteiro de Andrade

(Orientadora)

Dr. Alexandre Barbosa Reis

Dra. Patrícia Flavia Quaresma

Dr. João Luís Reis Cunha

Dr. Maurício Roberto Viana Santana

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

(Coordenadora)



Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu
Coordenadora do PPGPAR

Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador

Ata-Covid19-período isolamento social

Virtude não é flor ornamental. É fruto abençoado do esforço próprio que devemos usar e engrandecer no momento oportuno. Se desejamos construí-la, em nossos corações, é imprescindível não nos acovardemos diante das oportunidades que o mundo nos oferece.

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Lableish, constituído das mais distintas e sofisticadas individualidades. Quanto potencial, quantas pessoas lindas e inteligentes!!! Meu ingresso na UFMG proporcionou-me inúmeras e gratas oportunidades e descobertas; por mais que abusasse da criatividade, jamais poderia imaginar que teria sido assim, ledor engano, medíocres os meus planos, a vida me surpreendera grandiosamente, conduzindo-me ao Lableish e naturalmente à minha estimada orientadora, Héliida Andrade. Obrigado por me acolher com tanto carinho. Saiba que fostes bem mais que eximia orientadora, que ofertastes o seu conhecimento, tempo e amizade. Quanta coisa aprendi contigo e como sinto gratidão a Deus e a vida em tê-la colocado em meu caminho. Associo a ti a inestimáveis ganhos ao longo dos últimos anos, que agora fazem parte de mim e ainda contribuem para que eu me orgulhe e defenda com mais afinco o acesso Universal e as inesgotáveis benesses advindas da Universidade Pública Brasileira! Obrigado pelos mimos constantes, pelo incentivo, refeições, espumantes, cafés, chocolates, chás, sobremesas... Obrigado lindona!!!

Ao maestro das Leishmanias e tarefas de campo, Dr. João Carlos França-Silva, quão enriquecedoras foram as viagens e conversas sobre a vida ou experiências no campo. Obrigado meu amigo!! Sem você, não seria possível!!! Grato a querida Lúcia Faria, que me ensinou que mesmo as tarefas mais rudes podem ser realizadas com carinho e amor!!! Você foi um grande presente!!!

Grato Dra. Jordana Celeste, por partilhar a fácil vivência diária no trabalho e o pacífico convívio no lar!!! Sinto-me honrado pelo prazer de sua companhia!!

Grato Dra. Ivana Rocha, pela acolhida e convívio com tantos sorrisos sutis e diálogos constutivos!!! Partistes e deixastes uma imensa saudade!!!

Grato Drizinha, por ser essa imensidão de ser humano que és, espontaneamente ensinas resiliência e humildade, como é bom conviver com pessoas transparentes e empáticas!!

Grato a querida Dra. Angélica!!! Que grande presente é desfrutar do prazer de sua doce companhia, que esbanja força de vontade e coragem!!!

Grato Dra. Simone Pieres, por sempre partilhar seu grande conhecimento de modo tão solícito e esclarecedor, pelas boas conversas e risadas.

Grato Valérias, Helô e Thaísa pelas conversas e boas risadas!! Grato a Elaine e as ICs, Bruna e Thábata , por estarem sempre contribuindo com todos!!!

Grato Dra. Patrícia Quaresma, por auxiliar nos primeiros passos da vida científica com tanta maturidade e perícia, mão que ajudam jamais são esquecidas e nutrem nossa gratidão e admiração!!

Grato estimado Dr. Eduardo Sérgio, pela agradável convivência e pela oportunidade de iniciar-me na vida científica em um ambiente tão pacífico.

Grato a minha co-orientadora Daniella Bartholomeu e a Jennifer Ottino por compartilharem comigo sua experiência e pelo auxílio técnico no processamento dos genomas.

Mamaezinha, como expressar minha gratidão por palavras? Estivestes ao meu ao meu lado desde o princípio, observando os primeiros passos e palavras, educando-me com dedicação e cuidado e nutrindo-me com carinho e ternura. Não há um dia sequer que não receba sua visita em meus pensamentos, lembranças e orações e como isso me faz bem!!! Você se faz presente em mim, a amo imensamente e rogo para que Deus a envolva sempre em vibrações de paz e esperanças!!! Estaremos sempre Juntos!!!

Grato Papai, por sempre trabalhar por nós, por lutar por mim, por ter me apresentado tantos esportes e atividades edificantes ao longa da infância e *por estar sempre lá naquele cantinho* do campo ou da quadra vendo seu filhinho jogar rrsr!! Obrigado por me fazer acreditar que nossa casa poderia desabar mas que nada me aconteceria, pois proteger-me-ia entre os seus braços. Sempre estivestes presente, renunciando a ti mesmo por nós!!! Te amo muito, papai!!

Ao meu amado irmão Saymon, as divergências a cada dia se dissipam mais, o respeito e o carinho tem se tornado cada dia mais intenso!!! Tenho muito orgulho do irmão honesto e idôneo que tenho!!! Te amo maninho!!

Grato as queridas tias Marilza, Alessandra, Decemília, que expandiram o meu raciocínio sobre o conceito família. Amo muito vocês!!! Grato Paulita, pela estimada aproximação que tivemos nos últimos anos, pela conviência fácil e pacífica!!! Saudades eternas das longas conversas e aprendizados que tivemos juntos!! Dayana, Clarinha, Edu, Rondo e Juju vocês só trouxeram felicidade, meus priminhos/irmãos.

Grato amado vovozinho, Pedro Neca, minha prova viva de que o trabalho dignifica o homem e meu maior exemplo de humildade e integridade!! As minhas queridas avós, Marinha (*in memoriam*) e Emília (*in memóriam*), que bom seria partilhar essa conquista com vocês, resta a saudade e a certeza de um belo abraço no nosso reencontro.

Grato Silas, Maria Emília, Cíntia pela pela amizade e cumplicidade de sempre!! Enfim a toda a minha família, tios, primos!!!

Grato ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG. Aos funcionários, professores e colegas do Departamento de Parasitologia da UFMG, em especial às secretárias Sumara e Sibebe. Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Acredito que a gratidão seja um dos portais de conexão com a fonte criadora do Universo, então não há como expressar e vivenciar a gratidão sem sentir Deus!! Virtudes edificantes, tais como, gratidão caridade e humildade são nossos laços diretos com o Criador e devemos perseguir a vivências dessas sublimes sensações.

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA TESE

Laboratório de Leishmanioses – Lableish – ICB/UFMG
Departamento de Endemias e Vigilância Ambiental de Januária/MG
Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP – ICB/UFMG

ORIENTAÇÃO

Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade

CO-ORIENTAÇÃO

Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

COLABORADORES

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Laboratório de Leishmanioses – Lableish – ICB/UFMG
Dr. João Carlos França Silva

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP – ICB/UFMG
Ms. Jennifer Ottino

Departamento de Endemias e Vigilância Ambiental de Januária/MG
Adailton Viana Bitencourt

AGÊNCIAS FINANCIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa
FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose causada comumente por *Leishmania (Leishmania) infantum*, afetando no contexto urbano principalmente cães domésticos. Esses reservatórios apresentam intenso parasitismo visceral e cutâneo, o que favoreceria a infecção dos vetores. A enzootia canina, regularmente, precede a ocorrência da LV em humanos. A presente pesquisa tem os objetivos de caracterizar clinicamente os animais; diagnosticar a LVC; identificar as espécies de protozoários do gênero *Leishmania* causando LVC e caracterizar molecularmente isolados obtidos a partir de aspirados de medula óssea. O estudo foi realizado na cidade de Januária, localizada na região norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. Foram coletadas amostras de soro, fragmentos de baço, pele de orelha e aspirados de medula óssea de 100 animais infectados em dois momentos e áreas: 2017, zona urbana e 2019 zona rural. O diagnóstico foi confirmado por meio de sorologia (DPP, RIFI e ELISA) e também por PCR-ITS1 em amostras de pele, baço e medula óssea. Para identificação da espécie foi realizada a RFLP nas amostras PCR positivas. Amostras de aspirados de medula óssea foram colocados em meio de cultura NNN/LIT para obtenção de isolados. DNA dos isolados (n=27) foi extraído, purificado, amplificado e sequenciado. Todos os animais desse estudo apresentaram sinais clínicos sugestivos de LVC, cuja pontuação observada através de confecção de escore foi de 2-17 pontos (0-19), caracterizando a população amostral como clinicamente sintomática e permitindo inferências de presença de correlação com a titulação de anticorpos (RIFI). A confirmação diagnóstica de LVC foi evidenciada em 100% dos cães, em pelo menos uma das técnicas citadas. Por PCR-RFLP foi feita a identificação de *L. (L.) infantum* em 72% dos animais, não tendo sido identificada outra espécie. Foram isoladas 27 cepas, das quais 20 tiveram os genomas completos sequenciados (SGC) que foram analisados juntamente com o genoma de referência de *L. infantum* (JPCM5). Alterações de ploidia foram detectadas independente de localização (urbana ou rural) e/ou temporalidade (2017 ou 2019). Todos os genomas sequenciados exibiram polissomia do cromossomo 31, bem como, os isolados urbanos/2017 poliploida do cromossomo 23. As análises de enriquecimento funcional por GO no cromossomo 23 revelaram enriquecimentos gênicos envolvidos em processos enzimáticos de conversão de acetato em acetil-Coa mediado por AceCS para síntese de lipídeos e em degradação de Heme, importante para limitar a produção de radicais livre em macrófagos parasitados. Tanto as análises de ploidia, como de SNVs (PCA) revelaram a existência de 2 *clusters* principais: 1º) *Cluster* urbano- constituído de todas os genomas urbanos isolados em 2017; 2º) *Cluster* rural: formado por todas as cepas rurais isoladas em 2019. Análises de SNVs evidenciaram entre 814 e 987 variantes em cada genoma e 99,99% de identidade entre os 20 genomas. Em suma, os 2 *clusters* principais formados foram caracterizados por temporalidade ou ano de coleta das espécimes clínicas (2017 e 2019) e/ou localização geográfica (urbana e rural), sendo o primeiro *cluster*, urbano/2017 e o segundo rural/2019, sugerindo interferências espaciais e/ou temporais nos processos evolutivos genômicos desse organismo.

Palavras-chave: *L. (L.) infantum*. Leishmaniose visceral canina. *Leishmania infantum* genome. Sequenciamento de genoma completo (SCG). Diversidade genética intra-especies.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonosis commonly caused by *Leishmania (Leishmania) infantum*, affecting mainly domestic dogs in the urban context. These hosts have intense visceral and cutaneous parasitism, which would facilitate infection of the vectors. Canine enzooty regularly precedes the occurrence of VL in humans. The present research aims to clinically characterize the animals; diagnose CVL; to identify the protozoan species of the genus *Leishmania* causing CVL and to characterize molecularly isolates obtained from bone marrow aspirates. The study was carried out in the city of Januária, located in the northern region of the State of Minas Gerais, Brazil. Serum samples, spleen fragments, ear skin and bone marrow aspirates were collected from 100 infected animals in two moments and areas: 2017 urban area and 2019 rural area. The diagnosis was confirmed by serology (DPP, RIFI and ELISA) and also by PCR-ITS1 in samples of skin, spleen and bone marrow. For species identification, RFLP was performed on PCR positive samples. Samples of bone marrow aspirates were placed in NNN / LIT culture medium to obtain isolates. DNA from the isolates (n = 27) was extracted, purified, amplified and sequenced. All animals in this study showed clinical signs suggestive of CVL, that the score observed was 2-17 points (0-19), characterizing the sample population as clinically symptomatic and allowing inferences of correlation with antibody titers (RIFI). The diagnostic confirmation of CVL was evidenced in 100% of the dogs, in at least one of the techniques mentioned. By PCR-RFLP, *L. (L.) infantum* was identified in 72% of the animals, with no other species identified. 27 strains were isolated, of which 20 had the sequenced genomes that were analyzed together with the reference genome of *L. infantum* (JPCM5). Ploidy alteration were detected regardless of location (urban or rural) and / or temporality (2017 or 2019). All sequenced genomes exhibited polysomy of chromosome 31, as well as urban isolates / 2017 polyploid of chromosome 23. Analyzes of functional enrichment by GO revealed gene enrichments involved in enzymatic processes of conversion of acetate to acetyl-Coa mediated by AceCS for lipid synthesis (Figure 13) and Heme degradation, to limit the production of free radicals in macrophages parasitized. Both ploidy and SNVs (PCA) analyzes revealed the existence of 2 main clusters: 1st) Urban cluster - consisting of all urban genomes isolated in 2017; 2 °) Rural cluster: formed by all isolated rural strains in 2019. Analysis of SNVs showed between 814 and 987 variants in each genome and 99.99% identity among the 20 genomes. In short, the 2 main clusters formed were characterized by temporality or year of collection of clinical specimens (2017 and 2019) and / or geographic location (urban and rural), with the first cluster, urbano / 2017 and the second rural / 2019, suggesting spatial and / or temporal interferences in the genomic evolutionary processes of this organism.

Keywords: *L. (L.) infantum*. Canine visceral leishmaniasis. *Leishmania infantum* genome. Complete genome sequencing (SCG). Intra-species genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma do desenho experimental. Os cães selecionados foram examinados clinicamente e também realizadas coletas de espécimes clínicos de diferentes tecidos que foram submetidas a análises por diferentes métodos	37
Figura 2	Mapa do Brasil e a localização do Estado de Minas Gerais (azul-a direita). Mapa do Estado de Minas Gerais e a localização do município de Januária (verde claro- a esquerda), bem como, toda sua delimitação territorial e divisão distrital (verde claro, mapa inferior).....	38
Figura 3	Camioneta e carrocinha utilizadas na busca de animais clinicamente sugestivos ou infectados por <i>Leishmania</i> (superior esquerda). Local improvisado para coleta das espécimes clínicas (superior direita). Realização de anamnese em cães imobilizados para preenchimento da ficha clínica (inferior).....	40
Figura 4	Busca ativa, anamnese e seleção de animais com clínica sugestiva para LVC, nos distritos rurais do município de Januária, Minas Gerais.....	40
Figura 5	Heatmap com a distribuição dos principais sinais clínicos evidenciados na população amostral canina. Na escala de cores o preto representa a normalidade, ausência do sinal clínico; o azul, anormalidade, presença e o verde, anormalidade, presença acentuada.....	51
Figura 6	Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento de soropositividade (esquerda) e soronegatividade (direita) entre os resultados das técnicas de DPP, RIFI e ELISA.....	59
Figura 7	Diagrama de Venn evidenciando o partilhamento de positividade e negatividade nos resultados das técnicas de DPP, RIFI, ELISA e PCR.....	62
Figura 8	Gél de poliacrilamida 6%, corados por prata com a PCR-RFLP, perfis de restrição do fragmento de ITS1 (enzima <i>HaeIII</i>). PM - marcador de peso molecular de 50 pb; 01P a 31P – amostras de fragmento de pele; La – <i>Leishmania amazonensis</i> (IFLA/BR/1967/PH8); Li – <i>Leishmania infantum</i> (MCAN/BR/2000/BH400); CN – controle negativo.....	62
Figura 9:	Localização geográfica dos 27 isolados. A- Mapa do município de Januária com suas divisões distritais, bem como a localização dos isolados urbanos/2017 (círculos) e rurais/2019 (triângulos). B- Identificação e localização dos isolados urbanos (círculos) e do distrito rural de Brejo de Amparo (triângulos). C- Identificação e	

	localização dos isolados do distrito rural do Tejuco (triângulo). D- Identificação e localização dos isolados do distrito rural de Levinópolis (triângulos).....	64
Figura 10	Representações gráficas das avaliações de qualidade das <i>reads</i> sequenciadas, originadas através das análises de FastQC. Qualidade de sequenciamento por bases sequenciadas (à esquerda) e escore da distribuição da qualidade das sequências/ <i>reads</i> (à direita), representando um genoma/isolado.....	65
Figura 11	Estimativa de CCNV em isolados representativos de Januária. O eixo <i>x</i> refere-se aos 36 cromossomos do genoma de <i>L. infantum</i> (1-36) e o eixo <i>y</i> ao número de cópias cromossômicas. O traço em vermelho simboliza a mediana de ploidias para cada um dos isolados. Gráficos J10 e J34 representam isolados urbanos/2017; e J76 e J99 cepas rurais/2019.....	66
Figura 12	<i>Heatmap</i> com distribuição de CCNV de todos os isolados, diferentes localidades-temporalidade (urbano/2017 – rural/2019). Os isolados estão representados no eixo <i>x</i> e os cromossomos (1-36) no eixo <i>y</i> . No eixo <i>X</i> os isolados urbanos/2017 são representados em vermelho e os rurais/2019 em preto. A estimativa de variação de cópias cromossômicas para cada um deles estão apresentados por intensidade de cor que varia de azul, menor número de cópias, a vermelho, que representa um maior número de cópias.....	68
Figura 13	Análise de SNVs e divergência genética dos isolados. Cada círculo colorido refere-se a um isolado, conforme identificado na legenda à direita. Os eixos <i>x</i> e <i>y</i> representam a distância genética entre os isolados. O ponto rosa equivale ao genoma de referência de <i>L. infantum</i> JPCM5, proveniente de Madrid (1998), Espanha. Os isolados urbanos/2017 e os rurais/2019 encontra-se entre as elipses vermelhas e azul respectivamente.....	71
Figura 14	Árvore filogenética baseada nos SNVs divergentes identificados nos estudos de GATK. Os genomas dos isolados urbanos/2017 estão em vermelho e os rurais/2019 em azul. O ramo preto equivale ao genoma de referência de <i>L. infantum</i> JPCM5	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos cães (N=100) em relação ao gênero, localização geográfica, porte e tipo de pelagem.....	51
Tabela 2	Tabulação e confecção de “Escore clínico” da população canina..	53
Tabela 3	Resultado dos testes sorológicos de DPP, ELISA e titulação dos anticorpos (RIFI) dos cães infectados.....	57
Tabela 4	Análise de Coeficiente Kappa dos testes sorológicos.....	60
Tabela 5	PCR-ITS1 de aspirados de medula óssea, fragmentos de pele de orelha e baço.....	60
Tabela 6	Identificação, data e área de coleta das amostras.....	63
Tabela 7	Número de <i>reads</i> sequenciadas e mapeadas no genoma de referência.....	65
Tabela 8	Resultado da Análise de Enriquecimento por Ontologia Gênica (GO) do Cromossomo 23.....	69
Tabela 9	Número de SNVs evidenciados no genoma de cada isolado em relação à cepa referência JPCM5.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ch	Cromossomo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	Teste rápido <i>Dual Path Platform</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
IgG	Imunoglobulina G
iRNA	Ácido ribonucleico de interferência
ITS	Espaçador transcrito interno
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MLEE	Eletroforese de enzimas multilocus
MLMT	Tipagem de microssatélites multilocus
MLSA	Análise de sequencias multilocus
MLST	Tipagem de sequências multilocus
MS	Ministério da Saúde
NM	Novo mundo
Pb	pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	espécies de oxigênio reativos
Sb	Antimônio/antimoniato – Sbr / Sbs (resistente / sensível)
SbIII	Antimoniato trivalente
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	Ácido ribonucleico de interferência pequeno
SNP/SNV	Polimorfismo ou Variante de nucleotídeo único
SSG	Estibogluconato de sódio

VM Velho Mundo
CCNV Variações no número de cópias cromossômicas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Aspectos Gerais	15
1.2 Leishmaniose visceral.....	16
1.3 Genoma de <i>Leishmania</i>	18
1.4 Caracterização e variabilidade genética de <i>Leishmania</i>	22
1.4.1 Eletroforese de enzimas multilocus (MLEE).....	23
1.4.2 Reação em cadeia polimerase (PCR) e polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP).....	24
1.4.3 Tipagem microssatélites multilocus (MLMT)	25
1.4.4 Tipagem de sequências multilocus (MLST) e/ou análise de sequência multilocus (MLSA)	26
1.5 Genômica comparativa	28
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Área de estudo	36
3.2 Considerações éticas e critérios de inclusão	38
3.3 Obtenção de dados clínicos e amostras.....	38
3.4 Testes sorológicos.....	41
3.4.1 Teste de imunocromatografia rápida para LVC.....	41
3.4.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	41
3.4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	42
3.5 Isolamento em cultura.....	43
3.6 PCR-RFLP do ITS1	43
3.7 Análises estatísticas	44
3.8 Sequenciamento e montagem do genoma.....	45

3.8.1	Processamento e mapeamento de <i>reads</i> de espécies de <i>Leishmania</i> contra genoma de referência	46
3.8.2	Estimativa de ploidia cromossomal de cada isolado de <i>L. infantum</i>	46
3.8.3	Análise de Enriquecimento por Ontologia Gênica (GO) de Cromossomo com ploidia aumentada	47
3.8.4	Dendograma de clusterização.....	47
3.8.5	Análise variância de nucleotídeo único (SNVs)	47
3.8.6	Análises filogenéticas.....	48
4	RESULTADOS	49
4.1	Dados Epidemiológicos	49
4.2	Diagnóstico sorológico	56
4.3	Diagnóstico molecular e identificação de espécies circulantes	59
4.4	Sequenciamento e montagem do genoma.....	63
4.4.1	Análise das <i>reads</i> e percentagem das <i>reads</i> mapeadas	63
4.4.2	Variação do número de cópias cromossômicas (CCNV).....	65
4.4.3	Análises de SNVs e a divergência genética	68
5	DISCUSSÃO	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
7	PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8	TABELA SUPLEMENTAR	99
	Tabela suplementar 1: Processos biológicos enriquecidos no cromossomo 23.....	99
9	ANEXOS	100
	Anexo I: Termo de esclarecimento e livre consentimento. Termo de doação e Declaração	100
	Anexo II: Leishmaniose Visceral Canina: Ficha Clínica Canina	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

As leishmanioses caracterizam-se por um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (*L.*), ordem Kinetoplastida (Shaw JJ, 1994) e transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (VM) e *Lutzomyia* (*Lu*) no Novo Mundo (NM) (Young & Duncan *et al.*, 1994; Desjeux, 1996; Desjeux, 2001; Galati *et al.*, 2003).

Os patógenos do gênero *Leishmania* podem ser divididos em dois principais subgêneros: *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Leishmania*), segregação realizada principalmente, considerando-se o local de colonização e desenvolvimento do parasito no intestino do vetor. O subgênero *Leishmania* (*Viannia*) tem ocorrência restrita ao NM e o parasito migra inicialmente para a porção posterior (peripilária) do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado. O subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) é encontrado no VM e NM e a colonização se estabelece nas porções média e anterior (suprapilária) do tubo digestivo do hospedeiro invertebrado (Lainson & Shaw, 1987).

As leishmanioses apresentam duas fontes de infecção para humanos: zoonótica onde os hospedeiros são animais domésticos, sinantrópicos e/ou silvestres e; antroponótica onde o reservatório é o próprio ser humano (WHO, 2010).

Esses microrganismos possuem duas formas evolutivas principais, sendo as promastigotas formas longas, flageladas, encontradas no tubo digestivo de flebotomíneos e em meios de culturas e as formas amastigotas arredondados ou fusiformes, intracelulares, com flagelo interiorizado que se desenvolvem no fagossomos de macrófagos de mamíferos (Herwaldt, 1999).

O gênero é constituído por organismos heterogenéticos morfologicamente indistinguíveis, que multiplicam-se por fissão binária longitudinal e são transmitidos aos vertebrados durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) infectadas. Estas ao realizarem repasto sanguíneo em vertebrados, regurgitam gel secretado por promastigotas e saliva contendo formas promastigotas metacíclicas, que serão fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário. Ocorre então formação do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciarão em amastigotas intracelulares que multiplicam-se sucessivamente até o rompimento da célula infectada, liberando os parasitos que serão

fagocitados novamente, dando continuidade ao ciclo. Ao picar vertebrados infectados, as fêmeas do hospedeiro invertebrado ingerem monócitos juntamente com amastigotas e no trato digestivo, em pouco tempo, se diferenciam em promastigotas flageladas (movimentação ou fixação). Algumas promastigotas sofrem um processo denominado metaciclogênese dando origem as formas infectantes, as promastigotas metacíclicas (Lainson & Shaw 1978; Ashford, 2000). Recentemente, foi demonstrado que no flebotomíneo já infectado por *Leishmania* a ingestão de um segundo repasto de sangue não infectado desencadeia a desdiferenciação de promastigotas metacíclicas, estágio até então considerado terminalmente diferenciado dentro do vetor. Estas formas se transformam em um estágio semelhante ao leptomonado, denominado promastigota retroleptomonado. A metaciclogênese reversa ocorre após cada repasto sanguíneo subsequente, em que promastigotas de retroleptomonados se multiplicam rapidamente e se diferenciam para promastigotas metacíclicas, aumentando a infecciosidade do flebotomíneo. Esses achados colocam fontes de sangue prontamente disponíveis como um elemento crítico na transmissão e propagação de patógenos transmitidos por vetores (Serafim *et al.*, 2018).

Clinicamente as leishmanioses são classificadas como leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A forma tegumentar pode ser subdividida em leishmaniose cutânea, leishmaniose cutâneo mucosa, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose dérmica pós-calazar e leishmaniose cutâneo disseminada (WHO, 2010). O amplo espectro de manifestações é determinado pela espécie e peculiaridades do parasito (infecciosidade, patogenicidade e virulência) associadas a características intrínsecas dos hospedeiros vertebrados, onde destaca-se a resposta imune (Murray *et al.*, 2005).

1.2 Leishmaniose visceral

A LV é uma doença infecciosa causada por espécies do “complexo donovani”, atualmente formado por *L. donovani* e *L. infantum* (Maurício *et al.*, 2000, Lukes *et al.*, 2007; Kuhls *et al.*, 2011) que podem ser, se não tratada, a forma mais grave desse amplo espectro de doenças (Desjeux, 2001). As espécies *L. tropica* no oriente médio e *L. amazonensis* na América do Sul ocasionalmente podem ser encontradas nas vísceras, produzindo as manifestações viscerais (Murray *et al.*, 2005).

Nas Américas a LV é transmitida pela picada de fêmeas infectadas de *Lutzomyia longipalpis*, sendo o vetor encontrado tanto no ambiente silvestre como no peridomicílio (galinheiros e outros abrigos de animais) (Lainson & Rangel, 2005). No Brasil, determinados

focos de transmissão delimitados e restritos já levantaram a possibilidade de envolvimento de outras espécies de flebotomíneos, tais como, *Lu. cruzi* no estado de Mato Grosso do Sul (Santos *et al.*, 1998) e *Lu. migonei* no estado de Pernambuco (Carvalho *et al.*, 2010). Embora raro, a transmissão via sangue (agulhas compartilhadas, transfusão, disseminação transplacentária) ou transplante de órgãos é possível (Murray *et al.*, 2005).

Clinicamente pode apresentar-se de forma assintomática (subclínica), aguda, subaguda ou crônica, após períodos de incubação bastante variáveis (semanas a meses), sendo febre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, os sintomas e sinais mais comumente pronunciados (Badaro *et al.*, 1986; Desjeux, 1996).

A LV é endêmica em mais de 70 países, onde mais de 200 milhões de pessoas estão em risco de contraí-la, com uma incidência estimada de 200.000 a 400.000 novos casos todos os anos, acarretando a morte de 20.000 a 40.000 pessoas/ano, afetando principalmente as populações mais vulneráveis e sendo superada em número de mortes anuais apenas pela malária, dentre as doenças parasitárias. Mais de 90% casos concentram-se em apenas sete países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil (WHO, 2013). Na América Latina e Europa, onde é causada pela *L. infantum*, comporta-se como zoonose (Roque & Jansen, 2014). No Brasil é definida como doença emergente e reemergente em franca expansão geográfica devido a alterações ambientais, migrações humanas e urbanização (Desjeux, 2001).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório de *L. infantum* e por consequente, principal fonte de infecção para flebotomíneos vetores matendo o parasito em estreito contato com seres humanos em áreas urbanas (Lainson *et al.*, 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005; MS, 2013; MS, 2017), sendo essa informação confirmada pela identificação de perfis de microssatélites idênticos entre os isolados humanos e caninos de diferentes focos em diversos estados brasileiros (Kuhls *et al.*, 2011). Esses animais apresentam intenso parasitismo cutâneo e visceral, o que facilitaria a infecção dos vetores (Molina *et al.*, 1994; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001, Reis *et al.*, 2006) e a enzootia canina regularmente precede a ocorrência dos casos humanos (Gavvani *et al.*, 2002), sendo a doença animal mais prevalente que a humana. Alguns animais silvestres, como as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*), os marsupiais (*Didelphis albiventris*) e algumas espécies de roedores, como os ratos domésticos também podem comportar-se como reservatórios (Lainson *et al.*, 2005; MS, 2013; MS, 2017). Análises de microssatélites também não segregaram

genótipos oriundos de animais silvestres, como raposas e marsupiais dos grupos humanos (Kuhls *et al.*, 2011).

A leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta amplo espectro clínico e pode se pronunciar através de quadros assintomáticos, oligossintomáticos (lesões discretas) ou sintomáticos com uma vasta gama de sinais, tais como, emagrecimento, linfopatia, opacidade de pelos, úlceras na ponta das orelhas, dermatites, alopecia, hepatoesplenomegalia, onicogribose, entre outros (Mancianti *et al.*, 1988).

O Ministério da Saúde (MS) através da Nota Técnica Conjunta 01/2011 define que o diagnóstico da LVC deve ser baseado no teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform (TR-DPP ou DPP) para triagem, seguido de confirmação pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) (MS, 2011).

O tratamento de cães estava proibido pela Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de Julho de 2008, que condenava o uso de drogas comumente disponíveis e utilizadas nos casos humanos da doença ou sem registros no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Tal proibição impossibilitava a intervenção medicamentosa desses animais, devido principalmente ao risco de seleção de cepas resistentes do protozoário (MS & MAPA, 2008). Posteriormente a Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS registra o fármaco Miltefosina, permitindo seu uso no tratamento animal, uma vez que, no Brasil essa droga não é utilizada em esquemas terapêuticos humanos (MS & MAPA, 2016).

1.3 Genoma de *Leishmania*

O genoma de protozoários do gênero *Leishmania* é constituído por ácido desoxirribonucleico (DNA) cromossômico e epissômico dispostos no núcleo celular e por DNA do cinetoplasto (kDNA) que se replica de forma independente. Os cromossomos podem apresentar-se em arranjos monossômicos, dissômicos ou polissômicos (Lighthall & Giannini, 1992) e não se condensam fortemente em nenhuma etapa do ciclo de vida (Lighthall & Giannini, 1992; Wincker *et al.*, 1996).

No VM os principais patógenos humanos do gênero (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*) apresentaram cariótipos com 36 cromossomos bastante conservados (mesma sonda de DNA se ligando a locais idênticos em cromossomos de diferentes espécies). No NM, *L. (L.) mexicana* possui 34 cromossomos e apresentam eventos de fusão entre cromossomos 8 e 29, 20 e 36 (McDonagh *et al.*, 2000).

O primeiro sequenciamento completo de genoma publicamente disponibilizado foi o de *L. major* (cepa Friedlin) evidenciando genoma com aproximadamente 33 milhões de pares de bases (pb) distribuídos em 36 cromossomos, onde situam-se mais de 8000 genes codificadores de proteínas, 39-41 pseudogenes (Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007). E 910 genes codificadores de proteínas exclusivos no gênero *Leishmania*, distribuídos aleatoriamente no genoma e não apresentando ortólogos com *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005).

Embora estimativas indiquem que a separação entre os subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* tenha ocorrido há 20-100 milhões de anos (Momen & Cupolillo, 2000; Peacock *et al.*, 2007), as análises e comparações dos genomas de três espécies: *L.(L.) infantum*, *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) major* demonstram alto grau de sintenia (maior que 99% dos genes) e similaridade, com a elevada conservação estendendo-se para as sequências intragênicas codificadoras; raros introns spliceossômicos (Peacock *et al.*, 2007) e ausência significativa de cis-splicing (Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007). A posteriori, a comparação de sequências genômicas de *L. major* (Friedlin), *L. infantum* (JPCM5), *L. braziliensis* (M2904) e *L. tarentolae* (não patogênica em humanos), corroboraram e tornaram ainda mais evidentes a elevada sintenia gênica, sendo encontrados valores superiores a 90% de genes compartilhados entre as espécies (Raymond *et al.*, 2012). A sintenia (99%) sugere um número reduzido de genes específicos envolvidos na patogênese diferencial e tropismo parasitário (Peacock *et al.*, 2007).

Concomitantemente, os genomas de *L. (L.) mexicana* (cepa U1103), *L.(V.) braziliensis* (M2904) e *L.(L.) infantum* (JPCM5) evidenciaram o partilhamento de 7392 genes e número significativamente pequeno de genes espécie-específico. Os genes exclusivos (19 genes) das espécies *L.(L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (complexo *donovani*) associados a componentes estruturais e funcionais do genoma, como o número de cópias desses genes e expressão gênica diferencial, possivelmente estão envolvidos no processo de visceralização dessas espécies (Depledge *et al.*, 2009; Rogers *et al.*, 2011).

O reduzido número de genes espécie-específicos (citam-se apenas 26 em *L. infantum*) estão distribuídos ao longo dos cromossomos, diferentemente de outras cinetoplastídeos onde os genes exclusivos encontram-se concentrados nas regiões subteloméricas ou nos pontos de interrupção (*breakpoint*) entre as unidades de transcrição policistrônica. A ínfima existência de genes restritos a uma mesma espécie é um achado inesperado, principalmente quando comparado a outros protozoários, como plasmódio (Peacock *et al.*, 2007).

Os parasitos do gênero *Leishmania* se desenvolvem em ambientes bastante distintos (vertebrados e invertebrados), sendo fundamentais alterações na expressão gênica para viabilizar essas intensas mudanças e adaptações (Brems *et al.*, 2005). Na ausência de atividade reguladora do promotor, esses parasitos aumentam seus níveis de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) através das duplicações gênicas muitas vezes *in tandem*, podendo gerar matrizes multicópias de genes idênticos ou quase idênticos e/ou através da formação de cromossomos supranumerários. Na presença de cromossomos supranumerários, onde uma maior expressão de determinado gene pode ser prejudicial ao desenvolvimento do parasito, a regulação pode ser pelo aumento na degradação do mRNA (Rogers *et al.*, 2011), uma vez que, foram encontrados nos *Trityps* (*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*) homólogos dos complexos de deadenilação, duas proteínas de ligação Poli(A), uma *helicase* e as exonucleases necessárias para destruir mRNAs (Ivens *et al.*, 2005). O aumento do número de cópias gênicas parece associado à modulação da expressão gênica em resposta a exposição aos estímulos e ambientes distintos (Downing *et al.*, 2011), bem com estaria associada a evolução do parasitismo (Jackson, 2007).

Estudos com amastigotas de *L. major* (lesão de patela), *L. infantum* (baço) e *L. braziliensis* (macrófagos RAW 264.7) revelaram que um reduzido número de genes seriam transcritos (nível mRNA) ou reguladas diferencialmente durante os distintos estágios de vida do parasito, sugerindo que as amastigotas são pré-adaptadas para a sobrevivência intracelular, sofrendo ínfima modulação dinâmica da expressão gênica no nível do mRNA. Além disso, a pressão da resposta imune do hospedeiro parece ter efeito restrito na dinâmica da expressão gênica no nível da transcrição, embora comprometa a disseminação e sobrevivência do parasito nas vísceras (Goldman *et al.*, 1998; Depledge *et al.*, 2009).

As janelas abertas de leitura (ORFs) são arrançadas em longas unidades de transcrição policistrônicas (Martinez-Calvillo *et al.*, 2003; Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007), sendo a transcrição impulsionadas pela RNA polimerase II e os transcritos processados por "trans-splicing" e poliadenilados, originando mRNAs monocistrônicos formados durante o processamento pós-transcricional (Martinez-Calvillo *et al.*, 2003; El-Sayed *et al.*, 2005), sustentando a afirmação de que a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorra no nível pós-transcricional (Martinez-Calvillo *et al.*, 2003; Ivens *et al.*, 2005; Clayton & Shapira, 2007). Outros mecanismos que fortalecem as evidências do controle pós-transcricional são o processamento e a estabilidade do mRNA, a eficiência na tradução, a estabilidade das proteínas (Clayton & Shapira, 2007) e a presença abundante de proteínas de ligação ao RNA

codificadas nos genomas (Ivens *et al.*, 2005). Inexistem elementos convencionais do promotor da polimease II e reconhecimento específico de sequência primária para iniciar a transcrição (Martinez-Calvillo *et al.*, 2003). Durante o *trans splicing* uma de sequência de RNA contendo 39 nucleotídeos (*Spliced leader*, SL) e um *cap* trimetil são acoplados à extremidade 5' de mRNAs que juntamente à poliadenilação na extremidade 3', exercem a função de dissecação dos transcritos policistrônicos (Agabian, 1990; Liang *et al.*, 2003). Os diferentes mRNAs monicistrônicos podem apresentar diferentes cinéticas de estabilidade sendo degradados por endonucleases que promovem especialmente a de-adenilação (Clayton & Shapira, 2007).

Em muitos organismos eucariotos os elementos retrotransponíveis podem ser regulados através do silenciamento de RNA, como o RNA de interferência (Peacock *et al.*, 2007). O RNA de interferência (iRNA) ou silenciamento de genes regula a expressão gênica a nível pós-transcricional e confere resistência aos ácidos nucléicos derivados de patógenos (Hannon, 2002). Sucintamente, a inserção celular de RNA dupla fita (dsRNA) sinaliza atividade gênica indesejada, ativando a nucleasse Dicer, que cliva o dsRNA em fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos (Elbashir *et al.*, 2001) formando os pequenos RNA de interferência (siRNA). A interação de proteínas intracelulares com os siRNAs dão origem a um complexo multimérico denominado “RNA Interference Specificity Complex” e/ou RISC. Posteriormente, a dupla fita de siRNA é desnaturada por helicases presentes no RISC e a fita antisense guia o complexo em direção ao mRNA de interesse (Nykanen *et al.*, 2001). Finalmente, uma endorribonuclease constituinte do complexo degrada o mRNA alvo. A família de proteínas Argonauta medeiam o reconhecimento do mRNA e o silenciamento, sendo componentes fundamentais do RISC (Meister & Tuschl, 2004).

Análises de regiões sintênicas do cromossomo 11 de *L. major* e *L. infantum* evidenciaram genes remanescentes da argonauta (AGO1), sugerindo perda da maquinaria RNAi no subgênero *L. (Leishmania)*. A única espécie constituída de genes possivelmente envolvidos nessa maquinaria seria *L. (V.) braziliensis* que apresenta atividade da Dicer (gene LbrM23_V2.0390), além da presença de ortólogos funcionais de genes da endonuclease Argonauta (TbAGO1 e TbPWI1), cuja presença também fora evidenciada em *T. brucei* (Peacock *et al.*, 2007).

O material genético em *Leishmania* exibe-se com heterogeneidade de ploidia cromossômica (monossomia, dissomia, trissomia e tetrassomia) (Cruz *et al.*, 1993; Sterkers *et al.*, 2011; Downing *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2011, Teixeira *et al.*, 2017), mesmo em clones de uma única cepa; tais variações podem afetar a quase totalidade dos cromossomos,

principalmente quando análises são realizadas em núcleos em divisão (mitose), onde distribuições cromossômicas assimétricas e instáveis tem se consolidado como constitutivos nesses organismos (Sterkers *et al.*, 2011). Tais diferenças no conteúdo cromossômico de um mesmo indivíduo foram denominadas “aneuploidia em mosaico”, variações genômicas intercelulares/somáticas ou ainda mosaicismo cromossômico (Iourov *et al.*, 2008). No gênero *Leishmania* a aneuploidia ocorre com frequência, sendo bem tolerada, não existindo padrões específicos para cada espécie e emergindo durante a replicação e/ou mitose e não por recombinação sexual (Rogers *et al.*, 2011; Sterkers *et al.*, 2011). Embora essas variações no número de cromossomos sejam frequentes, a ploidia geral inclina-se à diploidia (Rogers *et al.*, 2011; Valdivia *et al.*, 2017; Reis-Cunha *et al.*, 2018).

As origens e modalidades de regulação da replicação ainda não foram caracterizadas no gênero *Leishmania*. As distribuições cromossômicas assimétricas durante a mitose podem ser originadas de erros na regulação da replicação cromossômica ou segregação, resultando em aumentos ou diminuições do número de cópias cromossômicas (Sterkers *et al.*, 2012; Reis-Cunha *et al.*, 2018).

A formação de pseudogenes parece contribuir mais significativamente para divergências genéticas no gênero, em detrimento de inserções e deleções (Peacock *et al.*, 2007) e rearranjos inter-cromossômicos não estariam associados a tal variabilidade (Lighthall & Giannini, 1992; Wincker *et al.*, 1996; Peacock *et al.*, 2007; Lypaczewski *et al.*, 2018).

1.4 Caracterização e variabilidade genética de *Leishmania*

A epidemiologia molecular e seus dados podem ser analisados através da genética populacional que exibem informações sobre a estrutura e variabilidade genética inter e intra-populações ou pela filogenética, que permite estudar a história de organismos ou populações (Tibayrenc *et al.*, 2005). O conhecimento da estrutura genética fornece informações que permitem explorar a dinâmica evolutiva e a distribuição filogenética (Boité *et al.*, 2012) e as informações sobre diversidade filogenética e estrutura populacional embasam uma taxonômica sólida e consensual que é de fundamental importância para realização de diagnósticos, prognósticos e tratamento das leishmanioses (Schönian *et al.*, 2010).

As abordagens filogenéticas e de genética de populações utilizam-se principalmente de marcadores moleculares neutros não afetados pela seleção natural, salvo estudos envolvendo fatores de virulência e resistência a drogas, que permitem o uso de marcadores não neutros.

Esses marcadores apresentam perfis discriminatórios distintos e quando muito variáveis, podem comprometer inferências sobre as relações mais distantes, negligenciando características e informações relevantes, já os marcadores com variação intermediária comprometem a realização de análises minuciosas entre cepas intimamente relacionadas (Schönian *et al.*, 2010). Entre os marcadores altamente polimórficos cita-se os microssatélites que apresentam um desempenho questionável em níveis taxonômicos (Boité *et al.*, 2012).

Muitas ferramentas e abordagens tem sido utilizadas na caracterização e análise de variabilidade genética no gênero *Leishmania*, entre elas, a restrição de minicírculos de kDNA; análises de repetições teloméricas; DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD); sequenciamento de alvos como espaçadores transcritos internos (ITS), genes codificadores e locus do mini-exon (Schönian *et al.*, 2004; Maurício *et al.*, 1999); eletroforese de enzimas multilocus (MLEE) (Rioux *et al.*, 1990); reação em cadeia polimerase (PCR) seguido de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (Tintaya *et al.*, 2004). Atualmente destacam-se a tipagem de microssatélites multilocus (MLMT); a tipagem de sequências multilocus (MLST) (Schönian *et al.*, 2004; Maurício *et al.*, 1999) e o sequenciamento do genoma completo (Downing *et al.*, 2011). O uso de RAPD para caracterizar espécies do “complexo donovani” apresentaram reprodutibilidade limitada (Schönian *et al.*, 2004; Maurício *et al.*, 1999).

1.4.1 Eletroforese de enzimas multilocus (MLEE)

Há tempos o padrão ouro para a caracterização molecular das espécies do gênero *Leishmania* é o método de MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*). Esse modelo classificatório utiliza-se de caracteres bioquímicos, mais especificamente isoenzimas e/ou aloenzimas, extraídas de culturas de promastigotas e segregadas por eletroforese. Cerca de 20 enzimas podem ser utilizadas, das quais citam-se malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (CDI), transaminase de glutamato-oxaloacetato 1 e 2, (GOT-1 e 2), manose fosfato isomerase (MPI), glicose fosfato isomerase (GPI), entre outras. O perfil eletroforético é identificado por comparação a um marcador (cepa/clone) de referência incluído sistematicamente no gel de eletroforese. As unidades taxonômicas ou zimodemas são formadas por cepas que partilham mesmo perfil migratório de isoenzimas. As isoenzimas forneceram base para taxonomia (Rioux *et al.*, 1990) e foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas (Maurício *et al.*, 2006).

O complexo *L. donovani* pode ser segregado permitindo um rastreamento de mais de 50 genótipos (zimodemas) distintos. Apesar de ser considerada uma ferramenta de tipagem molecular útil, a técnica vem sendo questionada regularmente devido inúmeras limitações e desvantagens, das quais citam-se a alta complexidade técnica; necessidade de isolamento e cultivo do parasito (Schönian *et al.*, 2003; Tintaya *et al.*, 2004; Kuhls *et al.*, 2007); subestimação da diversidade genética (não detecta mutações silenciosas) (Tintaya *et al.*, 2004; Maurício *et al.*, 2006, Zemanová *et al.*, 2007; Kuhls *et al.*, 2007); as substituições de aminoácidos que não alteraram a mobilidade eletroforética são imperceptíveis (Zemanová *et al.*, 2007); necessidade de tipagem de cepa referência concomitantemente (Schönian *et al.*, 2010); reduzido poder discriminatório abaixo do nível espécie, onde exemplarmente o grupamento de mesmo zimodema, denominado MON-1 engloba a grande maioria de parasitos da espécie *L. infantum*, oriundos do Mediterrâneo e América do Sul (Schönian *et al.*, 2010).

Assim sendo, tornou-se fundamental o desenvolvimento e a aplicação de ferramentas de caracterização com maior sensibilidade, poder discriminatório (Tintaya *et al.*, 2004; Maurício *et al.*, 2006, Zemanová *et al.*, 2007; Kuhls *et al.*, 2007; Marlow *et al.*, 2014), confiabilidade, reprodutibilidade, e facilidade de execução (Schönian *et al.*, 2010, Marlow *et al.*, 2014).

Entre as técnicas moleculares com maior sensibilidade e confiabilidade, destacam-se a PCR-RFLP (Schönian *et al.*, 2000, Tintaya *et al.*, 2004), MLMT (Kuhls *et al.*, 2007, Kuhls *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012), análise e/ou tipagem sequências multilocus (MLST e/ou MLSA) (Maurício *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007; Yeo *et al.* 2011; Boité *et al.*, 2012, Marlow *et al.*, 2014), cujos resultados tem permitido constante questionamento sobre a validade de MLEE e fornecido novas perspectivas nos estudos genéticos desse protozoário (Kuhls *et al.*, 2007).

1.4.2 Reação em cadeia polimerase (PCR) e polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP)

Na década de 90 a reação em cadeia polimerase (PCR) consolida-se como ferramenta poderosa e sensível para detectar e caracterizar patógenos (Schönian *et al.*, 2003). Está técnica baseia-se fundamentalmente em três etapas, desnaturaçã, anelamento e extensão, cada qual com uma temperatura de incubação, após adição em mesmo tubo de *template*, dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados, da enzima Taq DNA-polimerase, de dois iniciadores

(primers) complementares a sequência de DNA de interesse, sendo todos esses reagentes termoestáveis (Eisenstein, 1990).

A técnica RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) baseia-se na amplificação de um fragmento específico de DNA com subsequente restrição do amplicon por endonucleases que clivam a molécula de DNA em sítios específicos (sítios de restrição) gerando perfis de restrição específicos. Esse método tem sido utilizado no diagnóstico, identificação de espécies e caracterização em *Leishmania* devido a sua alta sensibilidade e reprodutibilidade (Volpini *et al.*, 2004).

A maioria das espécies clinicamente relevantes do gênero *Leishmania* podem ser identificadas pela análise de restrição da região do ITS1 do operon ribossômico, bem como, caracterizadas através da averiguação da presença de polimorfismos no DNA. Diversos marcadores moleculares estão disponíveis para amplificação e utilização na RFLP (Schönian *et al.*, 2000), desde regiões codificadoras e polimórficas e não codificadoras (intergênicas) do genoma (Tintaya *et al.*, 2004). A RFLP apresenta algumas vantagens em relação a MLEE, tais como melhor poder discriminatório; alto limiar de detecção (pequenas quantidades de DNA). Entre as desvantagens dessa técnica citam-se a possibilidade de subestimação do polimorfismo principalmente quando a escolha da enzima de restrição é incorreta (Tintaya *et al.*, 2004) e os alvos são considerados muito conservados para estudos de diversidade intra-específica (Boité *et al.*, 2012).

Análises de cepas do “complexo *donovani*”, via PCR-RFLP do gene cisteína proteinase B (*cpb*) e MLEE, apresentaram alguns resultados divergentes, exemplarmente MLEE identificou e classificou 2 cepas africanas como *L. infantum* e *L. archibaldi*, já PCR-RFLP agruparam e definiram essas cepas como sendo *L. donovani* (Tintaya *et al.*, 2004; Lukes *et al.*, 2007).

1.4.3 Tipagem microssatélites multilocus (MLMT)

A MLMT (*multilocus microsatellite typing*) - e/ou repetições curtas em tandem e/ou repetições de sequências simples e/ou sequências microssatélites- são sequências de DNA contendo de 1 a 6 nucleotídeos nos genomas de procariotos e eucariotos (Mrazek *et al.*, 2007) que apresentam taxas de mutações 5-6 vezes maiores que as demais regiões do DNA, tornando-os extremamente úteis para estudos de variabilidade entre organismos intimamente relacionados (intra-espécie) (Schönian *et al.*, 2011), bem como, estudos epidemiológicos e

genéticos populacionais globais. Esses marcadores polimórficos de natureza co-dominantes apresentam elevado poder discriminatório na tipagem; podem ser usados diretamente em material biológico sem necessidade de cultivo do parasito; passíveis de armazenamento de perfis em bancos de dados na web, permitindo comparação dos dados com outros laboratórios de pesquisa; os resultados são altamente reprodutíveis (Kuhls *et al.*, 2007); podem também ser usados para investigação de surtos (origem e disseminação) (Ferreira *et al.*, 2012). Entre limitações citam-se a sua baixa capacidade discriminatória em questões relacionadas a estruturas populacionais. (Kuhls *et al.*, 2007), a identificação de muitos genótipos (haplotipos) pode dificultar e reduzir o poder estatístico de inferência sobre as variáveis epidemiológicas de associação de um genótipo específico à demografia, clínica e fatores de virulência (Marlow *et al.*, 2014).

Na tentativa de produzir informações sobre a estrutura populacional do “complexo donovani” 15 marcadores microssatélites foram analisados, evidenciando elevado grau de polimorfismo na Ásia, África e Europa e América do Sul onde todos os marcadores apresentavam heterozigidade, mas agruparam as diferentes cepas em seis grandes populações geográficas devido ao elevado grau de isolamento genético verificado. Não houve correlação entre os subgrupos MLMT e manifestações clínicas e o elevado coeficiente de endogamia em algumas populações evidenciou um modo de reprodução clonal (Kuhls *et al.*, 2007).

1.4.4 Tipagem de sequências multilocus (MLST) e/ou análise de sequência multilocus (MLSA)

O sequenciamento genético de vários genes codificadores das enzimas utilizadas na MLEE, forneceram dados confiáveis para estudar a diversidade genotípica e realizar adequada tipagem de sequências do “complexo donovani” (Zemanová *et al.*, 2007; Maurício *et al.*, 2006), apresentando vantagens como reprodutibilidade (Schönian *et al.*, 2010); simplicidade; sensibilidade elevada; possibilidade de armazenamento e disponibilização dos dados gerados via banco de dados na internet, permitindo a comparação das sequências. Embora exista a necessidade de aprimoramento, a caracterização via MLST fornece maior resolubilidade, sendo uma plausível alternativa a substituir MLEE (Maurício *et al.*, 2006, Zemanová *et al.*, 2007).

A análise MLST das sequências de cinco genes usados em MLEE, aspartato aminotransferase (ASAT) glicose-6-fosfato isomerase (GPI), nucleosídeo hidrolase 1 (NH1), nucleosídeo hidrolase 2 (NH2) e 6-fosfogluconato desidrogenase (PGD) demonstraram polimorfismos com maior poder discriminatórios que a tipagem de isoenzimas e capacidade de

diferenciar a maioria dos zimodemas existentes, sugerindo ainda, que a espécie *L. archibaldi* inexistente, pois esses parasitos formaram um único grupo genético com *L. donovani* (Maurício *et al.*, 2006). Zemanová *et al.* (2007) sequenciam e analisam outros 5 genes MLEE, isocitrato desidrogenase (*icd*), enzima málica citosólica (*me*), manose fosfato isomerase (*mpi*), desidrogenase glicose-6-fosfato (*gpi*) e fumarato hidratase (*fh*) e descrevem que *L. major* e *L. infantum* apresentam dois genes *icd* (cromossomos 10 e 33) com sequências nucleotídeos diferentes e tamanho do fragmento semelhante e que MLEE avalia apenas o gene presente no cromossomo 10. A elevada heterozigotidade descrita em diferentes locais intragênicos de algumas cepas geneticamente distantes permite sugerir a ocorrência de recombinação. A ocorrência e estabelecimento de mutações em sítios únicos podem gerar heterozigotidade, porém a recombinação é uma explicação mais parcimoniosa para mais de dois sítios (Maurício *et al.* 2006, Zemanová *et al.*, 2007). A utilização dos 10 alvos formaria um sistema MLST mais completo para a caracterização do complexo *L. donovani* (Schönian *et al.*, 2010). Resumidamente, MLST e MLEE corroboram em muitas informações e as divergências geradas conferiram maior poder de resolubilidade e abrangência a MLST (Maurício *et al.*, 2006).

Assim como MLST, a técnica MLSA tem se destacado como ferramenta de caracterização, vigilância epidemiológica e estudos evolutivos e de estrutura populacional e envolve o sequenciamento de genes constitutivos do parasito baseados no painel de isoenzimas da técnica MLEE. MLSA fornece evidências de semelhanças e/ou diferenças intra e inter-espécies, sensível, reprodutível e utiliza o sequenciamento de genes individuais, método atualmente de baixo custo e efetivo para classificar as espécies do gênero *Leishmania*, podendo ser realizada em grande parte dos laboratórios de pesquisa. Esse método permite analisar a diversidade genética de grupos gênicos e inferir afirmativas em estudos taxonômicos, filogenéticos e de genética populacional (Boité *et al.*, 2012).

O sequenciamento e análise de quatro genes codificadores (MLSA) de enzimas metabólicas, glicose-6-fosfato desidrogenase (*G6PD*), 6-fosfogluconato desidrogenase (*6PGD*), manose fosfato isomerase (*MPI*) e isocitrato desidrogenase (*ICD*), localizados em diferentes cromossomos e descritos como sendo de cópia simples, constatou diferentes graus de diversidade em distintas espécies do subgênero *Viannia* e agrupamentos evolutivamente precisos. Este estudo também questionou a validade taxonômica de *L. shawi*, sugerindo relação muito forte ou agrupamento no grupo *L. guyanensis* (Boité *et al.*, 2012).

No NM a caracterização das espécies e a disponibilização em bancos de dados de marcadores com padrão-ouro ainda não foram estabelecidos. Diante desse empasse, um painel

de seis loci gênicos (MLSA), incluindo três novos marcadores, hsp70 e malato desidrogenase mitocondrial (mdhmt) e nuclear(mdhnc), alguns não analisados pela MLEE foram sugeridos para a investigação de um surto causado por *L. (V.) braziliensis* em Santa Catarina. Os resultados sugerem a expansão clonal (homogêneo) de cepas catarinenses carregando no genoma um evento recombinação homóloga, divergindo geneticamente das demais cepas brasileiras analisadas. A inclusão dos novos marcadores melhoraram a capacidade discriminatória da técnica, pois os mesmos mostraram-se mais polimórficos, permitindo análises de variações intra-espécies mais robustas, identificando e segregando casos autóctones e alóctones o que enaltece a potencialidade do método na investigação de surtos (Marlow *et al.*, 2014).

Comparações entre MLST e MLMT, evidenciam a superioridade de MLST na geração de filogenias, comparabilidade entre laboratórios e taxonomia com consequente identificação de espécies e MLMT mostra-se melhor na reprodutibilidade, capacidade de caracterização intra-espécie (abaixo do nível de zimodema) e distinção de cepas (mais discriminatório) (Schönian *et al.*, 2010).

1.5 Genômica comparativa

No VM, análises de vários marcadores moleculares, tais como microssatélites, sequências de genes codificadores de proteínas e de regiões não codificantes e intergênicas foram realizadas com várias cepas do “complexo donovani”. Estas haviam sido isoladas de cães e humanos, oriundas da Europa, Ásia e África, responsáveis por quadros clínicos cutâneos e viscerais. Observou-se correlação fortíssima entre a diversidade genética e a origem geográfica, em detrimento do pleomorfismo clínico e da taxonomia atual. Análises dos genes codificadores elucidaram que diversidade genética é maior em clados africanos, quando comparados aos europeus, embora considerável variabilidade tenha sido encontrada nas cepas europeias (Lukes *et al.*, 2007).

O sequenciamento e análise do genoma completo de 17 cepas de *L. donovani* com diferentes apresentações clínicas evidenciaram uma extensa variação no número de cópias cromossômicas, além de baixo número de SNPs e alelos com mutações não-sinônimos. As cepas com perfis resistentes ou sensíveis ao estibogluconato de sódio (SSG) apresentam padrões de diversidade característicos. A caracterização dos genes de DNA ribossômico (cromossomo 27) e genes do mini-exon (cromossomo 2), ambos distribuídos em “tandem”, onde os números de cópias do genes variaram entre de 6 e 15 e entre 26 a 146 por cromossomo, respectivamente,

demonstraram que os parasitas resistentes ao SSG possuem reduzido número de unidades de DNA ribossômico por célula quando comparado aos clones sensíveis e mais genes de mini-exon. Além disso, o gene de resistência ao SSG (LdBPK_310950) apresentava maior número de cópias nas cepas resistentes (Downing *et al.*, 2011).

No Sri Lanka um estudo comparativo de genoma completo de algumas cepas de *L. donovani*, responsáveis por casos cutâneos e viscerais foi conduzido com intuito de avaliar perdas e ganhos de funções, uma vez que essa espécie desencadeia quase que em sua totalidade manifestações viscerais. Os resultados evidenciaram que os SNPs, a presença de regiões com variações no número de cópias de genes ou grupos gênicos, bem como, as variações no nível de proteínas específicas são os verdadeiros responsáveis pela perda da capacidade de sobrevivência nas vísceras (atenuação) e ganho na gênese de lesões cutâneas, não sendo observadas deleções gênicas e considerável formação de pseudogenes, tais afirmações podem ser confirmadas, por exemplo, pela constatação de maior número de cópias gênicas, mRNA e proteínas da família A2 nas cepas viscerotrópicas. As conclusões permitem inferir que os determinantes genéticos que afetam o tropismo da doença e as diferenças no quadro clínico em infecções causadas por *L. donovani* são provavelmente, desencadeadas por determinantes específicos do parasito e não do hospedeiro (Zhang *et al.*, 2014).

A existência de mais de 2000 lacunas (*gaps*) espalhadas pelos 36 cromossomos no genoma de referência de *L. donovani* (ASM22713v2, cepa BPK282A), estimularam a realização de um novo sequenciamento de uma cepa de *L. donovani*, isolada de caso cutâneo humano no Sri Lanka. Foram então utilizadas plataformas de sequenciamento de segunda (Illumina) e terceira geração (PacBio), para produzir um genoma referência com melhor montagem e com anotações mais precisas e fidedignas. Foram identificados maior número de potenciais genes codificadores de proteínas e novas mutações/polimorfismos potencialmente associados à virulência. Em seguida, o isolado cutâneo foi experimentalmente utilizado para infectar camundongos, induzindo ganho de função com conseqüente estabelecimento da doença visceral com intuito de identificar genes associados à virulência e à sobrevivência do parasito nos órgãos viscerais, e por fim, submeter esse genoma do parasito virulento ao sequenciamento de nova geração e compará-los. Os resultados comparativos esclarecem que os genomas de *L. donovani* selvagem (cutânea) e com ganho de função (visceral) não apresentaram diferenças genéticas significativas independente do aumento da virulência e da maior sobrevivência do parasito nos órgãos linfoides. A inclusão nas análises comparativas do genoma referência de *L. major* evidenciou a perda funcional de alguns membros da família A2, devido a formação de

pseudogenes em *L. major*, além de comprovar o elevado grau de sintonia entre as espécies. O estudo genômico comparativo entre as duas espécies revelou que a evolução, estabelecimento e desfecho das manifestações cutâneas e viscerais (virulência e tropismo) são influenciadas principalmente, pela formação de pseudogenes, SNPs e variação do número de cópia gênicas, ou seja, ganhos (LV) ou perdas (LC) de função relacionados a pequenas alterações na codificação de aminoácidos (SNP, “indels” e “frameshifts”), descartando assim, a possibilidade de grandes alterações, como deleções ou inserções gênicas ou rearranjos cromossômicos (Lypaczewski *et al.*, 2018).

O limitado arsenal medicamentoso utilizado no controle da LV, as falhas no tratamento e / ou a resistência às drogas comprometem a eficácia das medidas de contenção da doença (Shaw *et al.*, 2020). A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que demonstrou atividade anti-*Leishmania* e tem favorecido esquemas terapêuticos em combinação com outros fármacos (Davidson *et al.*, 2009). Em posse dessas informações, foram induzidas resistência à paromomicina em três cepas clínicas humanas nepalesas de *L. donovani*, com diferentes susceptibilidades ao antimônio (Sb), MHOM/NP/02/BPK282-0c14 (sensível ao Sb), BPK087-0c111 (sensibilidade intermediário ao Sb) e BPK275-0c118 (resistente ao Sb) através de exposição gradual à droga, alteraram significativamente a ploidia durante a seleção do paramomicina de todas as cepas. A resistência a paramomicina e Sbr foi associada ao aumento da resistência ao óxido nítrico em amastigotas, fenômeno não observado em promastigotas), e elevação dos níveis de glutathione. É possível que o uso clínico de paramomicina como tratamento antibiótico, e não como tratamento antileishmanial de primeira linha, tenha favorecido a sobrevivência de parasitas resistentes. Não houve associação entre o isolado paramomicina resistente e a redução na infectividade em macrófagos peritoneais. Houve uma diferença marcante na resposta em nível de somia para os isolados de Sbs e Sbr, destacando que sua adaptação a esse fármaco pode ser diferente. Sugeriu-se que as significativas alterações de ploidia durante a seleção paramomicina resistente poderia permitir a seleção rápida de alterações genéticas que conferem uma vantagem de sobrevivência. A seleção de parasitos paramomicina resistente pode ocorrer mais rapidamente em amastigotas, sendo prudente o monitoramento da resistência (medicamentos anti-*Leishmania*) de isolados clínicos para rastrear a evolução de cepas resistentes (Shaw *et al.*, 2020).

A relevância clínica e a constante recorrência para fins de biologia molecular às sequências genômicas de *L. infantum*, bem como, a disponibilidade pública de um genoma incompleto e fragmentado impulsionaram o estudo para o melhoramento dos dados

provenientes do genoma de referência da cepa JPCM5 (MCAN / ES / 98 / LLM-724). Para tal, foram empregados duas diferentes plataformas de sequenciamento: a) Illumina: usada para produzir *reads* curtas (100-150pb); b) Pacific Biosciences: geração de sequências longas (10 a 15kb). A elevada identidade de algumas sequências repetitivas (500-600pb) distribuídas por todo o genoma (Smith *et al.*, 2009) dificultam a montagens quando do uso de *reads* curtas-Illumina (Goodwin *et al.*, 2016). Para contornar essa limitação necessário se faz, a ordenação dos *contigs* em *scaffolds* contra um genoma de referência bem montado, porém, como efeito colateral, essa estratégia pode comprometer a montagem de regiões divergentes (Fuente *et al.*, 2017). Outro obstáculo das *reds* curtas é a colapso gerado na tentativa de determinação do número exato de genes de cópias múltiplas repetidas em *tandem* (Treangen *et al.*, 2011). Na tentativa de correção das limitações do Illumina, associou-se às sequências curtas, *reads* longas geradas pelo sequenciamento em tempo real de molécula única (SMRT), onde foram obtidas *reads* com comprimento médio de 11kb. Os resultados evidenciam: acréscimo de 680.199pb no genoma; identificação de 601 novos genes (incluindo RNA não codificantes), sendo alguns genes repetidos em *tandem*; e eliminação das lacunas existentes. Quando comparados com o genoma de referência de *L. major* (Friedlin) a sintenia foi ainda mais pronunciada. Em relação as plataformas de sequenciamento, notou-se a complementariedade das técnicas, sendo Illumina fundamental para correção das *reads* de PacBio, junção precisa de alguns *contigs* e para extensão e cobertura das extremidades cromossômicas (Fuente *et al.*, 2017).

A caracterização de duas cepas de *L. (L.) amazonensis* (S3 e S6) isolados de cães naturalmente infectados, com sintomatologia sugestiva de LVC, no município de Governador Valadares, Minas Gerais, utilizando análises de genômica comparativa com o genoma publicado e disponível em banco de dados da cepa MHOM/BR/71973/M2269, isolada de lesão cutânea humana em 1973, no estado do Pará permitiu evidenciar significativas divergências em termos de SNPs, número de cópias de cada cromossomo e variação no número de cópias gênicas, associando essa diversidade as distintas origens geográficas (Valdivia *et al.*, 2017).

As espécies pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* distribuem-se exclusivamente na América Central e do Sul, sendo formado por 2 complexos principais, complexos *L. braziliensis* e o *L. guyanensis*, que inclui a principal espécie panamenha, *L. panamensis* (Restrepo *et al.*, 2019). O genoma de referência *L. panamensis* (MHOM/PA/1994/PSC-1) ao foi comparado ao genoma dessa mesma cepa submetida a 7 crescentes concentrações de SbIII, e ao genoma de 2 isolados (BD-02 e RG-01) sem registro de falha no tratamento, provenientes de lesões cutâneas humanas da mesma espécie e de origens geográficas distintas. Onze cromossomos (1, 3, 6, 12,

13, 18, 21, 23, 26, 31 e 32) mostraram pelo menos uma alteração estatisticamente significativa de somia, nas diferentes concentrações de SbIII, durante a aquisição do fenótipo resistente, quando comparados a PSC-1 não tratada (Restrepo *et al.*, 2019). As variações na ploidia cromossômica que ocorreram ativamente durante a aquisição da resistência, iniciaram-se durante a exposição à menor concentração de SbIII, sendo que algumas dessas, estabeleceram-se de forma consistente durante todo o intervalo de concentrações analisadas. Surpreendentemente, foram encontrados variações genômicas menos notáveis nos isolados clínicos, quando comparadas às amostras tratadas e à linhagem PSC-1 não tratada, quase não sendo identificadas ocorrências de ampliações subteloômicas (regiões cromossômicas) ou episomais e alterações na ploidia (exceto cromossomo 31). Entre as conclusões citou-se que o conjunto de ampliações genômicas que ocorrem em uma população do gênero *Leishmania* poderia ser equilibrado pelo comprometimento entre a disponibilidade de precursores necessários para a síntese de DNA e a vantagem que essas ampliações podem representar para o parasito em termos de *fitness*, sob certas condições ambientais e que as mudanças repentinas no nível do DNA se dão face à inexistência de regulação no nível transcricional da expressão de genes codificadores de proteínas no grupo (Restrepo *et al.*, 2019).

Os estudos de genômica comparativa entre 2 isolados de *L. (V.) peruviana* (cepas LEM1537 e PAB-4377) e o genoma de referência de *L. (V.) braziliensis* (M2904) evidenciaram: identidade de 87,58% para PAB-4377, 77,1% para LEM1537 e 99% quando a comparação foi realizada somente entre os genomas dos isolados; existência de 144.079 SNPs na cepa PAB-4377 e 136.946 em LEM1537, sendo 94.070 (26.750 em sequências codificadoras) compartilhados nos 3 genomas e apenas 26.853 exclusivos de *L. peruviana*. Ademais, 2 pseudogenes relatados em *L. braziliensis* apresentou-se com potencial de codificação em *L. peruviana*. O padrão heterogêneo de aneuploidia com uma tendência dissômica e trissômica geral foi averiguado em *L. peruviana*, *L. braziliensis* respectivamente. As análises de variação do número de cópias gênicas demonstraram 368 genes e 14 matrizes expandidos em *L. peruviana*. Análises de SNP e as diferenças nas variações no número de cópias cromossômicas e gênicas confirmam a classificação desses organismos como espécies distintas e intimamente relacionadas (formando o complexo *L. braziliensis*), elucidando características únicas da biologia de *L. peruviana*, tais como, patologia menos agressiva e relativa impotência no acometimento de mucosas (Valdivia *et al.*, 2015).

O sequenciamos e análises do genoma de três espécies de *Leishmania* (*Mundinia*), *L. (M.) enriettii* MCAV / BR / 1945 / LV90, originário do sul do Brasil, *L. (M.) macropodum*

MMAC / AU / 2004 / AM-2004, isolado no norte da Austrália e *L. (M.) martiniquensis* MHOM / MQ / 1992 / MAR1, originário da ilha caribenha da Martinica revelaram genomas de aproximadamente 29 milhões de pares de bases. O tamanho do genoma é semelhante a *L. tarentolae* (~ 30 Mb) e menor que na maioria das espécies patogênicas (~ 32 Mb), devido supostamente, ao estabelecimento dessas espécies em novos vetores (*biting midges and/or non-conventional sand flies*) e hospedeiros, com perdas e contrações expressivas de genes e famílias gênicas, respectivamente. A maior ocorrência de SNPs foi observada na cepa brasileira (12.379), seguido pelos isolados australianos (4.834) e caribenho (1.765). Como esperado a aneuploidia em mosaico foi verificada, o cromossomo 31 supranumérico e a maioria dos cromossomos tendenciosamente a dissomia nas espécies analisadas. Foram identificados mais de 8000 genes codificadores de proteínas, elevado grau de sintenia (superior a 93%) com *L. major* (Friedlin) e fortalecida a hipótese de que o subgênero *L. (Mundinia)* seria o mais antigo do gênero *Leishmania* (Butenko *et al.*, 2019).

A comparação de sequências genômicas de *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. tarentolae* (não patogênica em humanos), identificou 73 grupos de ortólogos (95 genes) presentes nas espécies patogênicas humanas (exemplo: alguns genes da família das amastina e tuzinas) e ausentes em *L. tarentolae*, muitos expressos preferencialmente em amastigotas intracelulares, o que poderia justificar o ciclo de vida extra celular desse parasito em lagartos e a dificuldade em infectar macrófagos humanos. Além disso, as famílias gênicas da metaloprotease GP63 e as proteínas antigênicas de superfície (PSA31C), transcritos principalmente em promastigotas (inseto vetor) encontraram-se expressivamente expandidas na espécie réptil infectante. A maioria das diferenças entre *L. tarentolae* e as outras espécies deu-se por inserções ou deleções de genes distribuídos aleatoriamente ou em conjuntos (tandem) por todo o genoma, sendo *L. tarentolae* mais sintênico a *L. major* (Raymond *et al.*, 2012).

No Brasil, a caracterização e a diversidade genética de isolados de *Leishmania infantum*, carecem de mais pesquisas em diferentes áreas geográficas para melhorar a compreensão sobre a genética do parasito em território nacional. Nenhum estudo genômico foi ainda desenvolvido no município de Januária, Minas Gerais, para caracterizar e investigar a variabilidade genética entre isolados caninos. Nesse endêmico município os registros e notificações de casos de LTA e LV em humanos pelo Centro Avançado de Tratamento e Pesquisa de Leishmanioses, através de suas notificações, sugerem a circulação e sobreposição de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, sendo cães susceptíveis a várias delas, apresentando alto parasitismo cutâneo. Assim sendo, o presente estudo pretende contribuir com o conhecimento da caracterização e

diversidade molecular de *Leishmania infantum* em isolados circulantes na macrorregião do Vale São Francisco, onde se encontra o município de Januária-MG.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar caracterização genética de isolados de *Leishmania* associados a leishmaniose visceral canina no município de Januária-MG

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar clinicamente a população amostral canina;
- Realizar a confirmação do diagnóstico de LVC, utilizando técnicas sorológicas e molecular;
- Comparar a performance das técnicas sorológicas e moleculares;
- Identificar a(s) espécie(s) de *Leishmania* circulantes em cães domésticos, através de PCR-RFLP-ITS1;
- Comparar a variabilidade genômica intra-específica (SNVs, CCNVs) de isolados de *Leishmania infantum*, de cães naturalmente infectados, em tempos e regiões distintas no município de Januária, Minas Gerais;
- Avaliar o genoma dos isolados quanto divergência filogenética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A lógica das atividades desenvolvidas no decorrer deste estudo foram representadas e expostas sucintamente através de um fluxograma do desenho experimental, onde as principais amostras e técnicas utilizadas são evidenciadas (Figura 1).

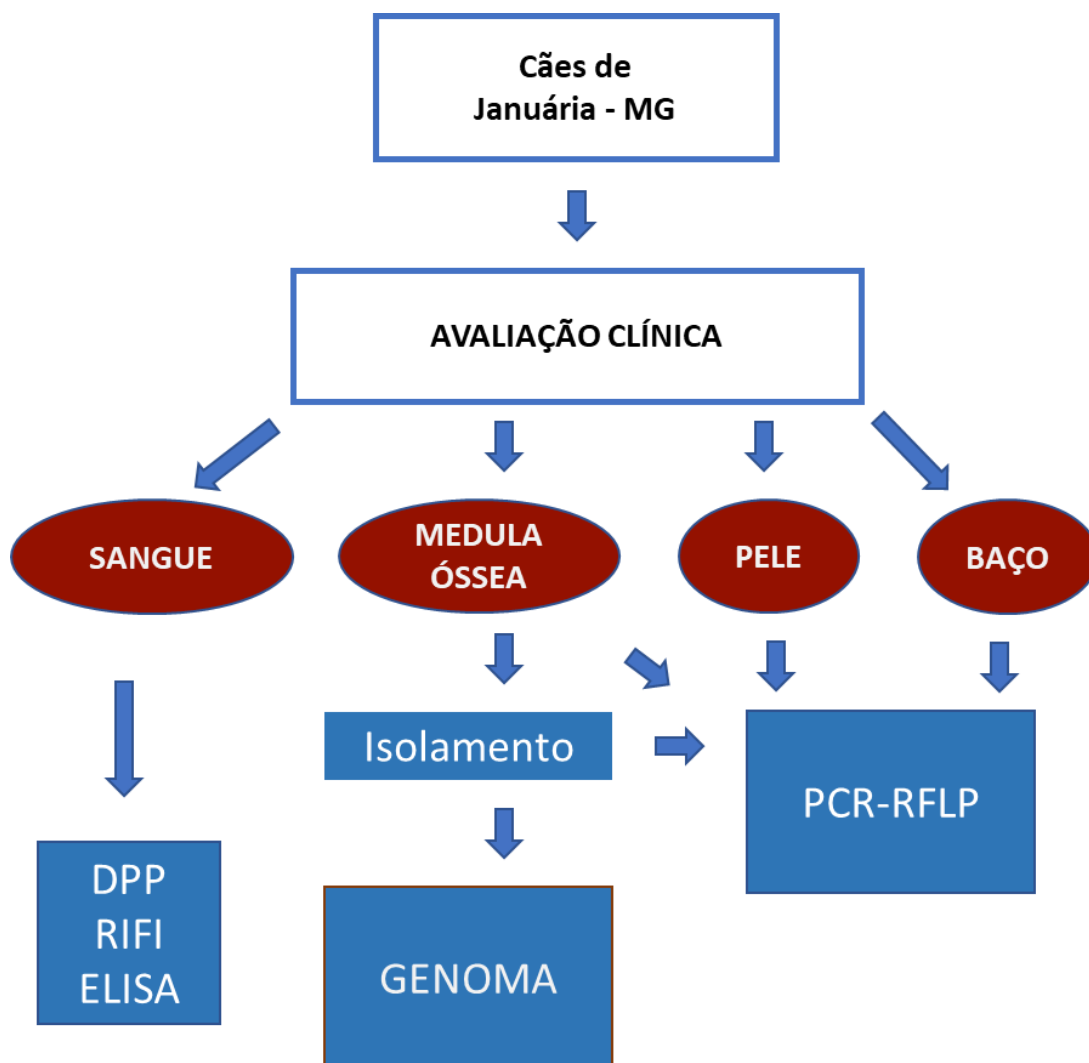


Figura 1: Fluxograma do desenho experimental. Os cães selecionados foram examinados clinicamente e também realizadas coletas de espécimes clínicas de diferentes tecidos que foram submetidas a análises por diferentes métodos.

3.1 Área de estudo

O município de Januária situa-se na região Norte do estado de Minas Gerais (MG) (15°29'16" Sul de latitude e 44°21'43" Oeste de longitude), sendo integrado, desde o ano de 2003, por outros sete distritos: Várzea Bonita, São Joaquim, Tejuco, Pandeiros, Riacho da Cruz,

Levinópolis e Brejo do Amparo (Figura 2). A cidade apresenta uma estimativa populacional de aproximadamente 67.000 habitantes, estendendo-se por uma área de 6.661,558Km², sendo fronteiro com os municípios de São Francisco, Pedras de Maria da Cruz, Cônego Marinho, Chapada Gaúcha e Itacarambi, Bonito de Minas e a extremo norte faz divisa com o Estado da Bahia. O município é banhado pelo Rio São Francisco e localiza-se a 600 Km da capital mineira, no polígono da seca, apresentando vegetação predominantemente de cerrado e caatinga e sujeito a clima tropical com transição para semiárido (IBGE, 2020).

O estado de MG foi destacado no mapa do Brasil e o município de Januária no mapa de MG (Figura 2, imagens superiores), bem como, as diferentes regiões constituintes do referido município (imagem inferior).

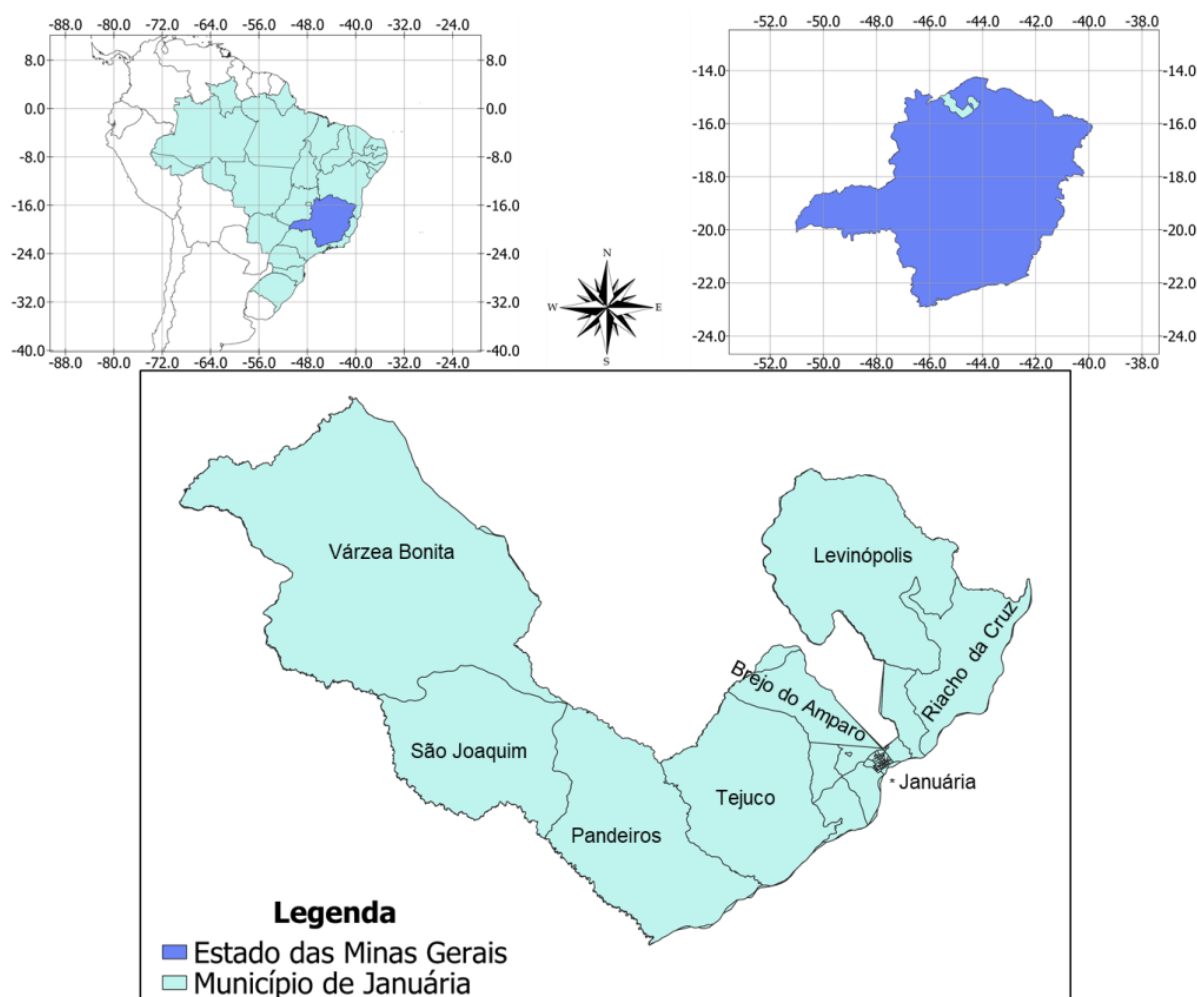


Figura 2: Mapa do Brasil e a localização do Estado de Minas Gerais (azul-a direita). Mapa do Estado de Minas Gerais e a localização do município de Januária (verde claro- a esquerda), bem como, toda sua delimitação territorial e divisão distrital (verde claro, mapa inferior).

3.2 Considerações éticas e critérios de inclusão

Todos os procedimentos de seleção e coleta de amostras clínicas dos cães foram realizados em consonância com os Princípios Éticos na Experimentação Animal. A utilização e participação desses animais domésticos nesse estudo, foi condicionada a conscientização, via leitura de termo de esclarecimento e livre consentimento e assinatura da Declaração e Termo de doação (Anexo 1) do cão pelo participante/doador e/ou responsável legal. Todos os procedimentos foram sancionados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA UFMG-MG), pelo protocolo 198/2014.

Os animais do presente estudo foram selecionados em quatro momentos: setembro de 2017, abril de 2018, abril e julho de 2019. Foram incluídos no estudo os animais doados pelos proprietários maiores de 18 anos (com consequente assinatura do Termo de esclarecimento e livre consentimento, do Termo de doação e da Declaração e viabilidade na captura dos animais), e com manifestações sugestivas de LVC associados a positividade em no mínimo 1 teste sorológico (DPP, RIFI, ELISA) ou a presença do parasito, evidenciada pelos testes parasitológicos de PCR-ITS1 e/ou isolamento em cultura do parasito.

3.3 Obtenção de dados clínicos e amostras

A seleção/anamnese e a coleta de dados e espécimes clínicas (Figura 3) foram possibilitadas por demandas espontâneas geradas quando da confirmação da infecção segundo os critérios estabelecidos pelo MS (DPP e ELISA) e por buscas ativas de cães clinicamente sugestivos para LVC em diferentes distritos rurais do município (Figura 4). As espécimes clínicas foram coletadas durante essa triagem.

a) Dados clínicos e amostras de sangue- Inicialmente, foram preenchidas fichas clínicas (Anexo 2), de acordo com anamnese e observação de sinais clínicos realizada pelo médico veterinário João Carlos França-Silva. Durante a obtenção dos espécimes clínicos foram anotados os endereços de residência dos animais permitindo a consulta das coordenadas geográficas (latitude e longitude) em graus, minutos e segundos. A reprojeção das coordenadas foi realizada através do sistema South American Datum 69 (SAD 69) e subsequentemente, esses dados foram plotadas nos mapas, através do programa QGIS® 3.12.1.



Figura 3: Camioneta e carrocinha utilizadas na busca de animais clinicamente sugestivos ou infectados por *Leishmania* (superior esquerda). Local improvisado para coleta das espécimes clínicas (superior direita). Realização de anamnese em cães imobilizados para preenchimento da ficha clínica (inferior).



Figura 4: Busca ativa, anamnese e seleção de animais com clínica sugestiva para LVC, nos distritos rurais do município de Januária, Minas Gerais.

Ulteriormente à averiguação qualitativa dos dados clínicos, foi confeccionado com adaptações aos estudos de Mancianti *et al.*, (1988) e Silva *et al.*, (2017), um escore clínico transfigurando as informações categóricas em dados quantitativos com intuito de fornecer

maior robustez a posteriores análises. Para tal, foram utilizados quatorze marcadores clínicos considerados sugestivos para LVC, usando os seguintes critérios e respectivas pontuações:

- aparência: ativo (0), apático (1);
- estado nutricional: normal (0), magro/moderado (1), caquético (2);
- linfadenopatias: normal (0), aumentado (1);
- cor da mucosa: normal (0), pálida (1);
- hepatoesplenomegalia: ausente (0), hepato ou espleno (1), ambos (2);
- pêlos/cerdas: boas (0), regulares (1), ruins/opacas (2);
- lesão focinho/orelha: ausência (0), presença (1);
- onicogribose: ausente (0), presente (1);
- lesão cutânea: ausência (0), presença (1), úlcera (2);
- despigmentação do focinho: ausência (0), presença (1);
- alopecia: ausência (0), presença (1);
- blefarite: ausência (0), presença (1);
- ceratoconjuntivite: ausência (0), serosa (1), mucopurulenta (2);
- opacificação de córnea: ausente (0), presente (1).

O intervalo de valores possíveis para o escore foram de 0 a 19 pontos.

Por fim, foram coletadas alíquotas de sangue periférico via veias cefálicas ou jugular para realização de sorologia (DPP, RIFI e ELISA).

b) Medula óssea- Os animais foram contidos e anestesiados com associação de 1,0mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan®, Vetbrands, Brasil) e 10mg/Kg de Cloridrato de Ketamina 10% (KetaminaAgener®, Agener União, Brasil), via endovenosa. Seguidamente, foi administrado 20mg/Kg de Thiopental de sódio (Thiopentax®, Cristália, Brasil) e realizada punção de medula óssea na região da crista da tíbia, onde parte do material aspirado foi imediatamente inoculado em tubo contendo meio de cultura LIT/NNN acrescido de antibióticos (estreptomicina 100µg/mL e penicilina 500U/mL) e outra parte congelada para obtenção de DNA.

c) Pele e baço- Biópsia de pele de orelha foi realizada com auxílio de um punch veterinário. Em animais eutanasiados, fragmentos de pele de orelha e baço foram coletados após a eutanásia, e esta era consumada quando atingido o plano anestésico ideal, com a administração de aproximadamente 20mL de solução de cloreto de potássio, com consequente

necessidade de confirmação do óbito. As amostras desses tecidos foram utilizadas para obtenção de DNA.

3.4 Testes sorológicos

Novo diagnóstico sorológico foi realizado no Laboratório de Leishmanioses, Instituto de Ciências Biológicas-UFMG utilizando as técnicas de imunocromatografia-DPP, Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.4.1 Teste de imunocromatografia rápida para LVC

O teste rápido Dual Path Platform (TR-DPP®, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil), constituído pela proteína K28 (resultado da fusão dos peptídeos recombinantes rK26 e rK39), juntamente com proteína A conjugada a ouro coloidal, foi realizado, segundo às instruções do fabricante, nos soros de todos os cães.

As placas de DPP foram retiradas de suas embalagens e devidamente identificadas. Posteriormente, foi adicionado 5µL de soro canino e duas gotas do tampão de corrida ao poço identificado com o número 1 (Amostra + Tampão), aguardando cinco minutos para permitir a ligação dos anticorpos aos antígenos. Em seguida, foram adicionados mais quatro gotas do mesmo tampão ao poço número 2 (Tampão). Após 10 e 15 minutos em temperatura ambiente, foi realizada a leitura visual dos resultados. O teste não-reagente foi evidenciado pelo surgimento de uma linha na área do Controle (C) e ausência de faixa na área de Teste (T). Resultados reagentes revelaram o aparecimento de duas faixas (controle e testes). A intensidade da linha na região T (teste) do kit varia de claro a muito escuro.

3.4.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As RIFI foram realizadas conforme o protocolo proposto por Camargo (1964). As lâminas foram preparadas no Laboratório de Leishmanioses-UFMG, com a fixação de formas promastigotas (antígeno bruto). O soro dos cães foram submetidos a diluições seriadas (fator 2) em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2), 1:40, 1:80, 1:160 e assim sucessivamente. Posteriormente, os soros diluídos dos animais eram incubados com as promastigotas fixadas em lâmina, a 37°C, durante 30 minutos, em câmara úmida. Após lavagem com PBS, as lâminas

foram incubadas com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina G (anti-IgG) canino conjugado com isotiocianato de fluoresceína (SigmaAldrich®) em azul de Evans a 1:10.000, por 30 minutos, a 37° C, em câmara úmida. Após lavagens com PBS, foram adicionados glicerina tamponada (pH 8,5) sobre a lâmina, que fora recoberta com lamínula. A leitura e interpretação das lâminas foram realizadas com auxílio de microscópio de imunofluorescência (objetiva de 40X). As reações positivas foram caracterizadas pela averiguação de fluorescência esverdeada do parasito, distribuída por toda superfície da lâmina, em todas as diluições realizadas obtendo então o título de positividade. Nas reações negativas os parasitos são visualizados com coloração levemente esverdeada ou mesmo avermelhados. Soros oriundos de soroteca, sabidamente positivos e negativos foram usados como controles positivos e negativos, respectivamente.

3.4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

As reações imunoenzimáticas foram realizadas em microplacas de polipropileno Eppendorf® (Hamburgo, Alemanha) sensibilizadas com 100µL de antígeno total bruto (10µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), à temperatura de 4°C, durante 16-18 horas. O bloqueio dos sítios de ligação foram realizados com PBS acrescido de Tween20 (T) a 0,05% e leite em pó desnatado (5%) à 37°C, por 1 hora. Alíquotas dos soros caninos foram diluídas (1:200) em PBS/T com leite em pó desnatado a 0,5% e incubadas nas placas sensibilizadas, a 37°C, por 1 hora. A solução de PBS/T foi utilizada para lavar as placas por três vezes, que em seguida foram incubadas com anti-IgG canino conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:5000 em PBS/T com leite em pó desnatado a 0,5%, a 37°C, durante 1 hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS/T e as reações foram desenvolvidas com 6mg de orto-fenilenodiamina e 0,05% de peróxido de hidrogênio em tampão citrato-fosfato (Na₂HPO₄ 0.2M; ácido cítrico 0.1M, pH 5.0) por 20 minutos na ausência completa de luz. A interrupção das reações se deu pela adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2M). As leituras das placas foram realizadas a 492nm no leitor *Go Multiskan* (Thermo Scientific). Foram calculadas as médias das absorbâncias de todas as amostras e descontados o valor do branco. Para obtenção do ponto de corte foi usado o valor médio dos resultados negativos, abstraído do valor obtido no branco e multiplicado por 2.

3.5 Isolamento em cultura

Alíquotas de aspirados de MO foram inoculadas e cultivadas em tubos de vidro contendo meio Novy, MacNeal, Nicolle (NNN), acrescido de 20% de sangue de coelho desfibrinado e 1% de antibiótico Pen Strep (10.000 Units/mL de Penicilina e 10.000 µg/mL de Streptomicina) e Meio Liver Infusion Triptose (LIT), acrescido de 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Pen Strep (10.000 Units/mL de Penicilina e 10.000 µg/mL de Streptomicina). Alternativamente foi utilizado meio de cultura bifásico NNN (conforme descrito acima) e *Schneider's Insect* (Lac Biotecnologia, São Paulo, Brasil) enriquecido com 10% de SFB (Cultilab, São Paulo, BR) e penicilina 2mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

A cada 7 dias eram efetuados repiques para novos tubos e executada pesquisa de promastigotas (microscópio óptico). Após o período de 28 dias, os tubos com ausência de promastigotas eram considerados negativos e descartados, bem como, amostras contaminadas por fungos ou bactérias. Todos os procedimentos descritos foram realizados em cabine de segurança biológica, para minimizar eventuais possibilidades de contaminação por microrganismos indesejáveis.

3.6 PCR-RFLP do ITS1

A PCR foi realizada em amostras de pele de orelha, baço, aspirados de MO e nos isolados de culturas. Para isso, a extração do DNA foi realizada conforme instrução do fabricante do Kit de extração de DNA Wizard® (Promega, Estados Unidos da América). Após a extração, o DNA foi hidratado e a concentração de e DNA estimada em equipamento µDrop Multiskan Go (Thermo Scientific, Califórnia, Estados Unidos da América).

A PCR-ITS1 foi realizada conforme Schönian *et al.*, (2003), para amplificação da região ribossomal não codificadora de ITS1 (aproximadamente 350pb), utilizando os seguintes iniciadores: LITS1R 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S 5' TGATAACCACTTATCGCACTT 3'), que sintetizam um fragmento de aproximadamente 300-350pb. A reação continha também: solução tampão 1X (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs Mix, 0,5 pmol dos *primers* LITS1R e L5.8S, 1,25U de *Taq DNA polimerase platinum*® (Invitrogen, EUA), 2µl (50 nanogramas/microlitros) de DNA Template e quantidade suficiente de água ultrapurificada para um volume final de 25µl. A amplificação foi realizada em 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 2 minutos; 32 ciclos

alternados de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e 1 ciclo de extensão a 72°C por 6 minutos em equipamento termociclador automático.

Os resultados foram observados utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, seguido de coloração por solução de nitrato de prata 10% e revelados com solução de hidróxido de sódio, água destilada e formaldeído acrescentado no momento do uso, até o aparecimento das bandas. O processo de coloração e revelação exigiu ininterrupta agitação do gel. A solução reveladora foi descartada após a coloração e o gel mergulhado em solução fixadora. Os géis foram escaneados pelo programa LabScan™. DNA proveniente de cultura de *L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH400), *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) foram utilizados como controles positivos e os controles negativos eram constituídos de todos os reagentes, exceto DNA.

A RFLP foi realizada subsequentemente nas amostras com PCR-ITS1 positivas, cujo intuito era a identificação das espécies, entre elas: *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* principalmente (Schönian *et al.*, 2003). A reação de digestão foi preparada utilizando 0,2µL de *HaeIII* (PROMEGA, Wisconsin, EUA), acrescidos de 1µL de tampão da enzima e 10,0µL de produto de PCR. A suspensão foi incubada em termociclador a 37°C durante 2 horas e 30 min e depois a temperatura foi alterada para 80°C por 30 minutos, para inativação da *HaeIII*. Os perfis de digestão foram analisados em gel de poliacrilamida 6% corado por prata (conforme descrito anteriormente) e os perfis de restrição comparados com padrões das cepas referência de *L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH400) *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8). As diferentes espécies de *Leishmania* apresentam perfis restrição distintos, tais como: *L. infantum* apresenta fragmentos de aproximadamente 184, 72 e 55 pb e *L. amazonensis* 186 e 142 pb.

3.7 Análises estatísticas

Os valores obtidos no escore clínico, nas titulações das reações de imunofluorescência indireta (RIFI), tiveram suas medidas de tendência central calculadas no software do InfoStat e os coeficientes de concordância de Spearman e Kendall executados no InfoStat e R Studio respectivamente, estimando a existência de correlação entre os resultados. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

O teste de Coeficiente/Correlação Kappa foi executado na plataforma R avaliando a concordância entre os resultados das técnicas diagnósticas sorológicas (DPP, RIFI, ELISA) e

moleculares (PCR-ITS1) e o desempenho dos métodos. O valor Kappa oscila entre -1 e 1, onde -1 sugere ausência de concordância; 0 concordância atribuível exclusivamente ao acaso e 1 indicaria uma concordância perfeita. Para interpretação, valeu-se do proposto por Landis & Koch (1977), que considera concordância ruim (<0,20), fraca (0,21-0,40), moderada (0,41-0,60), boa ou substancial (0,61-0,80) e quase perfeita (0,81-1,00).

3.8 Sequenciamento e montagem do genoma

Foram sequenciados os genomas dos isolados provenientes de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, de zonas urbana (2017) e rural (2019) do município de Januária-MG. As amostras foram coletadas em setembro de 2017 (urbano), abril e julho de 2019 (rural), apresentando intervalo de 20 e 23 meses, respectivamente, da primeira coleta.

As amostras de *Leishmania* foram isoladas a partir de punção aspirativa de medula óssea dos animais e cultivadas em tubos de vidro em meio bifásico NNN/LIT e NNN/*Schneider's* enriquecidos com 10% de SFB e antibióticos. As promastigotas ao atingirem fase de crescimento estacionário foram contabilizados em 1×10^8 parasitos/mL de cultura e centrifugados a 2200 rpm, a 4°C, durante 10 minutos (centrífuga refrigerada modelo Sorvall Ultra Pro 80 *Ultracentrifuge*), para obtenção de *pellet*.

O DNA foi extraído utilizando o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, a concentração e qualidade (pureza) do DNA foram estimadas por espectrofotometria (NanoDrop 2000c, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA).

A integridade do gDNA (DNA genômico) foi aferida e a possibilidade de contaminação por *Mycoplasma spp.* averiguada através de PCR que utilizou os primers: (MGS0: 5' TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC 3' e GPO3: 3' GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT 5'; *amplicon* 270bp).

O sequenciamento genômico das culturas utilizou a plataforma de nova geração *Illumina* e foi realizado pela empresa MacroGen Inc (Seoul, Coreia do Sul), sendo necessário o envio de 3-5µg de DNA para cada isolado canino. O sequenciamento exige a observância e execução de quatro etapas fundamentais, entre eles: a) o controle de qualidade das amostras, cuja aprovação foi de suma importância para realização do segundo passo; b) construção da biblioteca, onde o DNA foi fragmentado aleatoriamente, seguido pelo anelamento aos adaptadores nas extremidades das regiões 5' e 3', com subsequente amplificação dos

fragmentos por PCR e purificação; c) sequenciamento dos fragmentos, onde erros foram identificados e eliminados pela plataforma e; d) Análises dados passíveis de realização quando os dados binários foram convertidos em formato FASTQ.

3.8.1 Processamento e mapeamento de *reads* de espécies de *Leishmania* contra genoma de referência

As bibliotecas de *reads* genômicas dos isolados caninos de Januária foram analisadas comparativamente entre si, considerando os tempos (2017 e 2019) e localidades (zona rural e zona urbana) distintos, e com cepa referência de *L. infantum* JPCM5, baixada e recuperada na versão 44 do banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/>), para mapeamento e montagem do genoma.

O software FASTQC v0.11.3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), foi utilizado para avaliar a qualidade das *reads* (*base calling*). O software Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) foi utilizado para remover *reads* de baixa qualidade, bases N e adaptadores, sendo mantidas apenas *reads* com tamanho superior a 50 nucleotídeos e qualidade de PHRED maior que 30 (1 erro a cada 1000 bases).

As *reads* de cada isolado foram mapeadas pelo programa BWA-mem (Li and Durbin, 2010), que permite o alinhamento das *reads* geradas, contra o genoma de referência. Posteriormente, foi utilizado o software SAMtools v1.3.1 (Li *et al.*, 2009), onde as *reads* mapeadas foram filtradas por um cut-off mínimo de qualidade de mapeamento 30 (1 *read* mapeada incorretamente para cada 1000 *reads* mapeadas).

3.8.2 Estimativa de ploidia cromossomal de cada isolado de *L. infantum*

O mapeamento permitiu a mensuração de profundidade das *reads* (número de *reads* que mapearam em uma posição idêntica do genoma) e do percentual de cobertura de cada cromossomo de *L. infantum*. A constatação de tais informações associados ao uso de *scripts* em linguagem de programação PERL (CADIn – *paper* em preparação), desenvolvidos, padronizados e validados pelo grupo de pesquisa liderado pela Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu, permitiram constatar estimativamente a ploidia cromossomal dos isolados. Isto foi feito considerando-se que a cobertura média de *reads* em um determinado cromossomo é

diretamente proporcional ao seu número de cópias, sendo o número de cópias de cada cromossomo determinado dividindo-se a cobertura média do cromossomo pela cobertura média do genoma. A normalização foi realizada pela mediana da profundidade de cobertura das *reads*. A cobertura cromossomal, a profundidade de *reads* e a estimativa da ploidia tiveram suas representações gráficas disponibilizadas em *boxplot (perl)* e *heatmap* (gerados em R).

3.8.3 Análise de Enriquecimento por Ontologia Gênica (GO) de Cromossomo com ploidia aumentada

Cromossomos com ploidia aumentada de forma diferenciada entre os grupos urbano/2017 x rural/2019, foram submetidos a análise de enriquecimento funcional por GO. As funções biológicas enriquecidas foram identificadas utilizando o pacote TopGO versão 2.41.0 (Alexa & Rahnenfuhrer *et al.*, 2020), processado na plataforma R e validados estatisticamente com teste de Elin Fisher.

3.8.4 Dendograma de clusterização

A análise de clusterização hierárquica baseada nas distâncias euclidianas da ploidia predita de cada cromossomo de todos os isolados de *Leishmania* avaliados foi realizada usando o pacote *gplot* e *RColorBrewer* na plataforma R. A distância entre os isolados e os cálculos de clusterização foram analisados pelos testes estatísticos de Manhattan e Average (bootstrap 1000), respectivamente. As imagens foram geradas em Rstudio.

3.8.5 Análise variância de nucleotídeo único (SNVs)

O software Genome Analysis Toolkit v3.3. (GATK) (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) foi utilizado para identificar SNPs e indels para cada isolado quando comparado com o genoma de referência. As sequências consenso geradas permitiram a estimativa, baseada nos SNVs, da distância entre os isolados e a representação gráfica dos dados geradas em R (v3.6.1). O software Rstudio (v1.1.453) foi utilizado para processamento da imagem representativa do *Principal Component Analysis* (PCA) em gráfico 2D (McKenna *et al.*, 2010) segundo as divergências existentes.

3.8.6 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas nos genomas dos isolados, em formato fasta, a partir dos SNVs divergentes gerados nos estudos de GATK. Os genomas foram agrupados em um único arquivo de *input* e submetidos ao pacote jModelTest v2.1.7 para verificação do modelo estatístico de distribuição nucleotídica (Posada, 2008), que definiu GTR *gamma shape* de 0,02 e *proportion of invariable site* equivalente a 1,00. O programa PhyML v3.0 foi usado para designar a filogenia dos isolados por máxima verossimilhança empregando o modelo de distribuição nucleotídica GTR e 1000 replicatas de *bootstrap* (Guindon et al., 2010). O software FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) foi utilizado para gerar as visualizações gráficas das árvores filogenéticas.

4 RESULTADOS

O Departamento de Endemias e Vigilância Ambiental do município de Januária-MG, através dos testes preconizados pelo MS (DPP e ELISA) identificou em 2017/2018 e 2019, 480 e 107 cães sorologicamente reagentes, respectivamente, somando 587 animais soro-reativos no decorrer dos 3 anos últimos anos.

No presente estudo foram utilizadas amostras de 108 animais, sendo 57 delas provenientes dos 480 animais soropositivos nos anos de 2017/2018 e outros 51 cães amostrados em buscas ativas em áreas rurais do município no ano de 2019. Dentre os 108 animais selecionados, 100 (92,6%) atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos, sendo: presença de sinais clínicos associados a positividade em no mínimo 1 teste sorológico (DPP, RIFI, ELISA) e/ou presença do parasito evidenciada pelos testes parasitológicos de PCR-ITS1 e/ou isolamento em cultura.

O Centro Avançado de Tratamento e Pesquisa de Leishmanioses notificou em Januária, nos anos de 2017, 2018 e 2019 ao MS, 33, 37, 46 (total 116) casos de LTA e 9, 2, 5 (total 16) casos de LV humana, respectivamente, evidenciando a sobreposição de espécies do gênero *Leishmania* na área.

4.1 Dados Epidemiológicos

Os dados epidemiológicos provenientes do preenchimento de fichas clínicas evidenciaram que no presente estudo 60% dos animais eram machos, 51% residiam em áreas rurais, 38% tem porte físico mediano e a grande maioria (88%) possuíam pelagem curta, sendo esses dados representados mais detalhadamente na Tabela 1.

Minuciosa avaliação dos sinais clínicos dos animais foi realizada baseando-se nos critérios discutidos e definidos em Mancianti *et al.*, (1988) e Silva *et al.*, (2017), onde 100% dos animais desse estudo apresentaram sinais clínicos evidentes, caracterizando a população amostral em sua totalidade como clinicamente sintomática. Os sinais mais comumente pronunciados nos cães foram lesões de focinho e orelha (93%), esplenomegalia (92%), linfadenopatia (91%), onicogribose (89%), hepatomegalia (83%), conforme pode ser averiguado no *heatmap* (Figura 5 e Tabela 2); estes dados são condizentes com aspectos clínicos pronunciados no decorrer do processo infeccioso, há muito referenciados na literatura.

Tabela 1: Caracterização dos cães (N=100) em relação ao gênero, localização geográfica, porte e tipo de pelagem

Gênero (%)	Habitat (%)	Porte (%)	Pêlos (%)
Macho 60	Urbano 49	Pequeno 39	Curto 88
Fêmea 40	Rural 51	Médio 38	Médio 05
		Grande 23	Longo 07
Total 100	100	100	100

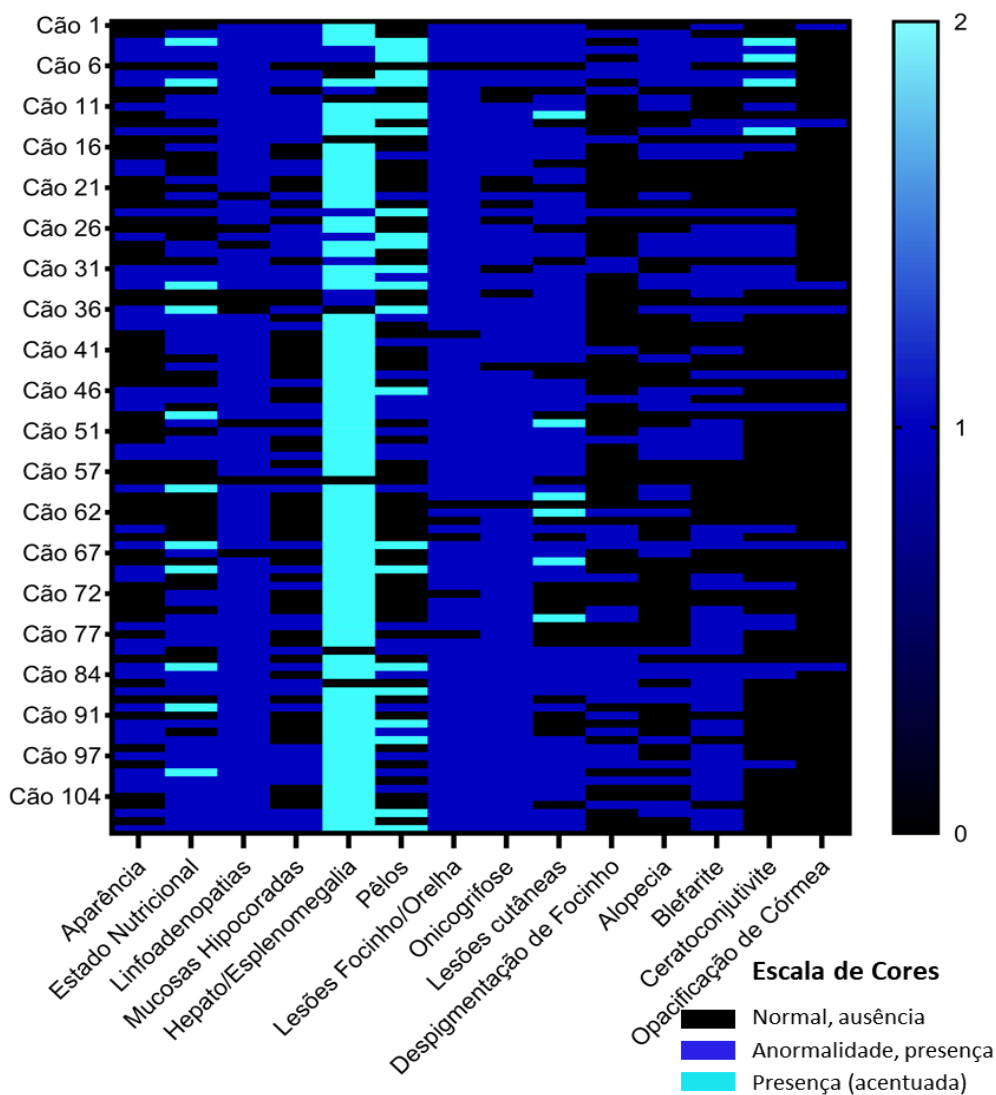


Figura 5: Heatmap com a distribuição dos principais sinais clínicos evidenciados na população amostral canina. Na escala de cores o preto representa a normalidade, ausência do sinal clínico; o azul, anormalidade, presença e o verde, anormalidade, presença acentuada.

Os sinais clínicos menos pronunciados foram opacificação de córnea (8%) e ceratoconjuntivite (28%). Além dos sinais clínicos propostos por Silva *et al.* (2017), foi averiguado que apenas 2% dos animais apresentavam cegueira e paresia de patas.

Os dados clínicos dos cães foram utilizados para elaboração de um escore clínico onde foram atribuídos valores de 0, 1 e 2 para cada sinal clínico. Os valores obtidos por cada animal foram somados para obtenção do escore, cujo intervalo possível foi de 0-19 pontos, conforme descrito em Material e Métodos e os valores de escore observados nesse estudo variaram entre 2 e 17 pontos (Tabela 2) na população canina, evidenciando heterogeneidade clínica substancial e mediana igual 9. Esses valores de escore foram utilizados para comparações com resultados de testes sorológico RIFI (titulações de anticorpos), garantindo maior robustez às análises.

Os valores do escore clínico dos animais rurais e urbanos, fêmeas e machos foram comparados entre si, evidenciando medidas de frequência central com valores muito aproximados. Além disso, 97% dos animais eram sem raça definida, sendo os 3% restante pinscher.

Tabela 2: Tabulação e confecção de “Escore clínico” da população canina de zonas rurais e urbana

<u>Animais provenientes de Zona Urbana</u>																
Id	Aparên	Est Nut	Linfad	Mucosa	Hep/Esp	Pêlos	Le Fo/Or	Unhas	Le Cuta	Des Foc	Alopec	Blefar	Cerato	Opa Cór	TOTAL	
Máximo	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	2	1	19	
Cão 1	0	0	1	1	2	0	1	1	1	0	0	1	0	1	9	
Cão 2	0	1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	10	
Cão 3	1	2	1	1	2	2	1	1	1	0	1	1	2	0	16	
Cão 4	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	14	
Cão 5	1	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	2	0	14	
Cão 6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	3	
Cão 7	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	0	13	
Cão 8	1	2	1	1	2	2	1	1	1	0	1	1	2	0	16	
Cão 9	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	4	
Cão 10	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	6	
Cão 11	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	1	0	1	0	13	
Cão 12	0	1	1	1	2	2	1	1	2	0	0	0	0	0	11	
Cão 13	0	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0	1	1	1	9	
Cão 14	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	1	1	2	0	15	
Cão 15	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	6	
Cão 16	0	1	1	0	2	0	1	1	1	0	1	1	1	0	10	
Cão 17	0	0	1	0	2	1	1	1	1	0	1	1	0	0	9	
Cão 18	1	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	7	
Cão 19	1	0	1	1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	8	
Cão 20	0	1	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	6	
Cão 21	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	
Cão 22	0	1	0	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	9	
Cão 23	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	5	

Id	Aparên	Est Nut	Linfad	Mucosa	Hep/Esp	Pêlos	Le Fo/Or	Unhas	Le Cuta	Des Foc	Alopec	Blefar	Cerato	Opá Cór	TOTAL
															L
Cão 24	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	14
Cão 25	0	0	1	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	5
Cão 26	0	0	0	1	2	0	1	1	0	0	0	1	1	0	7
Cão 27	1	0	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	0	12
Cão 28	0	1	0	1	2	2	1	1	1	0	1	1	1	0	12
Cão 29	0	1	1	1	2	0	1	1	1	0	1	1	1	0	11
Cão 30	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	5
Cão 31	1	1	1	1	2	2	1	0	1	1	0	1	1	0	13
Cão 32	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	13
Cão 33	1	2	1	1	2	2	1	1	1	0	1	1	1	1	16
Cão 34	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	4
Cão 35	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	4
Cão 40	0	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	8
Cão 41	0	1	1	0	2	0	1	1	1	1	0	1	0	0	9
Cão 42	0	0	1	0	2	0	1	1	1	0	1	0	0	0	7
Cão 43	0	1	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Cão 44	0	0	1	0	2	1	1	1	0	0	0	1	1	1	9
Cão 45	0	0	1	1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	7
Cão 46	1	1	1	0	2	2	1	1	1	0	1	1	0	0	12
Cão 47	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	11
Cão 48	1	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	13
Cão 49	0	2	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	9
Cão 50	0	1	0	0	2	0	1	1	2	0	0	1	0	0	8
Cão 51	0	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	0	0	10
Cão 52	0	1	1	0	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	10
Cão 53	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0	1	1	0	0	11

Animais provenientes de Zona Rural

Id	Aparên	Est Nut	Linfad	Mucosa	Hep/Esp	Pêlos	Le Fo/Or	Unhas	Le Cuta	Des Foc	Alopec	Blefar	Cerato	Opa Cór	TOTAL
Cão 36	1	2	0	1	0	2	1	1	1	0	1	1	1	1	13
Cão 37	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	10
Cão 38	1	1	1	1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	9
Cão 39	0	1	1	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	6
Cão 54	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	0	0	12
Cão 55	0	0	1	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	6
Cão 57	0	0	1	1	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	7
Cão 58	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
Cão 59	1	2	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	12
Cão 60	0	0	1	0	2	0	1	1	2	0	1	0	0	0	8
Cão 61	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Cão 62	0	0	1	0	2	0	1	1	2	1	1	0	0	0	9
Cão 63	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
Cão 64	1	0	1	0	2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	10
Cão 65	0	0	1	0	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	6
Cão 66	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	17
Cão 67	0	1	0	0	2	0	1	1	1	0	1	0	0	0	7
Cão 68	0	0	1	0	2	0	1	1	2	0	0	0	0	0	7
Cão 69	1	2	1	1	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	12
Cão 70	1	0	1	0	2	0	1	1	1	1	0	1	0	0	9
Cão 71	0	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0	1	1	0	8
Cão 72	0	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5
Cão 73	0	1	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	6
Cão 74	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	0	1	0	0	7
Cão 75	0	1	1	1	2	0	1	1	2	1	0	1	1	0	12
Cão 76	1	1	1	1	2	1	1	1	0	0	0	1	1	0	11
Cão 77	0	1	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	6

Id	Aparên	Est Nut	Linfad	Mucosa	Hep/Esp	Pêlos	Le Fo/Or	Unhas	Le Cuta	Des Foc	Alopec	Blefar	Cerato	Opa Cór	TOTAL
Cão 78	1	1	1	0	2	1	1	1	0	0	0	1	0	0	9
Cão 79	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	10
Cão 82	0	0	1	0	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	7
Cão 83	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	17
Cão 84	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	13
Cão 85	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	8
Cão 86	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	14
Cão 87	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	8
Cão 88	1	2	1	1	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	12
Cão 91	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	6
Cão 92	1	1	1	0	2	2	1	1	0	0	0	1	0	0	10
Cão 93	1	0	1	0	2	1	1	1	0	1	0	1	0	0	9
Cão 94	1	1	1	0	2	2	1	1	1	0	1	0	0	0	11
Cão 95	0	1	1	1	2	0	1	1	1	1	0	1	0	0	10
Cão 97	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	12
Cão 99	0	1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	12
Cão 101	1	2	1	1	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	12
Cão 102	1	1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	0	0	12
Cão 103	1	1	1	0	2	1	1	1	1	0	0	1	0	0	10
Cão 104	0	1	1	0	2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	8
Cão 105	0	1	1	0	2	0	1	1	0	1	1	0	0	0	8
Cão 106	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	1	1	0	0	13
Cão 107	0	1	1	1	2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	9
Cão 108	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	0	1	0	0	12

Id: Identificação; **Aparên:** Aparência; **Est Nut:** Estado nutricional; **Linfad:** Linfadenopatias; **Mucosa:** Mucosas Hipocoradas; **Hep/Esp:**hepatomegalia/esplenomegalia
Le Fo /Or: Lesão focinho/orelha; **Unhas:** Onicogribose; **Le Cuta:** Lesões cutâneas; **Alopec:** Alopecia; **Blefar:** Blefarite; **Cerato:** Ceratoconjutivite; **Opa Cór:** Opacificação de córnea.

4.2 Diagnóstico sorológico

Devido à grande variabilidade nos sinais clínicos apresentados, tornou-se fundamental a confirmação da infecção e o estabelecimento preciso do diagnóstico por técnicas laboratoriais, pois mesmo os animais assintomáticos são fontes de infecção aos vetores (Molina *et al.*, 1994) e o controle desses reservatórios é um dos pilares do controle da LV em humanos.

Os soros dos animais foram reanalisados pelas técnicas de DPP, RIFI e ELISA no Laboratório de Leishmanioses, ICB, UFMG, onde 99% apresentaram sororreatividade em pelo menos um teste. A técnica de DPP foi a que demonstrou maior positividade nos resultados, sugerindo exposição ao agente infeccioso em 95% da população amostral, consequentemente, 5% dos cães foram negativos (Tabela 3).

Por meio dos resultados da RIFI foi constatado índices de sororeatividade de 76% dos cães, sendo 24% das amostras consideradas soronegativas. Entre os positivos, 82% apresentaram diluições reativas entre 1:40 e 1:320 e 18% das amostras demonstraram titulações elevadas, equivalentes ou superiores a 1:640 (Tabela 3), sendo a mediana da titulação 1:80.

Os resultados obtidos com a elaboração do escore clínico foram correlacionados com os correspondentes valores auferidos nas titulações de RIFI (Tabela 3) demonstrando presença de correlação, ou seja, quanto maior o escore maior a titulação de anticorpos, com significância estatística obtida nas análises de Kendall 0,225481 ($p= 0,002701$) e Spearman 0,30 ($p= 0,0021$).

Através de ensaio imunoenzimático, foi observado que 66% dos cães foram positivos e 34% negativos (Tabela 3). O ensaio imunoenzimático demonstrou sororeatividade (66%) menor quando comparada a RIFI (76%). Os animais negativos e indeterminados no ELISA, quando positivos na RIFI, apresentavam baixos títulos de anticorpos ($\leq 1:320$).

Tabela 3: Resultados dos testes sorológicos de DPP, ELISA e titulação dos anticorpos (RIFI) dos cães infectados.

Identificação	Sorologia			Identificação	Sorologia		
	DPP	ELISA	RIFI (Tit)		DPP	ELISA	RIFI (Tit)
Cão 1	Pos	Pos	1:160	Cão 51	Pos	Pos	1:160
Cão 2	Pos	Neg	1:80	Cão 52	Pos	Pos	1:2560
Cão 3	Pos	Pos	1:1280	Cão 53	Pos	Pos	1:2560
Cão 4	Pos	Pos	1:2560	Cão 54	Pos	Pos	1:2560
Cão 5	Pos	Pos	1:2560	Cão 55	Pos	Pos	1:160
Cão 6	Pos	Neg	Neg	Cão 57	Pos	Neg	1:40

Cão 7	Pos	Pos	1:640	Cão 58	Pos	Neg	1:80
Cão 8	Pos	Pos	1:1280	Cão 59	Pos	Neg	1:80
Cão 9	Pos	Pos	1:320	Cão 60	Pos	Pos	1:160
Cão 10	Pos	Pos	1:320	Cão 61	Neg	Neg	1:40
Cão 11	Pos	Pos	1:320	Cão 62	Pos	Pos	1:320
Cão 12	Pos	Pos	1:320	Cão 63	Pos	Neg	1:40
Cão 13	Pos	Pos	1:1280	Cão 64	Pos	Ind	1:320
Cão 14	Pos	Pos	1:320	Cão 65	Pos	Neg	Neg
Cão 15	Pos	Pos	1:40	Cão 66	Pos	Pos	1:40
Cão 16	Pos	Pos	1:640	Cão 67	Pos	Neg	Neg
Cão 17	Pos	Pos	1:40	Cão 68	Pos	Neg	1:80
Cão 18	Pos	Pos	1:1280	Cão 69	Pos	Neg	1:160
Cão 19	Pos	Pos	1:320	Cão 70	Pos	Pos	1:40
Cão 20	Pos	Pos	Neg	Cão 71	Pos	Neg	1:40
Cão 21	Pos	Pos	1:320	Cão 72	Neg	Neg	1:40
Cão 22	Pos	Pos	1:320	Cão 73	Pos	Neg	1:40
Cão 23	Pos	Neg	Neg	Cão 74	Pos	Pos	Neg
Cão 24	Pos	Pos	1:40	Cão 75	Pos	Pos	1:40
Cão 25	Pos	Pos	1:80	Cão 76	Pos	Neg	1:40
Cão 26	Pos	Neg	Neg	Cão 77	Pos	Ind	1:160
Cão 27	Pos	Pos	1:640	Cão 78	Pos	Neg	1:40
Cão 28	Pos	Pos	1:640	Cão 79	Pos	Pos	Neg
Cão 29	Pos	Pos	Neg	Cão 82	Pos	Pos	1:80
Cão 30	Pos	Pos	1:40	Cão 83	Pos	Pos	1:160
Cão 31	Pos	Pos	1:80	Cão 84	Pos	Pos	1:40
Cão 32	Pos	Pos	1:320	Cão 85	Pos	Neg	Neg
Cão 33	Pos	Pos	1:80	Cão 86	Pos	Neg	Neg
Cão 34	Pos	Neg	Neg	Cão 87	Pos	Neg	Neg
Cão 35	Pos	Pos	1:40	Cão 88	Pos	Neg	1:80
Cão 36	Pos	Pos	1:320	Cão 91	Pos	Neg	Neg
Cão 37	Pos	Pos	1:320	Cão 92	Pos	Neg	Neg
Cão 38	Pos	Pos	1:320	Cão 93	Pos	Neg	Neg
Cão 39	Pos	Pos	1:160	Cão 94	Pos	Pos	1:40
Cão 40	Pos	Pos	1:320	Cão 95	Pos	Neg	Neg
Cão 41	Pos	Pos	1:160	Cão 97	Pos	Neg	Neg
Cão 42	Pos	Pos	1:1280	Cão 99	Pos	Pos	1:40
Cão 43	Pos	Pos	1:40	Cão 101	Pos	Neg	1:160
Cão 44	Pos	Pos	1:80	Cão 102	Neg	Pos	Neg
Cão 45	Pos	Pos	1:640	Cão 103	Neg	Neg	Neg
Cão 46	Pos	Pos	1:1280	Cão 104	Pos	Pos	Neg
Cão 47	Pos	Neg	1:40	Cão 105	Pos	Pos	Neg
Cão 48	Pos	Pos	1:640	Cão 106	Pos	Pos	1:640
Cão 49	Pos	Neg	1:40	Cão 107	Pos	Neg	1:320
Cão 50	Pos	Neg	Neg	Cão 108	Neg	Pos	Neg

Pos: Positivo; **Neg:** Negativo; **Tit:** Titulação de anticorpos

Quando comparadas, as técnicas sorológicas de RIFI e ELISA apresentaram resultados negativos relativamente aproximados, 24% e 34%, respectivamente, e dentre esses, 16 (16%) animais são negativos em ambas as técnicas. O compartilhamento simultâneo de sororeatividade entre RIFI e ELISA por 58 animais (Figura 6); somando-se os negativos (58+16=74), salientaram uma proporção de concordância de 0,74 (74%) entre as técnicas e o Kappa (K) Cohen's evidenciou uma concordância leve/fraca (K=0,376, p=0,000107*), conforme exposto na Tabela 4.

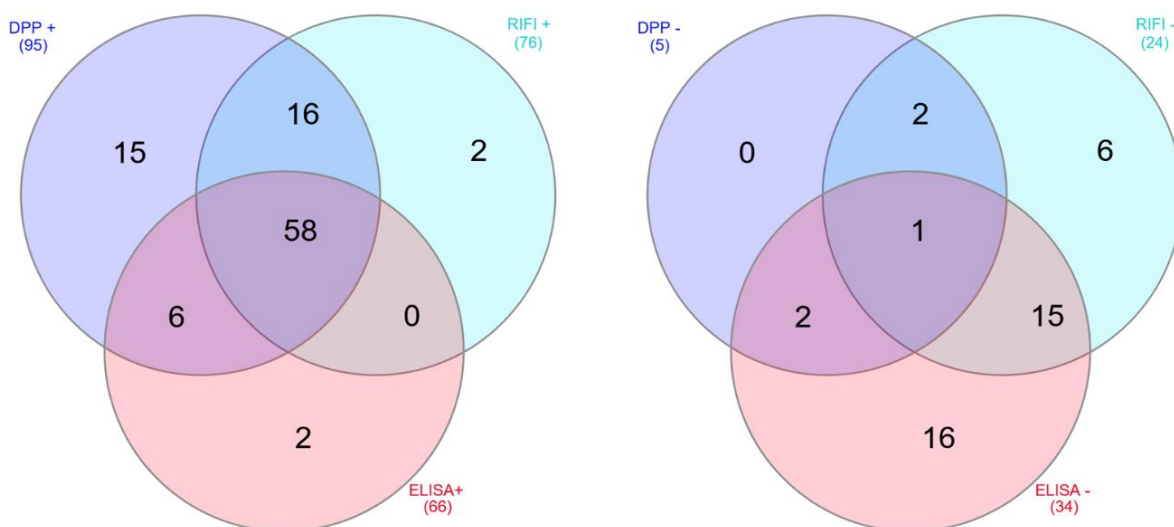


Figura 6: Diagrama de Venn demonstrando o compartilhamento de soropositividade (esquerda) e soronegatividade (direita) entre os resultados das técnicas de DPP, RIFI e ELISA.

Os resultados das técnicas DPP-RIFI e DPP-ELISA quando confrontados exibiram o compartilhamento de 74 e 64 resultados positivos, respectivamente, e 3 negativos (Figura 6), permitido auferir proporções de concordância de 0,77 e 0,67 respectivamente. As análises de concordância Kappa (Tabela 4) entre DPP-RIFI e DPP-ELISA denotaram ausência de embasamento estatístico que permitam inferências de afirmativas de concordância entre os resultados exibidos na execução de ambas as técnicas ($p > 0,05$, sem significância estatística).

Comparações entre os resultados das técnicas de diagnóstico sorológico (DPP, RIFI e ELISA), exibiram uma proporção de concordância de 0,59 e o Fleiss' Kappa (0,176) enaltecendo uma concordância ruim entre os resultados, ou seja, a concordância entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas é ruim, mas não se deu ao acaso.

Tabela 4: Análise de Coeficiente Kappa dos testes sorológicos

MÉTODOS	N	Cohen's Kappa	Proporção de concordância	p-value
RIFI x ELISA	100	0,376	0,74	0,000107*
DPP x ELISA	100	0,073	0,67	0,208
DPP x RIFI	100	0,135	0,77	0,0531
Fleiss' Kappa				
DPP x RIFI x ELISA	100	0,176	0,59	0,00227*

*p dif esta significato (<0,05)

4.3 Diagnóstico molecular e identificação de espécies circulantes

O material genético extraído dos fragmentos de pele de orelha e baço e dos aspirados de MO foram submetidos a PCR-ITS1 e evidenciaram a presença de DNA de protozoários do gênero *Leishmania spp* em 72% dos cães (Tabela 5), em pelo menos uma amostra clínica.

Tabela 5: PCR-ITS1 de aspirados de medula óssea, fragmentos de pele de orelha e baço

Identificação	PCR-ITS1			Identificação	PCR-ITS1		
	Pele	Baço	MO		Pele	Baço	MO
Cão 1	Pos	Pos	Neg	Cão 51	Pos	Pos	Pos
Cão 2	Pos	Neg	Neg	Cão 52	Pos	Pos	Pos
Cão 3	Pos	Pos	Pos	Cão 53	Pos	Pos	Pos
Cão 4	Pos	Pos	Pos	Cão 54	Pos	Pos	Pos
Cão 5	Pos	Pos	Pos	Cão 55	Neg	Pos	Pos
Cão 6	Neg	Neg	Neg	Cão 57	Pos	Pos	Pos
Cão 7	Pos	Pos	Pos	Cão 58	Pos	--	--
Cão 8	Pos	Pos	Pos	Cão 59	Neg	--	--
Cão 9	Pos	Pos	Neg	Cão 60	Pos	--	--
Cão 10	Pos	Pos	Pos	Cão 61	Neg	--	--
Cão 11	Pos	Pos	Pos	Cão 62	Pos	--	--
Cão 12	Pos	Neg	Neg	Cão 63	Neg	--	--
Cão 13	Pos	Pos	--	Cão 64	Neg	--	--
Cão 14	Pos	Pos	Pos	Cão 65	Neg	--	--
Cão 15	Pos	Pos	Pos	Cão 66	Pos	--	--
Cão 16	Pos	Pos	Pos	Cão 67	Pos	--	--
Cão 17	Pos	Pos	Pos	Cão 68	Neg	--	--

Cão 18	Pos	Pos	Pos	Cão 69	Neg	--	--
Cão 19	Pos	Pos	Pos	Cão 70	Pos	--	--
Cão 20	Pos	Pos	Pos	Cão 71	Neg	--	--
Cão 21	Pos	Neg	Neg	Cão 72	Neg	--	--
Cão 22	Pos	Pos	Neg	Cão 73	Neg	--	--
Cão 23	Pos	Neg	Pos	Cão 74	Pos	--	--
Cão 24	Pos	Neg	Pos	Cão 75	Neg	--	--
Cão 25	Pos	Pos	Pos	Cão 76	Neg	--	--
Cão 26	Pos	Neg	Neg	Cão 77	Pos	--	--
Cão 27	Pos	Pos	Pos	Cão 78	Pos	--	--
Cão 28	Pos	Pos	Pos	Cão 79	Neg	--	--
Cão 29	Pos	Neg	Pos	Cão 82	Pos	--	--
Cão 30	Neg	Pos	Pos	Cão 83	Pos	--	--
Cão 31	Pos	Pos	Pos	Cão 84	Pos	--	--
Cão 32	Pos	Pos	--	Cão 85	Neg	--	--
Cão 33	Pos	Pos	Pos	Cão 86	Neg	--	--
Cão 34	Pos	Neg	Neg	Cão 87	Neg	--	--
Cão 35	Pos	Pos	Pos	Cão 88	Neg	--	--
Cão 36	Pos	Pos	Pos	Cão 91	Neg	--	--
Cão 37	Pos	Pos	Neg	Cão 92	Neg	--	--
Cão 38	Neg	Pos	Pos	Cão 93	Neg	--	--
Cão 39	Neg	Pos	Neg	Cão 94	Pos	--	--
Cão 40	Pos	Pos	Neg	Cão 95	Neg	--	--
Cão 41	Pos	Neg	--	Cão 97	Neg	--	--
Cão 42	Pos	Neg	Neg	Cão 99	Pos	--	--
Cão 43	Neg	Pos	Neg	Cão 101	Pos	--	--
Cão 44	Pos	Pos	Neg	Cão 102	Neg	--	--
Cão 45	Pos	Pos	Pos	Cão 103	Pos	--	--
Cão 46	Pos	Pos	Pos	Cão 104	Neg	--	--
Cão 47	Neg	Pos	Neg	Cão 105	Neg	--	--
Cão 48	Pos	Pos	Pos	Cão 106	Pos	--	--
Cão 49	Pos	Neg	Pos	Cão 107	Neg	--	--
Cão 50	Pos	Pos	Neg	Cão 108	Neg	--	--
MO: medula óssea; Pos: positivo; Neg: negativo; -- não coletado.							

A PCR-ITS1 de DNA proveniente do baço demonstrou percentualmente, 78,6% (44/56), a mais expressiva positividade entre as espécimes clínicas. A PCR de material genético provindos de MO e pele de orelha confirmaram a infecção em 67,9% (36/53) e 66% (66/100) dos animais (Tabela 5), respectivamente.

Os resultados da técnica de PCR (Tabela 5) corroboraram com os resultados obtidos nas técnicas de DPP, RIFI, ELISA (Tabela 3), onde o partilhamento de resultado diagnóstico idênticos entre as técnicas foi de 75% (71 positivos e 4 negativos), 78% (63 positivos e 15 negativos) e 80% (59 positivos e 21 negativos) respectivamente (Figura 7). A partir das

referidas constatações, calculou-se o Fleiss Kappa das técnicas (PCR, DPP, RIFI, ELISA), constatando-se o seguinte: a concordância entre os resultados dos diferentes métodos diagnósticos foi leve, Kappa: 0,293 ($p= 6,54 \cdot 10^{-13}$), não podendo ser a concordância atribuída ao acaso.

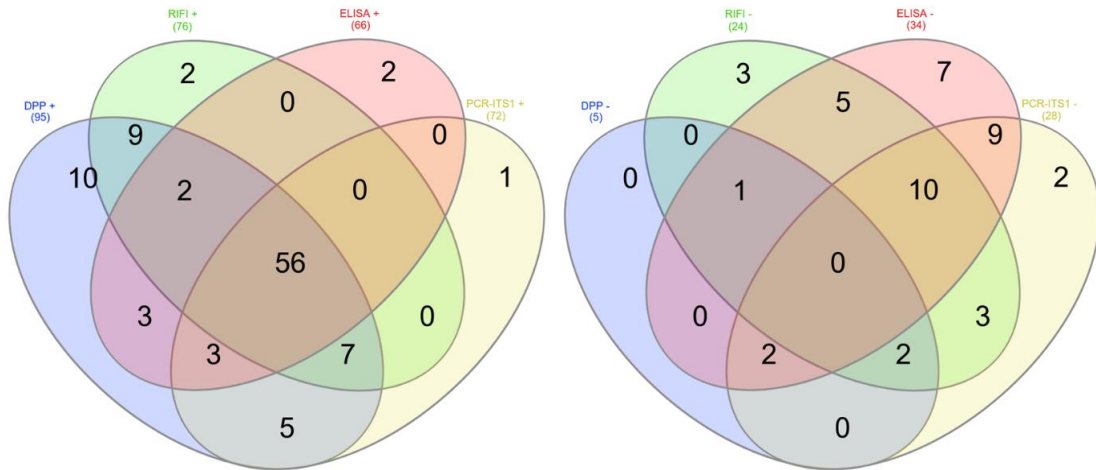


Figura 7: Diagrama de Venn evidenciando o partilhamento de positividade e negatividade nos resultados das técnicas de DPP, RIFI, ELISA e PCR.

As amostras de tecidos e de isolados de cultura PCR-ITS1 positivas foram submetidos a RFLP para caracterizar as espécies circulantes entre os animais naturalmente infectados recolhidos no município de Januária, onde em todas as amostras PCR positivas (72%) foi identificada a espécie de *L. infantum*. Perfis de restrição representativos das amostras de pele de orelha, evidenciaram a presença de *L. infantum*, que caracteriza-se pela presença de 3 bandas (55, 72, e 184 pb) no gel de poliacrilamida. O perfil de restrição de *L. amazonensis* é caracterizado por 2 fragmentos de DNA de 186 e 142 pb (Figura 8).

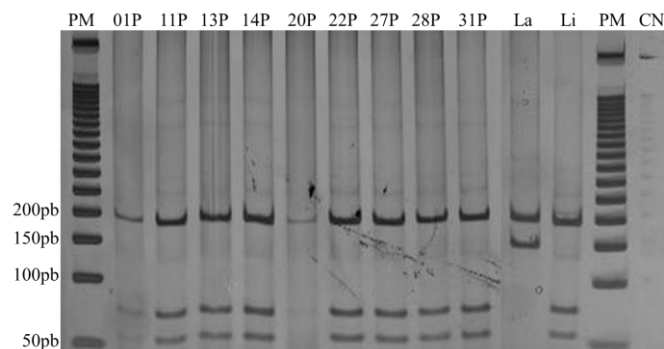


Figura 8: Gél de poliacrilamida 6%, corados por prata com a PCR-RFLP, perfis de restrição do fragmento de ITS1 (enzima *HaeIII*). PM - marcador de peso molecular de 50 pb; 01P a 31P – amostras de fragmento de pele; La – *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8); Li – *Leishmania infantum* (MCAN/BR/2000/BH400); CN – controle negativo.

A punção de medula óssea foi realizada em 97% da população amostral, pois 3 animais vieram a óbito durante o processo de anestesia. Os aspirados foram utilizados, primeiramente, na tentativa de estabelecer o isolamento e conseqüentemente o cultivo do parasito e o restante do material criopreservado para posterior extração de DNA. O isolamento parasitário foi logrado em 27,8% (27/97) dos cães positivos (critérios de inclusão), sendo 14 isolados urbanos/2017 e 13 rurais em diferentes regiões/distritos do extenso município de Januária (Tabela 6 e Figura 9).

Tabela 6: Identificação, data e área de coleta das amostras

Isolados	Data da coleta	Área		Distrito
		Urbano	Rural	
1	J04	set/17	Vila Viana	Januária
2	J05	set/17	Vila Paula	Januária
3	J10	set/17	Jussara	Januária
4	J14	set/17	Vila Viana	Januária
5	J16	set/17	Novo Milenio	Januária
6	J18	set/17	Novo Milenio	Januária
7	J25	set/17	Vila São João	Januária
8	J27	set/17	Jatobá	Januária
9	J28	set/17	Jussara	Januária
10	J34	set/17	Vila Jadete	Januária
11	J37	abr/18		P-P/Tocantins
12	J48	abr/18	São Vicente	Januária
13	J51	abr/18	Alvorada	Januária
14	J52	abr/18	Alvorada	Januária
15	J53	abr/18	Vila Levianopolis	Januária
16	J75	abr/19		Nova Odessa
17	J76	abr/19		Nova Odessa
18	J82	jul/19		Tocantins
19	J83	jul/19		Tocantins
20	J84	jul/19		Tocantins
21	J88	jul/19		Barreiro
22	J94	jul/19		Barreiro
23	J97	jul/19		Marreca
24	J99	jul/19		P-P/Tocantins
25	J101	jul/19		Levinópolis
26	J106	jul/19		Tábua
27	J107	jul/19		Tábua
		Isolado sequenciado		P-P: Pará-Pitanga

4.4 Sequenciamento e montagem do genoma

A presente investigação foi realizada com 20 isolados de *L. infantum* provenientes de cães domésticos naturalmente infectados em diferentes áreas e tempos (urbana- 2017 e rural - 2019), no município de Januária, Minas Gerais (Tabela 6 e Figura 9). O genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 v44 foi obtido no site <https://tritrypdb.org/tritrypdb/> e associado aos demais para realização de análises de genômica comparativa.

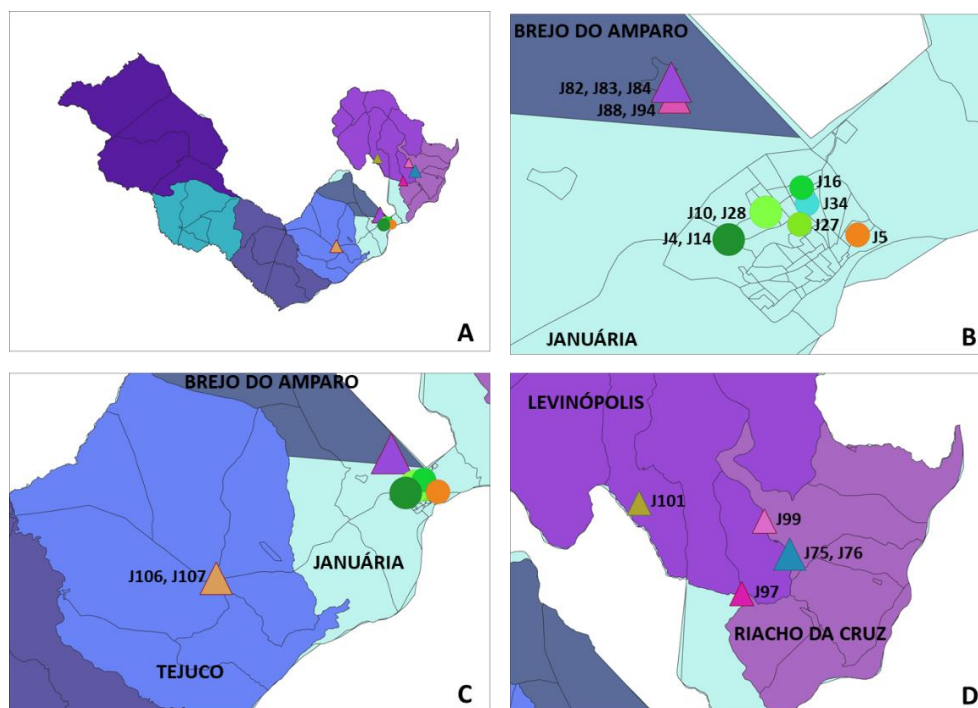


Figura 9: Localização geográfica dos 27 isolados. **A-** Mapa do município de Januária com suas divisões distritais, bem como a localização dos isolados urbanos/2017 (círculos) e rurais/2019 (triângulos). **B-** Identificação e localização dos isolados urbanos (círculos) e do distrito rural de Brejo de Amparo (triângulos). **C-** Identificação e localização dos isolados do distrito rural do Tejuco (triângulo). **D-** Identificação e localização dos isolados do distrito rural de Levinópolis (triângulos).

4.4.1 Análise das *reads* e percentagem das *reads* mapeadas

As promastigotas de cultura dos 20 isolados caninos selecionadas tiveram seu genoma sequenciado utilizando a plataforma *Illumina*. Todas as *reads* demonstraram qualidade satisfatória de sequenciamento e escore de qualidade de bases sequenciadas superiores a 30, conforme representado na Figura 10. As *reads* provenientes do *raw data* apresentaram percentagem de conteúdo GC entre 58-59% e 58-61% nos isolados urbanos/2017 e rurais/2019, respectivamente.

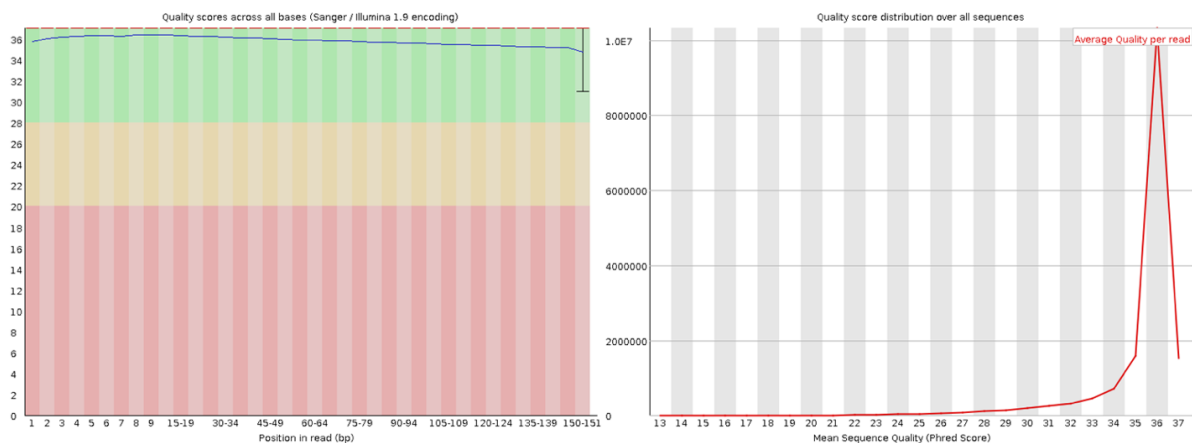


Figura 10: Representações gráficas das avaliações de qualidade das *reads* sequenciadas, originadas através das análises de FastQC. Qualidade de sequenciamento por bases sequenciadas (à esquerda) e escore da distribuição da qualidade das sequências/*reads* (à direita), representando um genoma/isolado.

O mapeamento das *reads* de todos os isolados no genoma de referência evidenciou percentagens superiores a 92% (Tabela 7), excetuando-se o isolado J88 cuja percentagem foi de 85.89% das *reads* alinhadas.

Tabela 7: Número de *reads* sequenciadas e mapeadas no genoma de referência

	Identificação dos isolados	Total de <i>reads</i> sequenciadas	Total de <i>reads</i> mapeadas no genref	Total de <i>reads</i> mapeadas de genref (%)
01	J04 (ZU)	19.763.975	18.272.975	92,46
02	J05 (ZU)	19.377.226	17.887.836	92,31
03	J10 (ZU)	21.174.453	19.503.086	92,11
04	J14 (ZU)	17.491.651	16.921.114	96,76
05	J16 (ZU)	15.316.689	14.888.425	97,20
06	J27 (ZU)	14.347.851	13.904.003	96,91
07	J28 (ZU)	19.524.211	17.991.680	92,15
08	J34 (ZU)	14.620.191	14.205.940	97,17
09	J75 (ZR)	24.209.227	23.916.932	98,79
10	J76 (ZR)	23.426.165	21.590.180	92,16
11	J82 (ZR)	22.828.548	22.578.898	98,91
12	J83 (ZR)	23.649.396	23.481.612	99,29
13	J84 (ZR)	20.307.366	20.166.914	99,31
14	J88 (ZR)	22.056.727	18.944.564	85,89
15	J94 (ZR)	23.732.491	23.623.118	99,54
16	J97 (ZR)	24.160.757	23.953.397	99,14
17	J99 (ZR)	24.184.760	24.048.828	99,44
18	J101 (ZR)	23.579.875	23.421.073	99,33
19	J106 (ZR)	24.712.045	24.483.626	99,08
20	J107 (ZR)	23.458.045	22.128.668	94,33

genref: genoma de referência; **ZU:** zona urbana; **ZR:** zona rural.

4.4.2 Variação do número de cópias cromossômicas (CCNV)

O genoma referência apresenta 32.803.248pb, distribuídos em 36 cromossomos, cujos tamanhos variam entre 278.267pb (cromossomo 1) a 2.743.073pb (cromossomo 36).

Os genomas analisados, via de regra, no município de Januária, independente de localização e/ou temporalidade desmonstraram padrão disforme de cromossomos extranumerários (Figura 11).

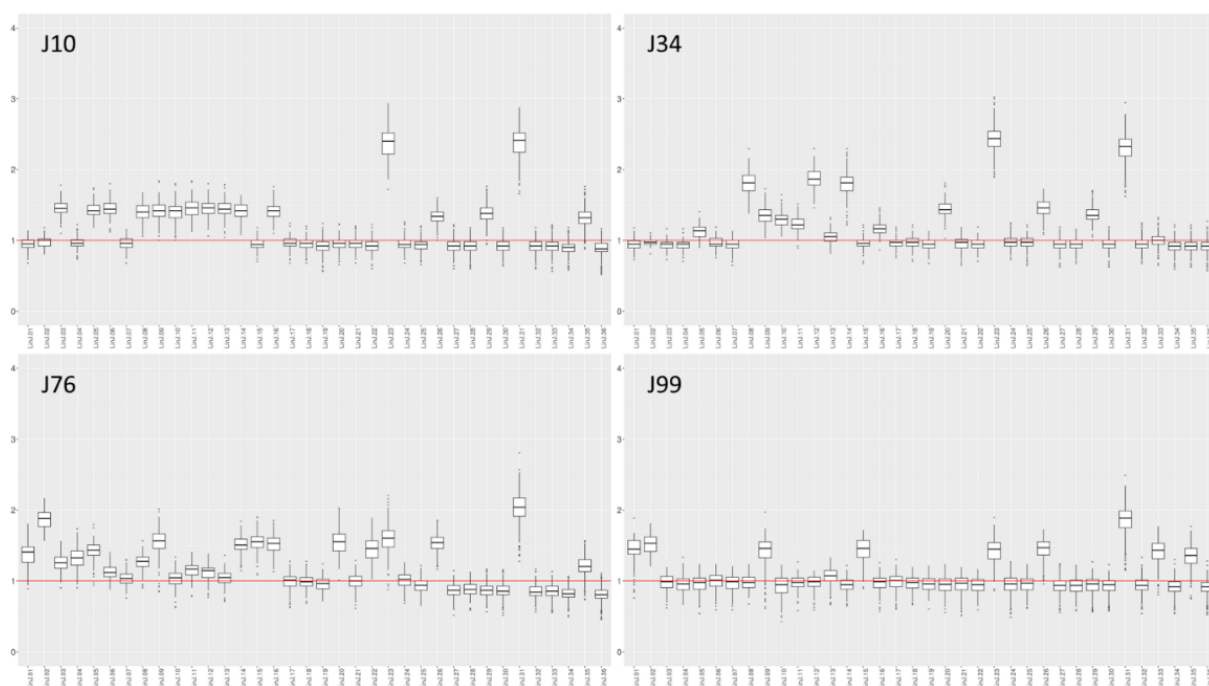


Figura 11: Estimativa de CCNV em isolados representativos de Januária. O eixo *x* refere-se aos 36 cromossomos do genoma de *L. infantum* (1-36) e o eixo *y* ao número de cópias cromossômicas. O traço em vermelho simboliza a mediana de ploidias para cada um dos isolados. Gráficos J10 e J34 representam isolados urbanos/2017; e J76 e J99 cepas rurais/2019.

A polissomia do cromossomo (ch) 31 foi evidenciada em todos os 20 genomas sequenciados e o padrão tendenciosamente dissômico averiguado em 10 cromossomos (07, 17, 19, 24, 25, 27, 28, 30, 34, 36) constituintes do genoma de *L. infantum* (Figura 12), como frequentemente observado. Apenas o ch 31 do isolado J27 apresentou número superiores a pentassomia.

Entre os 8 isolados urbanos/2017 heterogeneidade de ploidia foi consideravelmente maior, quando comparados aos 12 genomas rurais/2019 (Figura 12), onde os cromossomos 08, 26 e 29 apresentam variações intermediárias superiores a dissomia em todas as linhagens

urbanas e o isolado J10 demonstrou alterações de ploidia em 16 cromossomos. Todas as cepas, salvo o isolado J10, apresentaram polisomia no ch 20.

Nos 12 isolados rurais/2019 foi averiguado menor variância quanto ao número de cópias cromossômicas, onde os ch 31 e 35 demonstraram padrão extra-numérico (Figura 12). O ch 33 exibiu polissomia em 9/11 dos isolados rurais/2019 (exceto 76 e 82).

Assim como o ch 31, o ch 23 exibiu alterações notáveis, onde a se caracterizou entre tri e pentassomia nos isolados urbanos/2019. Entre os isolados urbanos o ch 23 foi diploide no isolado J88, intermediário entre di e trissomia em J83, J94, J99, J97, J101, J106, J107, e intermediários entre tri e tetraploide em J82, J84, J75, J75. O ch 26 exibiu dissomia no isolado J107, valores intermediário entre tri e tetrassomia em J27, J75 e J88 e nos demais valores di e trissomia.

A visualização gráfica de CCNV dos 20 isolados considerados via *heatmap* (Figura 12) facilitou observações e comparações entre os dados obtidos, salientando a propensão a dissomia entre a grande maioria dos cromossomos, bem como, a polissomia do ch 31 em todos os genomas e do ch 23 no isolados urbanos/2017.

A análise de clusterização hierárquica baseada na ploidia predita de cada cromossomo de todos os isolados de *Leishmania* avaliados (Figura 12) revelou a existência de 2 *clusters* principais: 1º) *Cluster* urbano- constituído dos genomas urbanos/2017; 2º) *Cluster* rural: formado todas as cepas rurais/2019. Os isolados J76 e J107 apresentaram maior divergência aos 2 principais *clusters* formados.

A maior proximidade demonstrada entre as cepas rurais/2017 (Figura 12) foi averiguada entre cepas de mesmo distrito, como J97 e J101 do distrito Levinópolis, mas também entre cepas de distritos diferentes, tais como, Brejo do Amparo e Levinópolis (J88 e J99); Brejo do Amparo e Tejuco (J84 e J106).

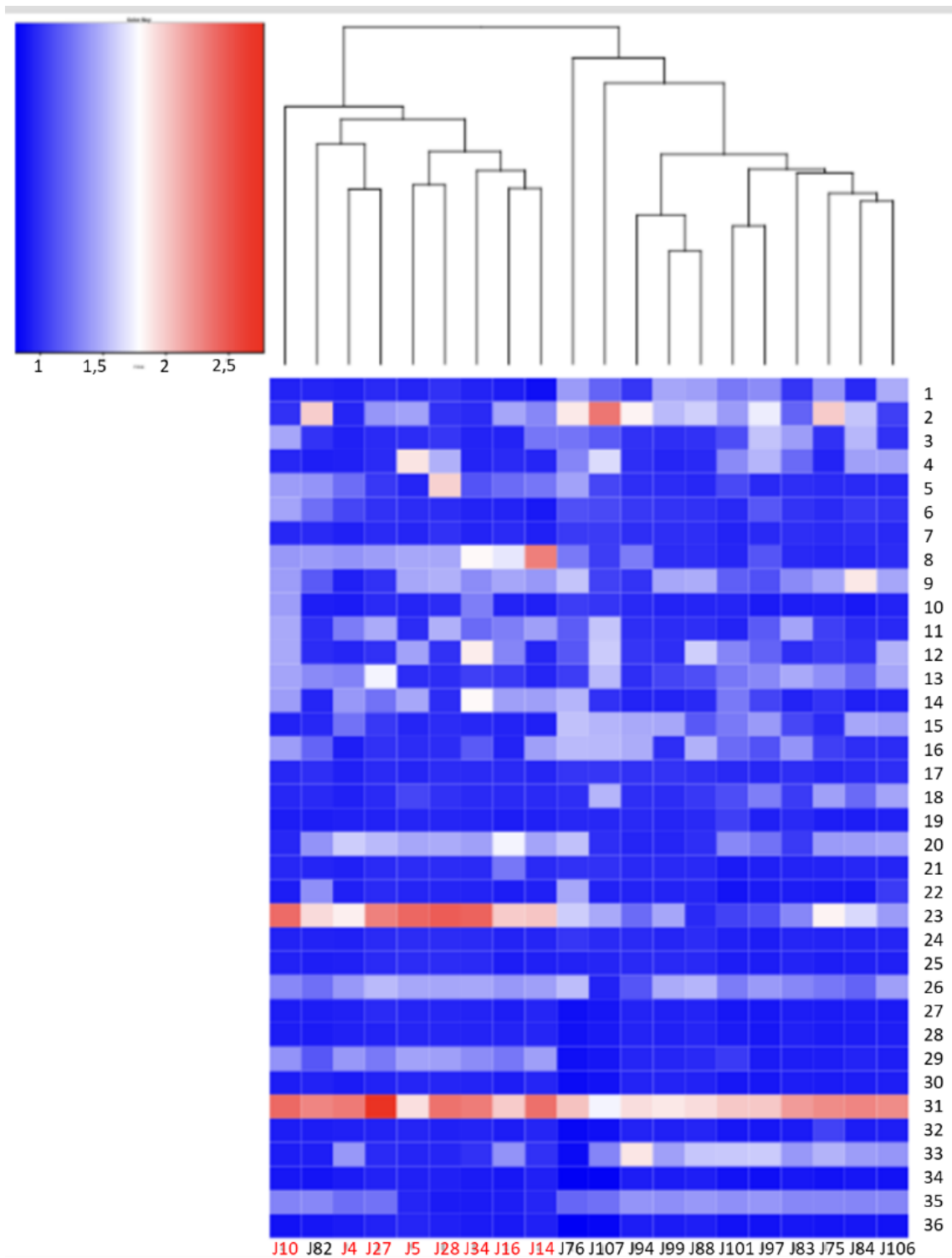


Figura 12: *Heatmap* com distribuição de CCNV de todos os isolados, diferentes localidades-temporalidade (urbano/2017 – rural/2019). Os isolados estão representados no eixo x e os cromossomos (1-36) no eixo y . No eixo X os isolados urbanos/2017 são representados em vermelho e os rurais/2019 em preto. A estimativa de variação de cópias cromossômicas para cada um deles estão apresentados por intensidade de cor que varia de azul, menor número de cópias, a vermelho, que representa um maior número de cópias.

Dentre os 36 cromossomos constitutivos de *L. infantum*, o cromossomo 23 foi o único supranumerário em todos os isolados urbanos/2017, permitindo a distinção do clado rural/2019 (Figura 12). Análises de enriquecimento gênico por ontologia foram utilizadas para identificar funções biológicas enriquecidas neste cromossomo quando comparado a todo o genoma. As análises revelaram enriquecimento gênico em 20 processos biológicas: processo de biossíntese de Acetil-Coa a partir de acetato; transporte de cátions; sinalização TORC2; processo metabólico de heme; processo de biossíntese de heme; transporte transmembrana de prótons; transporte de cátions inorgânicos monovalentes; transporte transmembrana de íons inorgânicos; transporte transmembrana de cátions inorgânicos; transporte transmembrana; modificação de peptidil-aminoácido; maturação de 5.8S rRNA; manutenção de rDNA; manutenção de elementos de repetição de DNA; transporte; estabelecimento de localização; isomerização de proteína peptidil-prolil; modificação de peptidil-prolina; transporte iônico (Tabela suplementar 1).

Dentre as funções enriquecidas, selecionamos aquelas que se apresentavam, no mínimo, 40 vezes mais presentes nesse cromossomo que o esperado, considerando esperado uma distribuição homogênea de todos os genes preditos entre os 36 ch de *L. infantum*, ou seja, naturalmente são funções mais representadas no ch23 e estatisticamente significativas nos isolados provenientes da área urbana/2017 com ploidia supranumérica desse cromossomo. Esse critério arbitrário destacou processos enzimáticos de conversão de acetato em acetil-Coa e degradação de Heme (Tabela 8).

Tabela 8: Resultado da Análise de Enriquecimento por Ontologia Gênica (GO) do Cromossomo 23

PROCESSOS BIOLÓGICOS (BP)						
Funções Enriquecidas	GO.ID.	Frequência de genes anotados	Frequência de genes esperados	Genes encontrados	Anotados /Esperados	
acetyl-CoA biosynthetic process from acetate	GO:0019427	2	0,04	2	50	
AMP binding	GO:0016208	2	0,05	2	40	
heme o metabolic process	GO:0048033	1	0,02	1	50	
heme O biosynthetic process	GO:0048034	1	0,02	1	50	

4.4.3 Análises de SNVs e a divergência genética

As análises de SNPs dos 20 isolados de Januária, quando comparados ao genoma de referência (JPCM5), demonstraram 99,99% de identidade, apresentando reduzido número de variantes de nucleotídeos únicos (SNV), com valores variáveis entre 814 e 987 SNVs em cada genoma (Tabela 9). O genoma do isolado J106 foi o que apresentou menor número de SNVs e os genomas que apresentaram maior número de variantes foram J97 e J84.

Tabela 9: Número de SNVs evidenciados no genoma de cada isolado em relação à cepa referência JPCM5

Isolado	SNVs	Isolado	SNVs	Isolado	SNVs
J04	893	J34	861	J94	844
J05	833	J75	843	J97	987
J10	856	J76	863	J99	820
J14	865	J82	832	J101	856
J16	830	J83	842	J106	814
J27	888	J84	938	J107	852
J28	836	J88	845		

Assim como observado no dendograma de ploidia, as análises de componente principal (PCA) baseada em todos os SNVs genômicos (Figura 13) e as análises filogenéticas baseadas nos SNVs divergentes (Figura 14), também evidenciaram a formação de duas subpopulações, relativamente bem delimitadas e distintas, sendo: 1º) *cluster* formado pelos isolados urbanos/2017 e, 2º) *cluster* constituído pelos isolados rurais/2019.

Os isolados rurais/2019 divergiram mais do genoma de referência quando se considerou a ocorrência de SNVs (Figura 13), contradizendo o menor polimorfismo encontrado nesse mesmo clado, na análise de CCNV (Figura 12), sugerindo assim, existência de significativa variação intra-populacional.

Nas análises de PCA notáveis foram os isolados J84 e J97, mais discrepante no cluster rural/2019, destoando-se das posições comuns aos clusters formados, o que não foi averiguado confirmado na filogenia. Não foram averiguadas associações entre os agrupamentos e os dados clínicos dos animais.

Em suma, os 2 *clusters* principais formados foram caracterizados por temporalidade ou ano de coleta das espécimes clínicas (2017 e 2019) e/ou localização geográfica (urbana e rural), sendo o primeiro *cluster*, rural/2019 e o segundo urbano/2017, sugerindo interferências espaciais e/ou temporais nos processos evolutivos genômicos desse organismo.

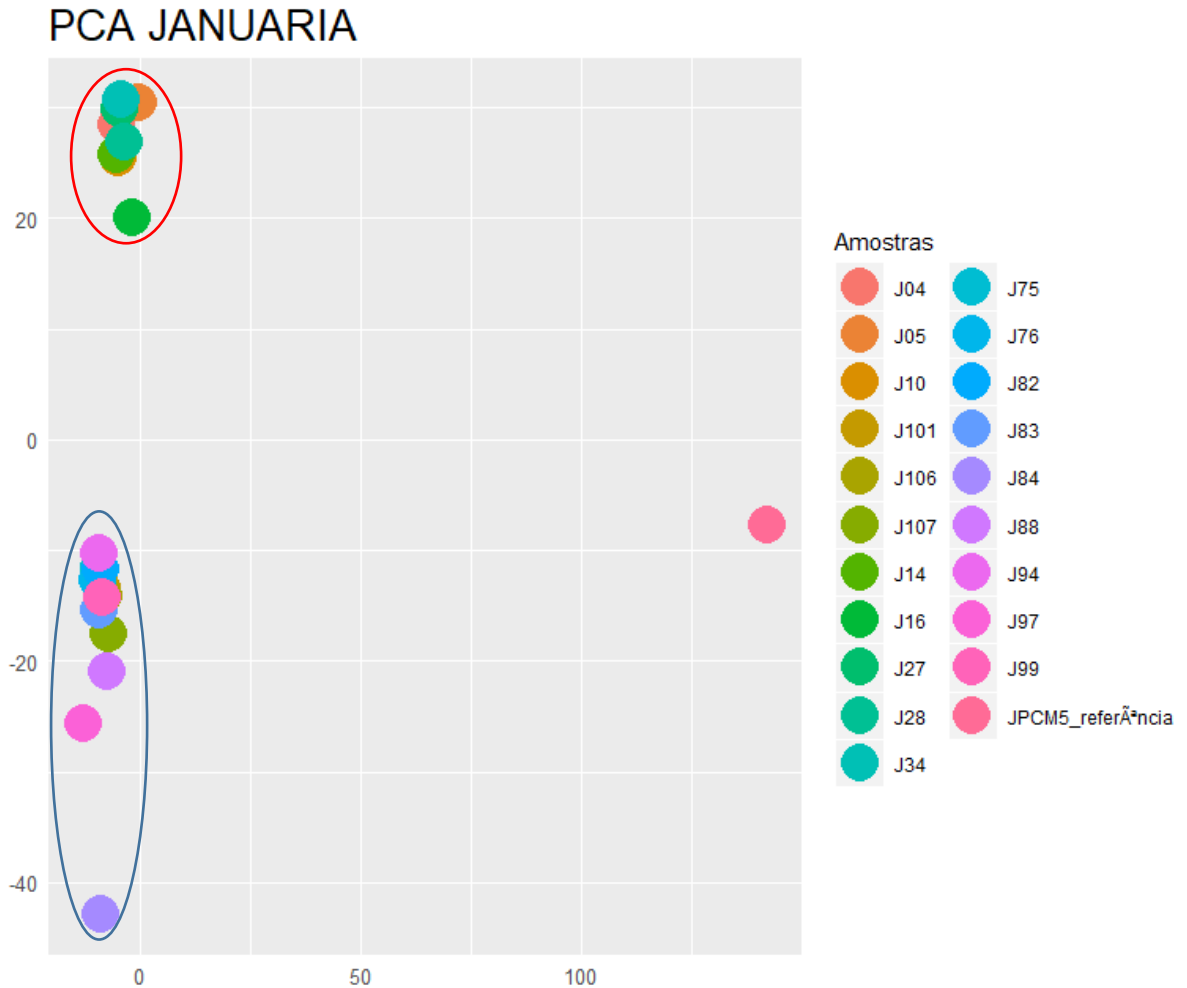


Figura 13: Análise de SNVs e divergência genética dos isolados. Cada círculo colorido refere-se a um isolado, conforme identificado na legenda à direita. Os eixos x e y representam a distância genética entre os isolados. O ponto rosa equivale ao genoma de referência de *L. infantum* JPCM5, proveniente de Madrid (1998), Espanha. Os isolados urbanos/2017 e os rurais/2019 encontram-se entre as elipses vermelhas e azul respectivamente.

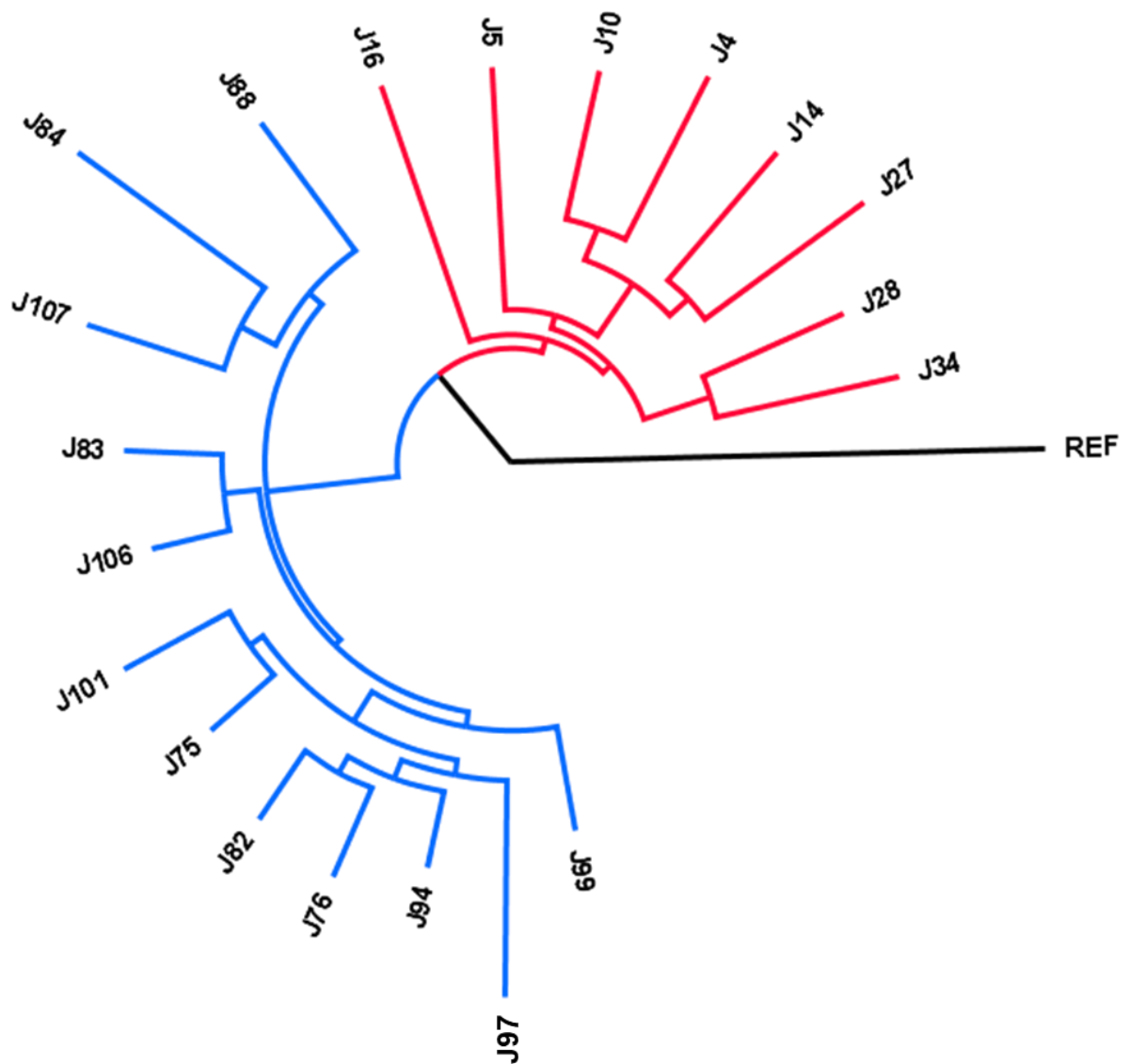


Figura 14: Árvore filogenética por máxima verossimilhança baseada nos SNVs divergentes identificados nos estudos de GATK. Os genomas dos isolados urbanos/2017 estão em vermelho e os rurais/2019 em azul. O ramo preto equivale ao genoma de referência de *L. infantum* JPCM5.

5 DISCUSSÃO

As sequências de DNA dos Tripanossomatídeos têm fornecido informações importantes sobre aspectos únicos da biologia e evolução desses eucariotos. O sequenciamento do genoma permite comparações inter e intra-espécies, análises sobre a patologia e tropismo do parasito, bem como, identificação e análise funcional de fatores de virulência, enzimas e possíveis candidatos à vacina, sendo essas informações cruciais para o desenvolvimento de novas terapias (Alasdair *et al.*, 2005).

Responsável pela grande maioria das infecções caninas é *L. infantum* (Lainson *et al.*, 2005; Gramiccia & Gradoni, 2005; MS, 2013; MS, 2017), sendo tal afirmação condizente com as investigações realizadas no presente estudo onde identificamos apenas a espécie de *L. infantum* em 72% da população canina amostral (n= 100).

A LVC é uma doença sistêmica que pode envolver potencialmente qualquer órgão, tecido ou fluido corporal (Baneth *et al.*, 2008). Infecção e doença clínica tem significados distintos, sendo elevada a prevalência de infecções subclínicas que, por ulterior quebra do equilíbrio (imunossupressão, co-infecção), podem evoluir clinicamente. As características clínicas da enfermidade são amplas, variáveis e inespecíficas, interferindo no diagnóstico (dificulta diagnóstico diferencial), prognóstico e na resposta ao tratamento (Baneth *et al.*, 2008; Solano Gallego *et al.*, 2009; Solano Gallego *et al.*, 2011).

As infecções por *L. infantum* em cães fomentam argumentações sobre manifestações clínicas sugestivas de LVC que remontam a clássicos artigos. Inicialmente, Pozio *et al.*, (1981) apresentaram uma classificação dessas manifestações e Mancianti *et al.*, (1988), com algumas modificações, categorizaram os animais em assintomáticos, oligossintomáticos (adenopatia linfóide, ligeira diminuição de peso e/ou pêlos opacos) ou sintomáticos. Posteriormente, foi sugerido uma classificação via estadiamento (4 estágios) baseada nas anormalidades clínico-patológicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009) e a definição de escores clínicos (Manna *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2017) com intuito de gerar dados cada vez mais informativos.

No presente estudo, foram relatados sinais clínicos em 100% dos animais. Os principais achados do exame físico clássico foram lesões de focinho e orelha, esplenomegalia, linfadenopatia, onicogrifose, hepatomegalia, entre outros (Figura 5 e Tabela II). Esses achados estão em conformidade com dados estabelecidos na literatura, tais como, as afirmativas de predominância de lesões cutâneas nos animais sintomáticos (Bettini & Radoni, 1986; Mancianti *et al.*, 1988; Reis *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2008; Sollano Gallego *et al.*, 2009, Reis *et al.*,

2009, Silva *et al.*, 2017). Os sinais também observados de ceratoconjuntivite, mucosa hipocorada, despigmentação do focinho, estado nutricional comprometidos, onicogrifose, pêlos opacos e blefarite apresentaram, previamente, forte associação com cães já diagnosticado com LVC (Silva *et al.*, 2017). A presença de alterações nos tecidos descritos, possivelmente afetaria sua homeostase, como demonstrado em longos estudos de acompanhamento de cães. Nos estudos de Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007 foi verificado que cães sintomáticos albergariam maior carga parasitária no fígado, baço, linfonodo e pele quando comparados a cães assintomáticos. Por outro lado, estudos de Reis *et al.*, (2006; 2009) confirmam o elevado parasitismo cutâneo e do baço independentemente da existência de sinais clínicos.

Em áreas endêmicas são encontrados cães doentes e assintomáticos, sendo os cães sem sinais clínicos pronunciados classificados em: resistentes a infecção produtiva; potenciais desenvolvedores de doença clínica e cães não infectados (Solano-Gallego *et al.*, 2000, Solano-Gallego *et al.*, 2001). Os mecanismos responsáveis pela resistência ou susceptibilidade do cão à infecção e à doença clínica não são bem conhecidos, nem a associação de fatores como sexo, idade, nutrição, genética do hospedeiro, coinfeções e/ou doenças concomitantes, imunossupressão, ambiente de citocinas, carga parasitária, virulência que pudessem afetar a intensidade das manifestações clínicas da infecção por *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Além disso, infecções experimentais caninas mostraram como a inoculação de parasitos em diferentes estágios e vias de administração conduziram a manifestações clínicas divergentes.

Os animais resistentes parecem apresentar uma resposta imunológica predominantemente celular (Th1), com baixo parasitismo e animais susceptíveis, uma resposta humoral (Th2) com elevado parasitismo (Solano-Gallego *et al.*, 2001. Solano-Gallego *et al.*, 2011), sendo que o desenvolvimento de resposta imune humoral (IgG) não confere, necessariamente, imunoproteção (Slappendeland & Ferrer, 1998; Reis *et al.*, 2006). Nesse sentido, os estudos de Reis *et al.* (2009) confirmam que animais com doença ativa progressiva são caracterizados por acentuada resposta humoral e depressão na resposta imune celular. Os achados de Reis *et al.* (2006) sugerem que níveis aumentados de linfócitos T CD8+ CD5+ são as principais características fenotípicas da doença assintomática, bem como, níveis aumentados IgG1 em cães assintomáticos e IgG e IgG2 em sintomáticos, quando ambos os grupos são comparados. Sucintamente, o perfil de citocinas em cães resistentes está diretamente relacionado ao desenvolvimento de resposta Th1 (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) e animais susceptíveis

à LVC, resposta Th2, com predomínio de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Nas infecções caninas assintomáticas (resistentes), a sensibilidade de detecção de anticorpos geralmente encontra-se reduzida (Leontides *et al.*, 2002). Os animais susceptíveis sintomáticos geralmente apresentam níveis mais elevados de anticorpos, sororeagindo com mais acurácia nas técnicas de diagnóstico sorológicas (Deplazes *et al.*, 1995; Sollano-Gallego *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Assim sendo, a sorologia é considerada uma técnica sensível, útil e conclusiva no diagnóstico de LVC sintomático (Solano-Gallego *et al.*, 2009), sendo a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por diferentes métodos consideradas abordagens diagnósticas extremamente apropriadas para identificação de infecções (Reis *et al.*, 2006, Solano-Gallego *et al.*, 2009). A titulação de anticorpos pode inclusive ser utilizada como preditor de possível progressão clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Os títulos de anticorpos podem se correlacionar positivamente com a intensidade dos sinais clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2001*, Reis *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2009) e com parasitismo (Reis *et al.*, 2006, Solano-Gallego *et al.*, 2009). Refutado em parte, o estudo de Courtenay *et al.*, 2002 com cães sugeriram a titulação de anticorpos e os sinais clínicos como os melhores preditores de infecciosidade, porém erroneamente afirmando não haver cães infectados antes da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* (IgG).

Embora em menor número, os relatos discordantes entre manifestação clínica e resposta imune existem dependendo da técnica de diagnóstico usada. Alguns destes estudos, mostraram que a presença de sinais clínicos apresentou baixo impacto no desempenho dos testes DPP e ELISA, sendo mais significativamente associada ao ensaio de RIFI (Mendonça *et al.*, 2017) ou que exista possibilidade de testagem negativa nesses animais (Solano-Gallego *et al.*, 2001*).

Em nosso estudo, a quase totalidade dos cães (99%) apresentaram sororeatividade em pelo menos uma das técnicas sorológicas (DPP, RIFI, ELISA), onde apenas o cão 103 exibiu ausência de reatividade nesses testes (Tabela 3). Esses dados reforçam a hipótese de que cães sintomáticos demonstram elevada reatividade em técnicas sorológicas, uma vez que, 100% dos animais foram classificados como sintomáticos. Além disso, cada técnica demonstrou variações quanto ao número de sororreagentes. O mesmo foi observado nos estudos realizados na cidade de Montes Claros (norte de Minas Gerais) por Rocha *et al.* (2020), onde 8,5% dos cães (n= 6.667) foram positivos para DPP e ELISA e 9,6% apresentaram resultados sorodivergentes. Os autores descreveram ainda que cães com sorologia divergente seriam tão infectantes para o vetor (*Lu. longipalpis*) quanto cães positivos (DPP, ELISA). Outro estudo revelou a

discordância de diferentes técnicas em uma investigação sorológica e molecular de LVC no município de Alfenas, localizado na região sul de Minas Gerais, onde a doença não é endêmica. Dentre 87 amostras de soro mensuradas, 8 (9,2%) foram positivas pelo teste rápido DPP, mas apenas 4 (50%) confirmadas pelo ensaio de ELISA e 2 (25%) pelo teste de RIFI (Nunes *et al.*, 2016).

No presente estudo, os resultados do ensaio de DPP evidenciaram positividade de 95%, tendo sido considerada a mais robusta técnica sorológica (Tabela 3). Sua associação com as condições clínicas e epidemiológicas do animal são conclusivas para triagem da infecção e doença (Coura-Vital *et al.*, 2012). Grimaldi *et al.*, (2012) evidenciaram o bom desempenho do teste DPP que apresentou especificidade entre 92%-100%; e sensibilidade entre 93%-100%, variando de acordo com o estado clínico do cão (sintomáticos > assintomáticos). Coura-Vital *et al.*, (2014) relatam que a combinação dos antígenos recombinantes (rK39 e rK26) melhorou o desempenho do teste, onde a associação com rK26 conferiu ganhos na sensibilidade em cães com infecções recentes.

O uso de sinais clínicos na definição de escores clínicos permite a associação entre variáveis distintas, garantindo maior robustez nas análises. Os dados provenientes da confecção do escore clínico (Tabela 2) demonstraram presença de correlação com a titulação de anticorpos (Tabela 3), ou seja, quanto maior o escore maior a titulação de anticorpos (Kendall $p= 0,002701$ e Spearman $p= 0,0021$). A correlação entre os níveis de IgG e o estado clínico vem sendo pesquisada há tempos e uma correlação positiva relatada (Abranches *et al.* 1991; Oliveira *et al.* 1993; Reis *et al.*, 2006, Manna *et al.*, 2009). Foram também observados níveis aumentados de anticorpos anteriormente ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos, podendo esse marcador ser sugerido como fator prognóstico (Lanotte *et al.*, 1979). Nos estudos de Reis *et al.*, 2006 foi observada correlação positiva também entre os títulos de anticorpos e a carga parasitária. A confecção de escore clínico demonstrou grande poder discriminatório para segregar cães com LVC e erliquiose (*Ehrlichia canis*), pois cães com a segunda enfermidade apresentam pontuações menores, podendo ser utilizados diferentes pontos de corte (Silva *et al.*, 2017).

Por sua vez, o teste de ELISA foi o que demonstrou menor sororeatividade na população clinicamente afetada exibindo 66% de reatividade (Tabela 3). A reação de ELISA (antígeno bruto) apresenta boa sensibilidade também à infecções subclínicas e exibem especificidade levemente reduzida (Mettler *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Os animais negativos e indeterminados no ELISA (34%) e positivos na RIFI apresentavam baixos títulos de anticorpos

($\leq 1:320$) e os resultados não foram partilhados por 16% dos animais. Tal comparação evidencia o partilhamento dos resultados em 74 cães, sendo 16 negativos e 58 positivos (Figura 6).

A maior precisão de RIFI, quando comparado a ELISA também foi observado por Gradoni (2002), reconhecendo RIFI como teste mais sensível e específico. Contrariamente, Mettler *et al.* (2005), descreveram sensibilidade de ELISA (antígeno bruto) em cães sintomático (100%) e assintomáticos (94%) superior a RIFI (antígeno bruto), com valores de 90% e 70,6%, respectivamente. A especificidade nessas análises foi de 100% para RIFI e ELISA. Para fins confirmatórios de casos clinicamente suspeitos, a especificidade do teste é mais importante, enquanto uma alta sensibilidade seria essencial em programas de vigilância (Mettler *et al.*, 2005).

Existem muitos interferentes nos ensaios sorológicos, entre eles o período de incubação variável e muitas vezes longo (semana a meses), podendo comprometer a eficiência da identificação da exposição (anticorpos) em infecções recentes (Cardoso e Cabral, 1998; Reis *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Outro fator limitante que discutivelmente interfere na acurácia dos testes sorológicos é a prevalência da infecção na região, não sendo a sensibilidade e a especificidade propriedades estáveis e especialmente a segunda, fortemente influenciada pela prevalência da doença na região. Especificamente, quando a prevalência da doença aumenta, aumentam o número de resultados falso-positivos, afetando diretamente a especificidade da sorologia.

A associação dos resultados sorológicos analisados aos pares evidenciaram correlação fraca ($p=0,000107$, Tabela 4) entre os ensaios de ELISA e RIFI e associação entre todas as técnicas simultaneamente (DPP, ELISA, RIFI), correlação ruim ($p=0,00227$, Tabela 4). Esses resultados são aproximados ao observado nos estudos de Mendonça *et al.* (2017), onde a concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas de DPP, ELISA, RIFI entre outros, em Teresina (região de alta prevalência de LVC) e em Vitória (baixa prevalência), foram ruins ou razoáveis. Em altas prevalências apenas o par DPP-ELISA apresentou correlação razoável (fraca) e nenhuma análise obteve resultados excelentes. Por outro lado, excelente correlação foi observada entre os mesmos testes (pares) em regiões de menor prevalência da LVC, exceto as análises feitas com RIFI, na diluição 1:40 (Mendonça *et al.*, 2017).

A possibilidade de detecção de DNA específico do parasito nos tecidos através das técnicas de PCR melhorou bastante a sensibilidade e especificidade do diagnóstico parasitológico da LVC, podendo ser utilizado DNA genômico ou do cinetoplasto (kDNA). Os resultados devem contudo ser associados aos dados obtidos nas avaliações clínico-patológicas

e sorológicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011), pois cães PCR positivos assintomáticos, podem nunca desenvolver sinais e sintomas da doença (Oliva *et al.*, 2006, Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A presença de DNA de *Leishmania ssp* no sangue ou em outros tecidos de cães clinicamente saudáveis vivendo em áreas endêmicas indica que esses cães albergam o parasito (Solano-Gallego *et al.*, 2001*), bem como, sua identificação no pós-tratamento, infere sobre a quase impossibilidade de cura parasitológica (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

No presente estudo, os dados oriundos da técnica de PCR-ITS1 evidenciaram amplificação de material genético em 72% dos animais. A detecção do DNA proveniente do baço demonstrou percentualmente a mais expressiva positividade entre as espécimes clínicas analisadas, seguido de MO e pele de orelha (Tabela 5). A pele é uma reserva tecidual de parasitos em cães, o que parece corroborar com os aspectos biológicos do parasito, pois trata-se do tecido mais acessível ao vetor. Isto posto, infere-se que a biópsia de pele, seguido de PCR seja um método muito sensível para detectar infecções (Solano-Gallego *et al.*, 2001*). Posteriormente, pesquisadores apontam MO, linfonodos, baço, pele e conjuntiva como os tecidos mais apropriados para coleta de biopsia e realização de técnicas moleculares (Reis *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2009, Solano-Gallego *et al.*, 2011). Além disso, Reis *et al.*, (2006) descrevem baço e pele como órgãos com maior carga parasitária, quando comparados a MO, fígado e linfonodos, independentemente do estado clínico.

A concordância (Kappa) entre os resultados dos diferentes métodos sorológicos e moleculares foi leve ($p= 6,54 \cdot 10^{-13}$), não podendo ser a correlação atribuída ao acaso. Em consonância a PCR-ITS1 de sangue periférico ao ser correlacionada aos pares com as técnicas sorológicas de DPP, RIFI, ELISA em regiões de alta (Teresina, Piauí) e baixa prevalência (Vitória, Espírito Santo) de LVC, também demonstraram concordância fraca (Mendonça *et al.*, 2017).

Neste estudo realizamos o sequenciamento do genoma completo dos 20 isolados de *L. infantum* provenientes de cães domésticos naturalmente infectados em diferentes áreas e tempos (urbana/2017 e rural/2019) no município de Januária, Minas Gerais (Tabela 6 e Figura 09). Os genomas destes isolados foram comparados como o genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 v44, quanto à ocorrência de ploidia cromossômica e de SNVs.

A análise de clusterização hierárquica baseada na ploidia predita de cada cromossomo de todos os isolados avaliados (Figura 12) revelaram a existência de 2 *clusters* principais: 1º) *Cluster* exclusivamente urbano- constituído de todas os genomas urbanos/2017; 2º) *Cluster*

rural: formado por todas as cepas rurais/2019. Os isolados rurais J76 e J107 apresentaram maior divergência aos 2 principais *clusters* formados. A maior proximidade demonstrada entre as cepas rurais/2017 (Figura 12) foi averiguada entre cepas de mesmo distrito, como J97 e J101 do distrito Levinópolis, mas também entre cepas de distritos diferentes, tais como, Brejo do Amparo e Levinópolis (J88 e J99); Brejo do Amparo e Tejuco (J84 e J106).

Os genomas analisados, via de regra, no município de Januária, independente de localização e/ou temporalidade demonstraram padrão de aneuploidia único e disforme. O padrão predominantemente dissômico foi, entretanto, observado em 10 cromossomos (07, 17, 19, 24, 25, 27, 28, 30, 34, 36), consistente com os dados propostos por Lighthall & Giannini, 1992 que sugerem que a diploidia é constatada para a maioria dos cromossomos e a aneuploidia em alguns.

Os resultados apresentados por Teixeira *et al.*, 2017, analisando 20 isolados de *L. infantum*, no nordeste brasileiro demonstraram resultados aproximados, onde 13 cromossomos (07, 10, 17, 19, 21, 22, 24, 27, 28, 29, 30, 34, 36) apresentaram predomínio de dissomia. Dentre esses, 09 cromossomos também foram relatados como dissômicos no presente estudo. Nos estudos de Downing *et al.* (2011) 09 cromossomos (17, 18, 19, 21, 25, 28, 30, 34, 36) do genoma de *L. donovani* foram encontrados em dissomia, sendo 07 observados com mesma ploidia nesse estudo.

O gênero *Leishmania* é comumente considerado diplóide, embora variações de somia possam ocorrer em todos os cromossomos, promovendo heterogeneidade entre os clones (intra-cepa) e linhagens (inter-cepa). Estas alterações podem gerar variabilidade fenotípica que pode aumentar a habilidade do parasito de sobreviver em um determinado hospedeiro (Sterkers *et al.*, 2011; Reis-Cunha *et al.*, 2018). A identificação de aneuploidias em populações naturais reforça a noção de que alterações no número cromossômico não são causadas pela manutenção a longo prazo dos parasitas em cultura (Mannaert *et al.*, 2012; Reis-Cunha *et al.*, 2018) e que a aneuploidia não tem um alto custo para o *fitness* do parasito (Rogers *et al.*, 2011).

O ch 31, cuja polissomia foi evidente, atingiu os maiores números de ploidia em todos os isolados do presente estudo. A análise ontológica desse cromossomo supranumerário evidenciou enriquecimento em genes envolvidos no metabolismo do ferro e em outras funções moleculares relacionadas (Waller *et al.*, 2010). Os transportadores de ferro presentes parecem importantes para o crescimento e replicação da *Leishmania* e patologia da doença (Huynh *et al.*, 2006). As proteínas de Ferro-enzofre (Fe-S) são cruciais para a vida, mediando reações de oxi-redução durante o transporte de elétrons mitocondriais e estão envolvidas na síntese de

aminoácidos, biotina e ácido lipóico (Waller *et al.*, 2010). A elevação supranumérica do cromossomo 31 descrita nos diversos subgêneros e espécies do gênero *Leishmania* em condições naturais (Downing *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Valdivia *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2017; Valdívía *et al.*, 2017; Butenko *et al.*, 2019; Patino *et al.*, 2020) ou induzidas (Restrepo *et al.*, 2019; Shaw *et al.*, 2020) poderia favorecer uma elevação na dosagem gênica dos transcritos Fe-S e a absorção do ferro em ambientes de exposição a estresse-oxidativo (Valdivia *et al.*, 2015).

Assim como o ch 31, o ch 23 exibiu alterações notáveis, onde a ploidia se caracterizou entre tri e pentassomia nos isolados rurais/2019. Entre os isolados rurais/2019 o ch 23 foi dissômico no isolado J88, intermediário entre di e trissomia em J83, J94, J99, J97, J101, J106, J107, e intermediários entre tri e tetrassomia em J82, J84, J75, J75. O ch 26 exibiu dissomia no isolado J107, valores intermediário entre tri e tetrassomia em J27, J75 e J88 e nos demais valores entre di e trissomia.

Na análise de enriquecimento do ch 23, merecem destaque duas funções enriquecidas a função enzimática da *acetil-CoA sintetase* (AceCS) e a degradação de Heme, ambas nesse cromossomo, apresentando, no mínimo, 40 vezes mais genes com essas funções do que a frequência esperada. AceCS é uma enzima que cataliza a conversão de acetato a acetil-CoA. *Leishmania* spp tem um ciclo de vida complexo, se expondo a habitats hipóxicos ou anóxicos necessitando e contando com vias de síntese de ATP independentes do O₂, como as vias de formação de acetato como produto final da rota metabólica (Tielens *et al.*, 2002). Esta via foi observada em amastigotas intracelulares do gênero *Leishmania* (Rainey & MacKenzie, 1991) e cujos mecanismos bioquímicos já comprovaram alta utilização de ácidos graxos como fonte energética (Berman *et al.*, 1987). A *acetil-CoA sintetase* ou *acetato-CoA ligase* (AceCS) é uma enzima conservada e operante em várias vias catabólicas e anabólicas (Ingram-Smith & Smith, 2006), tendo como principais precursores/co-fatores o monofosfato e difosfato de adenosina (AMP e ADP), sendo transcritos por dois genes independentes e sem homologia significativa. Teoricamente AceCS cataliza a produção de acetato a partir de acetil-CoA ou acetil-Coa a partir de acetato, porém foi observado em *T. brucei* que a enzima não contribuiu significativamente com a produção de acetato e atuaria fundamentalmente na síntese de acetil-CoA (a partir do acetato), fornecendo esse substrato para biossíntese de lipídeos (“de novo”). A síntese de lipídeos a partir da via “de novo” é essencial nas formas procíclicas (vetor), não sendo complementada pela absorção de lipídeos presentes no meio contendo soro (Rivière *et al.*, 2009).

Em relação a degradação de Heme, vale lembrar que esta é uma molécula formada por um átomo central de ferro ligado a quatro grupos de porfirinas (ferro protoporfirina IX) e é fundamental para muitos processos biológicos associados a proteínas envolvidas na atividade redox, como hemoglobina, citocromo C, catalases e peroxidases. Em condições fisiopatológicas e durante a morte celular, heme pode ser liberado em quantidades excessivas na circulação (Larsen *et al.*, 2012), permitindo sua fusão às membranas celulares devido a composição hidrofóbica, aumentando a susceptibilidade celular ao estresse oxidativo e à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gozzelino *et al.*, 2012). Os ROS sintetizados pelos fagócitos limitam o crescimento microbiano, necessitando os patógenos intracelulares, de maquinarias combativas para sobreviver e se multiplicar (Pham *et al.*, 2005). No caso de *Leishmania*, as células hospedeiras (macrófagos) utilizando os fagolisossomos fagocitam eritrócitos senescentes, disponibilizando hemoglobina e seus produtos de degradação (Chang & Chang, 1985). A enzima responsiva ao estresse, Heme oxigenase 1 (HO-1 ou HSP-32) que catalisa a conversão de heme em biliverdina (Ewing *et al.*, 1992) monóxido de carbono e ferro (Gozzelino *et al.*, 2010), mediando a degradação de heme, esboçou níveis aumentados por várias horas após a infecção por amastigotas. Durante a infecção por amastigotas de *Leishmania*, a ativação de HO-1 resulta na degradação do heme, o que impede a maturação completa de gp91phox, impedindo a formação do complexo NADPH-oxidase (uma enzima contendo heme agrupador) e a produção de ROS no vacúolo parasitóforo, modulando negativamente os níveis ou atividades de heme o que reduz ou suprime a produção de superóxido pelos macrófagos infectados (Taillé *et al.*, 2004; Pham *et al.* 2005), podendo inclusive utilizar de outros mecanismos para essa supressão (Pham *et al.* 2005). Em suma, a molécula heme é fundamental para maturação completa da proteína gp91phox, com consequente influência na modulação antimicrobiana mediada por radicais livres (Ewing *et al.*, 1992; Pham *et al.*, 2005).

Adicionalmente, foi verificado que a maturação ou funcionalidade de gp91phox, bem como o recrutamento do complexo enzimático são inibidos em torno do vacúolo parasitóforo que abrigam amastigotas, enquanto que o precursor de gp91, a p65, foi prontamente detectado, sugerindo que amastigotas controlam a síntese de superóxido utilizando uma maquinaria de bloqueio da maturação da gp91phox (degradando heme), evitando assim, a formação de complexos enzimáticos funcionais nas células infectadas (Pham *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que a indução de HO-1 também reduz mecanismos leishmanicidas, como óxido nítrico e ROS em macrófagos murinos e humanos, estando a enzima aumentada em pacientes infectados (Luz *et al.*, 2012). Pham *et al.*, (2005) ainda sugerem que a modulação da transcrição

de gp91phox pode não ser uma estratégia relevante para a sobrevivência imediata de organismos intracelulares.

Assim, podemos hipotetizar que os isolados urbanos/2017 devido a polissomia do ch 23, podem apresentar aumento dessas funções biológicas, com maior capacidade de obtenção de energia (pelo aumento de AceCS) e maior sobrevivência intracelular, pelo aumento da degradação de Heme. Essa hipótese é uma das principais perspectivas dos desdobramentos do presente trabalho.

Já foi relatada a amplificação de uma região específica do ch 23, denominada locus H (Dias *et al.* 2007), permite a formação de episomas circulares (Restrepo *et al.*, 2009) e contém pelo menos um gene (LPMP_230280) que codifica um transportador de cassete de ligação-ATP (ABC) conhecido como proteína A de resistência a múltiplas drogas (MRPA) ou glicoproteína A (PGPA), que tem expressão aumentada em amastigotas (*L. panamensis*) resistentes ao SbIII (Haimeur *et al.*, 2000; El Fadili *et al.*, 2007). A amplificação dessa região deu origem aos chamados círculos H, que contêm duas repetições invertidas de 30kb derivadas do locus amplificado (Restrepo *et al.*, 2019) e já tinha sido relatada em outros estudos com *L. infantum* (El Fadili *et al.*, 2007) e *L. donovani* (Downing *et al.* (2012). Nos estudos de Restrepo *et al.* (2019) esse ch exibiu aumento de ploidia em linhagens de *L. panamensis* (PSC-1), resistentes a SbIII.

Os cromossomos com somia predita "intermediária" podem ser uma mistura de células individuais dentro de uma população com cromossomos monossômicos, dissômicos e trissômicos resultando em mosaicismo do número de cópias de cromossomos na população amostrada (Sterkers *et al.* 2011; Rogers *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2019). Esse efeito parece ser mais prevalente entre os cromossomos menores (Rogers *et al.*, 2011), embora ocorra também em cromossomos maiores (Walton *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2017).

Biologicamente o mosaicismo parece conferir uma variabilidade e plasticidade genômica (Sterkers *et al.*, 2011, Rogers *et al.*, 2011) elevando os níveis de mRNA que forneceria vantagem seletiva ao microrganismo, favorecendo uma maior variabilidade fenotípica e melhor adaptabilidade em condições de estresse, seja nos distintos ambientes ao longo do ciclo de vida ou quando da exposição a drogas e desenvolvimento de resistência (Sterkers *et al.*, 2011, Rogers *et al.*, 2011). Em especial, já foi relatado que a resistência a drogas é frequentemente associada à presença dos cromossomos supranuméricos (Leprohon *et al.* 2009). Além da aneuploidia, o ganho/perda de genes ou conjuntos de genes em "tandem" (Downing *et al.*, 2011; Valdivia *et al.*, 2015) e a presença de DNA episomal extra

cromossômicos lineares ou circulares (Rogers *et al.*, 2011; Downing *et al.*, 2011), também seriam importantes mecanismos que contribuiriam para diferenças nas dosagens gênicas (Downing *et al.*, 2011).

Alterações na dosagem gênica podem modular os níveis celulares de proteínas críticas para o parasito, sendo uma rápida variação adaptativa que poderia afetar a doença clínica e a suscetibilidade a medicamentos através da plasticidade fenotípica das populações naturais (Iantorno *et al.*, 2017). Na presença de cromossomos supranumerários, genes desnecessariamente superexpressos ou prejudiciais ao parasito podem ser regulados pelo aumento na degradação do mRNA por endonucleases (Rogers *et al.*, 2011).

A seleção natural pode estar favorecendo que as variações de número de cópias ocorram em cromossomos constituídos por genes essenciais para a sobrevivência dos parasitos (Patino *et al.*, 2020). As alterações no genoma tem sido consideradas pontos críticos para aquisição de resistência contra antimônio (Ponte-Sucre *et al.*, 2017) que parecem surgir rápida e transitoriamente, geralmente desaparecendo quando a pressão do medicamento é removida (Ponte-Sucre *et al.*, 2017; Restrepo *et al.*, 2019).

A comparação do material genético dos isolados aqui sequenciados com o genoma de referência (JPCM5) revelou 99,99% de identidade, evidenciando reduzido número de SNVs, cujos valores variaram de 814 a 987, sendo os genomas mais variantes J84 e J97 (Tabela 9).

A reduzida presença de SNVs foi descrita em diferentes estudos de genômica comparativa entre isolados de mesma espécie e em diversas espécies do gênero *Leishmania*, seja em condições naturais, tais como, *L. panamensis* (Platino *et al.*, 2020), *L. donovani* (Downing *et al.*, 2012), *L. peruviana* (Valdívia *et al.* (2015) ou induzidas/manipuladas como *L. donovani* (Shaw *et al.*, 2020). Os estudos de Shaw *et al.* (2020) também relatam ausência de inserções ou epissomas que distingam os isolados resistentes à paramomicina daqueles sensíveis.

A diversidade genética no gênero *Leishmania* e suas implicações clínicas no amplo espectro das patologias humanas associadas são questionadas há décadas (Zuckerman & Lainson 1977). A compreensão do genoma, suas variações naturais e a estrutura genética populacional podem apoiar e aprimorar estratégias de vigilância e intervenção em saúde pública (Downing *et al.*, 2011). O presente estudo evidencia baixa diversidade genética nos isolados estreitamente relacionados do município de Januária, corroborando com estudos realizados que analisaram diferenças genéticas de *L. infantum* provenientes de diferentes regiões geográficas, formas clínicas, hospedeiros e reservatórios nas Américas Central e do Sul, via técnica MLMT

(14 loci), relatando baixíssima heteroziguidade reforçando assertivas de sistema reprodutivo predominantemente clonal (Kuhls *et al.*, 2011). Muitos estudos relatam que recombinações genéticas e fluxo gênico podem ocorrer, embora o modo de reprodução seja predominantemente clonal (Maurício *et al.*, 2006, Lukes *et al.*, 2007).

A análise de microssatélites de 162 cepas de *L. infantum* provenientes de 17 estados brasileiros também evidenciou baixa variabilidade genética entre as cepas brasileiras e sugerem que a influência *Lu. cruzi* na transmissão da LV favoreceu estabelecimento de uma nova estrutura genética do parasito e a dispersão desses clones para outras regiões do estado Mato Grosso do Sul (Ferreira *et al.*, 2012). Posteriormente, análises mais robustas do genoma completo de 20 isolados de *L. infantum*, no nordeste brasileiro consolidaram a assertiva de reduzida diversidade genética do parasito no território brasileiro (Teixeira *et al.*, 2017).

A baixa heterogeneidade genética encontrada em amostras brasileiras de *L. infantum*, face expressiva heterogeneidade constatada na mesma espécie do parasito provenientes do Velho Mundo (Zemanová *et al.*, 2004; Kuhls *et al.*, 2011) podem ser explicadas pois *L. infantum* seria originário do VM e teria sido introduzido e se disseminado no continente americano durante o processo de colonização, há menos de 500 anos, tempo relativamente curto para o desenvolvimento de relevante variabilidade, especialmente no Brasil, onde LV envolve essencialmente as participações únicas de espécie do vetor (*Lu. longipalpis*) e do reservatório (*Canis familiaris*) (Mauricio *et al.*, 2000; Lukes *et al.*, 2007; Zemanova *et al.*, 2007; Kuhls *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2015). No VM a LV é transmitida por inúmeras espécies vetores, incluindo *P. aiasi*, *P. perniciosus*, *P. neglectus*, e *P. perfliewi*, o que possivelmente contribui para maior variabilidade (Lukes *et al.*, 2007).

A despeito da pouca variabilidade dos isolados de *L. infantum* estudados no presente trabalho, tanto a análise de ploidia cromossômica (Figura 12), quanto aquela de componente principal (PCA) e filogenética baseada nos SNVs genômicos (Figura 13 e Figura 14) evidenciaram a formação de duas subpopulações, relativamente bem delimitadas e distintas, sendo: 1º *cluster* formado pelos isolados urbanos/2017 e, 2º *cluster* constituído pelos isolados rurais/2019. Os isolados rurais/2019 divergiram mais do genoma de referência quando foi considerado a ocorrência de SNVs, sugerindo assim, existência de detectável variação intrapopulacional ainda que discreta.

Em suma, os 2 *clusters* principais formados foram caracterizados por temporalidade ou ano de coleta das espécimes clínicas (2017 e 2019) e/ou localização geográfica (urbana e rural),

sendo o primeiro *cluster*, predominantemente, urbano/2017 e o segundo rural/2019, sugerindo interferências espaciais e/ou temporais nos processos evolutivos genômicos desse organismo.

A presente análise contribuiu com o rastreamento epidemiológico de genótipos de *L. infantum* circulantes no endêmico município de Januária-MG, melhorando o entendimento sobre a diversidade genética intra-populacional. Além disso, a formação e caracterização dos clusters sugeriu interferências espaciais e/ou temporais nos processos biológicos e evolutivos genômicos do protozoário.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos aspectos abordados e nas análises de dados do presente estudo foi possível constatar:

- Todos os animais foram caracterizados como sintomáticos, sendo mais comumente pronunciadas as lesões de focinho e orelha, esplenomegalia, linfadenopatia, onicogribose, hepatomegalia.

- Não foram evidenciadas diferenças significativas em relação à presença e intensidade de sinais clínicos quando comparado cães rurais e urbanos, machos e fêmeas.

- Testes sorológicos associados foram positivos em 99% das amostras e quando levado em consideração PCR-ITS1 a cobertura diagnóstica atingiu 100% da população canina estudada.

- A correlação positiva entre a pontuação obtida (2-17 pontos) com a elaboração do escore clínico e as titulações de anticorpos (RIFI), evidenciaram que quanto maior o escore maior a titulação de anticorpos.

- Através da técnica de PCR-RFLP-ITS1 foi constatado a presença de única espécie, *L. infantum*.

- Os genomas analisados, via de regra, no município de Januária, independentemente de localização e/ou temporalidade demonstraram de maneira geral um padrão heterogêneo de cromossomos extranumerários. A polissomia do cromossomo (ch) 31 foi, entretanto, evidenciada em todos os 20 genomas sequenciados e o padrão tendenciosamente dissômico observado em 10 cromossomos constituintes do genoma de *L. infantum*, como frequentemente observado por outros autores.

- O ch 23 foi observado como sendo supranumerário em todos os isolados urbanos/2017, sendo a somia variável entre di e tetrassômico nos isolados rurais/2019.

- O material genético dos 20 isolados, quando comparados ao genoma de referência (JPCM5) demonstraram 99,99% de identidade, apresentando reduzido número de variantes de nucleotídeos únicos (SNV).

- A análise de clusterização hierárquica baseada na ploidia predita de cada cromossomo de todos os isolados; as análises de SNVs (PCA e filogenia) revelaram a existência de 2 *clusters* principais nos isolados estudados: 1º) *Cluster* urbano/2017 e 2º) *Cluster* rural/2019. Estes resultados sugerem que interferências espaciais e/ou temporais estejam atuando nos processos evolutivos genômicos desse organismo nesta área endêmica.

7 PERSPECTIVAS

- Comparar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas AceCS e HO-1 dos isolados rurais e urbanos com o genoma de referência (JPCM5);
- Comparar curva de crescimento dos isolados dos grupos urbanos/2017 e rurais/2019 e a infectividade desses isolados em macrófagos e *in vivo* no modelo hamster;
- Avaliar a abundância (proteína) e o nível de expressão (mRNA) de AceCS e HO-1 em amastigotas e promastigotas de *L. (L.) infantum*;
- Avaliar a atividade enzimática de AceCS através de ensaio de determinação de pirofosfato (PPi), em cepas dos agrupamentos urbano/2017 e rural/2019.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abranches P, Santos-Gomes GM, Rachamin N *et al.*, An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 13, p. 537–550, 1991.
- Agabian N, Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61(7), p. 1157-1160, 1990.
- Alexa A, Rahnenfuhrer J, topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. Pacote R versão 2.41.0., 2020.
- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM *et al.*, New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.**, v. 154, p. 1003-1011, 1986.
- Alkan C, Sajjadian S, Eichler EE, Limitations of next-generation genome sequence assembly. **Nat Methods.**, v 8(1), p. 61-65, 2011.
- Ivens CA, Christopher SP, Elizabeth AW *et al.*, The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309 (5733), p. 436–442, 2005.
- Ashford RW, The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- Benjamini Y, Yekutieli D, The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. **The Annals of Statistics**, v. 29, n. 4, p. 1165–1188, 2001.
- Berman JD, Gallalee JV, Best JM, Hill T, Uptake, distribution, and oxidation of fatty acids by *Leishmania mexicana* amastigotes. **J Parasitol.**, v. 73, 555–560, 1987.
- Boité MC, Maurício IL, Miles MA, Cupolillo E, New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (Viannia) parasites based on multilocus sequence analysis. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, e. 1888, 2012.
- Brasil. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Conjunta n. 001/2016 de 01 de setembro de 2016. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>. Acesso em 05 dez. 2018.
- Brasil. Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 1.426, de 11 de julho de 2008. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html. Acesso em: 05 dez. 2018.
- Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta N° 01/2011 – CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS de 29 de dezembro de 2011.
- Brems S, Guilbride DL, Gundlesdodjir-Planck D *et al.*, The transcriptomes of *Trypanosoma brucei* 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 139, p. 163-172, 2005.

Britto C, Christophe R, Bastien P *et al.*, Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v. 222, p. 107-117, 1998.

Butenko A, Kostygov AY, Sadlova J *et al.*, Comparative genomics of *Leishmania (Mundinia)*. **BMC Genomics**, v. 20, 2019.

Cardoso L, Cabral M, Leishmania and canine Leishmaniasis. **Rev. Port. C. Vet.**, v. XCIII (527), p. 122–141, 1998.

Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ *et al.*, Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Trop.**, v. 116(1), p. 108 - 110, 2010.

Chang CS, Chang KP, Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Mol Biochem Parasitol.**, 16(3), p. 267-276, 1985.

Clayton C, Shapira M, Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156(2), p. 93-101, 2007.

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM *et al.*, Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **PLoS One.**, v. 9(3), 91009, 2014.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez L M *et al.*, Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p.1314-1320, 2002.

Cruz AK, Titus R, and Beverley SM, Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p 1599-1603, 1993.

Cunha AM, Experimental infections in American visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 33, pp. 581-616, 1938.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP, Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 3, p. 151-156, 2006.

Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K, Paromomycin. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 103(7), p. 653-660, 2009.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P *et al.*, Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.**, v. 17, p. 451–458, 1995.

Depledge DP, Evans KJ, Ivens AC *et al.*, Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 3(7), 2009.

Desjeux P, Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clin Dermatol.**, v. 14, p. 417-423, 1996.

Desjeux P, The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 95(3), p. 239-243, 2001

Dias FC, Ruiz JC, Lopes WC *et al.*, Organization of H locus conserved repeats in *Leishmania (Viannia) braziliensis* correlates with lack of gene amplification and drug resistance. **Parasitol Res.**, v. 101(3), p. 667-676, 2007.

Downing T, Imamura H, Decuyper S *et al.*, Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Res.**, v. 21(12), p. 2143-2156, 2011.

Eisenstein BI, The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 322, p. 178-183, 1990.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T, RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. **Genes Dev**, v. 15, p. 188-200, 2001.

El Fadili K, Messier N, Leprohon P *et al.*, Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49(5), p. 1988-1993, 2005.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G *et al.*, Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309 (5733), p. 404-409, 2005.

Ewing JF, Haber SN, Maines MD, Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. **J. Neurochem.**, v. 58, p. 4023-4029, 1992.

Faria AR, de Castro Veloso L, Coura-Vital W *et al.*, Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. **PLoS Negl. Trop.**, v. 8, 2015.

Ferreira GEM, Santos BN Cavalheiros *et al.*, The Genetic Structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and Its Possible Association with the Transmission Cycle of Visceral Leishmaniasis. **PLoS One.**, v. 7(5), e36242, 2012.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X *et al.*, Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis, **Vet. Rec.**, v. 136, p. 514-516, 1995.

Fuente SG, Peiró-Pastor R, Rastrojo A *et al.*, Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and *de novo* assembly into 36 contigs. **Sci Rep.**, v. 7, 2017.

Galati EAB, Morfologia e taxonomia: classificação de Phlebotominae. In: Rangel, E.F. & Lainson, R. (Orgs.). *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 23-51, 2003.

Garcia-Silva MR, Sollelis L, MacPherson CR *et al.*, Identification of the centromeres of *Leishmania major*: revealing the hidden pieces. **Scientific Report**, v. 18, p.1968-1977, 2017.

Gavvani AS, Mohite H, Edrissian GH, Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, p. 511–515, 2002.

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR, Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nat Rev Genet.**, v. 17(6), p. 333-351.

Goldman JP, Blundell MP, Lopes L *et al.*, Enhanced human cell engraftment in mice deficient in RAG2 and the common cytokine receptor gamma chain. **Br J Haematol.**, v. 103(2), p. 335-342, 1998.

Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H *et al.*, Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **J Biol Chem.**, v. 279(30), 31010-7, 2004.

Gozzelino R, Jeney V, Soares MP, Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 50, 323-354, 2010.

Gradoni L, The diagnosis of canine leishmaniasis. In Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum. Intervet International bv, Boxmeer, p. 7–14, The Netherlands, 2002.

Gramiccia M, Gradoni L, The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int J Parasitol.**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

Grimaldi GJ, Teva A, Ferreira AL, *et al.*, Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54–59, 2012.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

Haimeur A, Brochu C, Genest P *et al.*, Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 108(1), p. 131-135, 2000.

Hannon GJ, RNA interference. **Nature**, v.418, p. 244-251, 2002.

Herwaldt BL, Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354(9185), 1191-1199, 1999.

Huynh C, Sacks DL, Andrews NW, A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. **J Exp Med.**, v. 203(10), p. 2363-2375, 2006.

Iantorno SA, Durrant C, Khan A *et al.*, Gene Expression in *Leishmania* Is Regulated Predominantly by Gene Dosage. **mBio.**, v. 8(5), e 01393-17, 2017.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Cidades. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/januarina/panorama>. Acesso em: 01 abr. 2020.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE Cidades. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/januarial/historico>. Acesso em: 01 abr. 2020.

Ingram-Smith C, Smith KS, AMP-forming *acetyl-CoA synthetases* in Archaea show unexpected diversity in substrate utilization. **Archaea**, v. 2(2), p. 95-107, 2006.

Iourov IY, Vorsanova SG, Yurov, Chromosomal mosaicism goes global. **Mol Cytogenet.**, v. 1:26, 2008.

Jackson AP, Tandem gene arrays in *Trypanosoma brucei*: comparative phylogenomic analysis of duplicate sequence variation. **BMC Evol Biol.**, v. 7, 2007.

Katoah K; Standley DM, MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

Kent WJ, BLAT--the BLAST-like alignment tool. **Genome Research**, v. 12, n. 4, p. 656–664, 2002.

Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M *et al.*, Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 334-343, 2007.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, *et al.*, Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 5(6), e. 1155, 2011.

Lainson R, Shaw JJ, Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 22(273), p. 595-600, 1978.

Lainson R; Shaw JJ, Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters Killick Kendrick, ed. The leishmaniasis in biology and Medicine. **London Academic Press**.1, p. 1120, 1987.

Lainson R, Rangel EF, *Lutzomyia longipalpis* and the eco- epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v 100(8), p. 811-827, 2005.

Landis JR & Koch GG, The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v. 33, p. 159-174, 1977.

Lanotte G, Rioux JA, Perieres J *et al.*, Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. **Ann. Parasitol.**, v. 54, p. 277–295, 1979.

Larsen R, Gouveia Z, Soares MP, Gozzelino R, Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. **Front Pharmacol.**, v. 3:77, 2012.

- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C *et al.*, A cross-sectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Vet. Parasitol.**, v. 109, p. 19–27, 2002).
- Leprohon P, Légaré D, Raymond F *et al.*, Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. **Nucleic Acids Res.**, v. 37(5), p. 1387-1399, 2009.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A *et al.*, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.
- Li H, Durbin R, Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 26, p. 589–595, 2010.
- Liang X, Haritan A, Uliel S *et al.*, Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 830-840, 2003.
- Lighthall GK, Giannini SH, The chromosomes of *Leishmania*. **Parasitol Today.**, v. 8(6), p. 192-119, 1992.
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian *et al.*, Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 104(22), p.9375–9380, 2007.
- Luz NF, Andrade BB, Feijó DF, Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J Immunol.**, v. 188(9), p. 4460-4467, 2012.
- Lypaczewski P, Hoshizaki J, Zhang WW *et al.*, A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence. **Sci Rep.**, v. 8, 2018.
- Maere S; Heymans K.; Kuiper M, BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM *et al.*, Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Vet J.**, v. 179(1), p. 142-144, 2009.
- Mancianti F, Gramiccia M, Pieri S, Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 566-567, 1988.
- Manna L, Reale S, Vitale F *et al.*, Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Research in Veterinary Science**, v. 87 (1), pag. 76-78, 2009.
- Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D *et al.*, Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Mol Cell**, v. 11, p. 1291-1299, 2003.

Marlow MA, Boité MC, Ferreira GEM *et al.*, Multilocus Sequence Analysis for *Leishmania braziliensis* Outbreak Investigation. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8(2), e. 2695, 2014.

Maurício IL, Howard MK, Stothard JR *et al.*, Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237-246, 1999.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA, The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.**, v. 16(5), p. 188-189, 2000.

Maurício IL, Yeo M, Baghaei M *et al.*, Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 757-769, 2006.

McDonagh PD, Myler PJ, Stuart K *et al.*, The unusual gene organization of *Leishmania major* chromosome 1 may reflect novel transcription processes. **Nucleic Acids Res.**, v. 28(14), p. 2800-2803, 2000.

McKenna A, Hanna M, Banks E *et al.*, The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, 1297–1303, 2010

Meister G, Tuschl T, Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature** 431: 343-349, 2004.

Mendonça IL, Batista JF, Schallig H *et al.*, The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v. 59, e39, 2017.

Mettler M, Grimm F, Capelli G *et al.*, Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5515–5519, 2005.

Ministério da Saúde (MS) 2018. DataSUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvmg.def>. Acesso em: 21 dez. 2018.

Ministério da Saúde (MS) 2017. Guia de Vigilância em Saúde, v. 3. Disponível em: http://www.hc.ufu.br/sites/default/files/tmp//volume_3_guia_de_vigilancia_em_saude_2017.pdf. Acesso em: 09 dez. 2018.

Ministério da Saúde (MS) 2014. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf. Acesso em: 09 dez. 2018.

Molina R, Amela C, Nieto J, Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 491–493, 1994.

- Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 583–588, 2000.
- Mrazek J, Guo X, Shah A, Simple sequence repeats in prokaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 8472-8477, 2007.
- Murray H, Berman JD, Davis CR *et al.*, Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- Nunes JB, Laurenti MD, Kanamura HY *et al.*, *Leishmania infantum* INFECTION IN DOGS FROM THE SOUTHERN REGION OF MINAS GERAIS STATE, BRAZIL. **Rev Inst Med Trop., Sao Paulo.**, v. 58, 2016.
- Nykanen A, Haley B, Zamore PD, ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**, v. 107, p. 309-321, 2001.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V *et al.*, Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 1318-1322, 2006.
- Oliveira GGS, Santoro F, Sadigursky M *et al.*, The subclinicalform of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem. Inst.Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 243–248, 1993.
- Patino LH, Muñoz M, Muskus C *et al.*, Intraspecific Genomic Divergence and Minor Structural Variations in *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Genes (Basel).**, v. 11(3), 2020.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D *et al.*, Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet.**, v. 39(7), p. 839–847, 2007.
- Pham N-K, Mouriz J, Kima PE, *Leishmania pifanoi* Amastigotes Avoid Macrophage Production of Superoxide by Inducing Heme Degradation. **Infect Immun.**, v. 73(12), p. 8322–8333, 2005.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 11(12), e0006052, 2017
- Porrozzì R, Santos da Costa MV, Teva A, Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmania lantigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, p. 544–548, 2007.
- Posada D, jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.
- Pozio E, Gradoni L, Bettini, Gramiccia Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario. **Acta Tropica**, v. 38, p. 383-393, 1981.

Rainey PM & MacKenzie NE, A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 45, p. 307-315, 1991.

Raymond F, Boisvert S, Roy G *et al.*, Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Res.**, v. 40(3), p 1131-1147, 2012

Reed SG, Scott P, T cell and cytokine responses in leishmaniasis. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 5, p. 524–531, 1993.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 87–95, 2009.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A *et al.*, Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science.**, v. 81, p. 68–75, 2006.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM *et al.*, Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 112, p. 102–116, 2006.

Reis-Cunha JL, Valdivia HO, Bartholomeu DC, Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. **Curr Genomics.**, v. 19(2), p. 87-97, 2018.

Restrepo CM, Llanes A, Cedeño EM, Environmental Conditions May Shape the Patterns of Genomic Variations in *Leishmania panamensis*. **Genes (Basel)**, v. 10(11), 2019.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E *et al.*, Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann Parasitol Hum Comp.**, v. 65(3), p. 111-125, 1990.

Rivière L, Moreau P, Allmann S *et al.*, Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 12694-12699, 2009.

Rocha MF, Michalsky EM, Lara-Silva *et al.*, Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania* infection for *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies – an observational study in an endemic area in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 14(2), e0008079, 2020.

Roque AL, Jansen AM, Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int J Parasitol Parasites Wildl.**, v. 29, p. 251-262, 2014.

Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ *et al.*, Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21(12), p. 2129-2142, 2011.

- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffman MP *et al.*, Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 12, p. 315 - 317, 1998.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N *et al.*, PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 47(1), p. 349-358, 2003.
- Schönian G, Akuffo H, Lewin S *et al.*, Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 106, p. 239-248, 2000.
- Schönian G, Kuhls K, Maurício IL, Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 138(4), p. 405-425, 2010.
- Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Oliveira F *et al.*, Sequential blood meals augment vector infectiousness by promoting *Leishmania* replication and triggering amplification of metacyclics via a novel retroleptomonad developmental stage. **Nat Microbiol.**, v (5), p. 548-555, 2018.
- Shaw CD, Imamura H, Downing *et al.*, Genomic and Metabolomic Polymorphism among Experimentally Selected Paromomycin-Resistant *Leishmania donovani* Strains. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 64(1), 2020.
- Shaw JJ, Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 471–478, 1994.
- Silva TAM, Gomes LI, Oliveira E *et. al.*, Genetic homogeneity among *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* isolates from dog and human samples in Belo Horizonte Metropolitan Area (BHMA), Minas Gerais, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, 2015.
- Silva KR, Mendonça VRR, Silva KM *et al.*, Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112(1), p. 53-62, 2017.
- Slappendel RJ, Ferrer L, Leishmaniasis. In: Saunders, W.B. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia, pp. 450–458, 1998.
- Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **J. Comp. Pathol.**, v. 130, p. 7–12, 2004.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, v. 165(1-2), p. 1-18, 2009.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G *et al.*, The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p. 37–45, 2000.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A *et al.*, LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasit Vectors.**, v. 20, 2011.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M *et al.*, Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 560–563, 2001*.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X *et al.*, *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 265–276, 2001.

Schönian G, Maurício I, Cupolillo E, Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. **Trends Parasitol.**, v. 26, p. 466-469, 2010.

Smith M, Bringaud F, Papadopoulou B Organization and evolution of two SIDER retroposon subfamilies and their impact on the *Leishmania* genome. **BMC Genomics**, v. 22, 2009.

Sterkers Y, Lachaud L, Crobu L *et al.*, FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. **Cellular microbiology**, v. 13(2), p. 274-283, 2011.

Sterkers Y, Laurence L, Bourgeois *et al.*, Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. **Molecular microbiology**, v. 86(1), p. 15-23, 2012.

Taylor C, Ford K, Connolly BA *et al.*, Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **The Biochemical Journal**, v. 291, p. 493-504, 1993.

Teixeira DG, Monteiro GRG, Martins DRA *et al.*, Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. **Int J Parasitol.**, v. 47 (10-11), p. 655–665, 2017.

Tibayrenc, M, Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 575-580, 2005.

Tielens GMA, van Grinsven KWA, Henze K *et al.*, Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists, **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 387–397, 2010.

Tintaya KW, Ying X, Dedet JP *et al.*, Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. **J Infect Dis**, v. 189, p. 1035-1043, 2004.

Treangen TJ, Salzberg SL, Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. **Nat Rev Genet.**, v. 13(1), p. 36-46, 2011.

Tuon FF, Neto VA, Amato VS, *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 54, p. 158–166, 2008.

Valdivia HO, Almeida LV, Roatt BM *et al.*, Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Sci Rep.**, v. 16, 2017.

Valdivia HO, Reis-Cunha JL, Rodrigues-Luiz GF *et al.*, Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **BMC Genomics**, v. 16, 2015.

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 90, p. 31-37, 2004.

Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA *et al.*, Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 5(6), 2011.

Young DG, Duncan MA, Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Mem. Am. Entomol.**, Inst. 54, p. 1–881, 1994.

Waller JC, Alvarez S, Naponelli V *et al.*, A role for tetrahydrofolates in the metabolism of iron-sulfur clusters in all domains of life. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 107(23), 2010.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C *et al.*, The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Res.**, v. 24(9), p. 1688-1694, 1996.

World Health Organization (WHO) 2010. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, xiip. Ginebra. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf. Acesso em: 27 nov. 2018.

World Health Organization (WHO) 2013. Frequently Asked Questions on Visceral Leishmaniasis (Kalaazar). Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205090/B5042.pdf;jsessionid=A0E26EA70463D9932C957AF9AA7C098A?sequence=1>. Acesso em: 09 dez. 2018.

Zhang WW, Ramasamy G, Mc Call LI *et al.*, Genetic Analysis of *Leishmania donovani* Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. **PLoS Pathog.**, v. 10(7), 2014.

Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL *et al.*, The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. **Int J Parasitol.**, v. 37(2), p. 149-160, 2007.

Zemanová E, Jirku M, Maurício IL *et al.*, Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70(6), p. 613-617, 2004.

8 TABELA SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1: Processos biológicos enriquecidos no cromossomo 23

GO.ID	Funções enriquecidas	Frequência de genes anotados	Frequência de genes esperados	Frequência de genes encontrados	Anotados/ Esperados	Elin Fisher	Elin Fisher ajustado
1	GO:0019427 acetyl-CoA biosynthetic process from acetato	2	0,04	2	50	0,00041	0,0082
2	GO:0006812 cation transport	67	1,37	5	3,649635	0,0107	0,04699
3	GO:0038203 TORC2 signaling	1	0,02	1	50	0,02042	0,04699
4	GO:0048033 heme o metabolic process	1	0,02	1	50	0,02042	0,04699
5	GO:0048034 heme O biosynthetic process	1	0,02	1	50	0,02042	0,04699
6	GO:1902600 proton transmembrane transport	30	0,61	3	4,918033	0,02202	0,04699
7	GO:0015672 monovalent inorganic cation transport	34	0,69	3	4,347826	0,03066	0,04699
8	GO:0098660 inorganic ion transmembrane transport	34	0,69	3	4,347826	0,03066	0,04699
9	GO:0098662 inorganic cation transmembrane transport	34	0,69	3	4,347826	0,03066	0,04699
10	GO:0055085 transmembrane transport	153	3,12	7	2,24359	0,03307	0,04699
11	GO:0018193 peptidyl-amino acid modification	35	0,71	3	4,225352	0,03307	0,04699
12	GO:0098655 cation transmembrane transport	37	0,76	3	3,947368	0,03816	0,04699
13	GO:0000460 maturation of 5.8S rRNA	2	0,04	1	25	0,04043	0,04699
14	GO:0043007 maintenance of rDNA	2	0,04	1	25	0,04043	0,04699
15	GO:0043570 maintenance of DNA repeat elements	2	0,04	1	25	0,04043	0,04699
16	GO:0006810 transport	347	7,08	12	1,694915	0,04098	0,04699
17	GO:0051234 establishment of localization	348	7,11	12	1,687764	0,04179	0,04699
18	GO:0000413 protein peptidyl-prolyl isomerization	17	0,35	2	5,714286	0,04567	0,04699
19	GO:0018208 peptidyl-proline modification	17	0,35	2	5,714286	0,04567	0,04699
20	GO:0006811 ion transport	98	2	5	2,5	0,04699	0,04699

9 ANEXOS

Anexo I: Termo de esclarecimento e livre consentimento. Termo de doação e Declaração

TERMO DE ESCLARECIMENTO E LIVRE CONSENTIMENTO

Prezado (a) Sr(a) Proprietário (a), gostaríamos de informar-lhe que a leishmaniose visceral é uma doença **grave** que acomete homens, mulheres, crianças e o seu melhor amigo, o **cão**. A doença, se não tratada, pode causar a morte de pessoas. As crianças e os idosos são as pessoas que mais adoecem. A doença é passada para as pessoas e para os cachorros pela picada de um “mosquitinho” muito pequeno, chamado de “flebótomo” ou “mosquito palha”. Este mosquitinho é criado perto de lixos onde a terra estiver molhada (como na terra de vasos de planta após você molhar) e fica escondido no meio de entulhos de madeira e tijolos.

O cachorro sofre da doença como nós. Ainda não existe uma vacina ou um tratamento que o governo possa distribuir para os cães. Por isto, os cães que apresentam o resultado do exame positivo para a doença são recolhidos pelo serviço público e sacrificados. Esta medida é muito importante, pois um cachorro doente pode passar a doença para o “mosquitinho” e este pode passar a doença para outro cachorro ou para outras pessoas.

Porque estamos falando isto? Nós estamos trabalhando no sentido de buscar e produzir maiores conhecimentos sobre a doença.

Meu cachorro será devolvido? Seu cão não poderá ser devolvido a você, porque nós precisamos estudar os órgãos dele (fígado, rim baço ou pulmão). Seu animal será anestesiado por um veterinário, que vai usar anestesia geral, e será eutanasiado com uma injeção letal enquanto estiver dormindo com o efeito da anestesia. **É IMPORTANTE QUE VOCÊ SAIBA QUE SEU ANIMAL NÃO IRÁ SOFRER PARA MORRER.**

Então o que o meu cachorro ganha com isto? Você estará contribuindo, com a doação do seu cão, para que no futuro outros cães, como o seu, não sejam mais sacrificados por causa da leishmaniose visceral.

Qual a importância do nosso projeto de pesquisa atual e o tratamento e o controle da doença? Você estará contribuindo para esclarecimentos de como a doença evolui no animal e assim contribuir para estratégias futuras de tratamento e controle da doença.

TERMO DE DOAÇÃO

Eu, _____ declaro estar ciente da recomendação de eutanásia do meu animal (cão) pelo Departamento de Endemias e Vigilância Epidemiológica, do município de Januária-MG, reconhecendo que esta é a opção escolhida por mim para cessar definitivamente o sofrimento do animal, contribuindo assim com a prevenção de possíveis inconvenientes, portanto, autorizo a eutanásia, a ser realizado por médico veterinário.

Declaro também estar ciente que o Departamento de Endemias e Vigilância Ambiental (DEVA) do município de Januária-MG, cederá espécimes clínicas do cão para projetos de pesquisas, tais como, o projeto intitulado “Leishmaniose Visceral Canina: Caracterização genética de espécies de *Leishmania* em área endêmica e validação de métodos para diagnóstico específico”, sendo a responsabilidade do descarte da carcaça de inteira responsabilidade do DEVA.

Observações: Para formalizar esta doação é necessário a assinatura da declaração abaixo. Será assegurado o sigilo absoluto quanto aos seus dados pessoais e do seu cão.

DECLARAÇÃO

“Declaro estar de acordo que o meu animal _____ seja submetido à avaliação clínica e laboratorial por médico veterinário, e que se preencher os requisitos necessários, seja incluído nesta pesquisa. Autorizo que seja conduzido os procedimentos propostos pelos projetos de pesquisa. Autorizo ainda, que os resultados desta pesquisa possam ser utilizados para elaboração de publicações científicas.”

Januária-MG, ____/____/____.

Nome e assinatura do proprietário

Anexo II: Leishmaniose Visceral Canina: Ficha Clínica Canina

LVC: FICHA CLÍNICA CANINA

Número do cão: _____ Nome do cão: _____

Endereço: _____

Dados Clínicos:

Sexo: M () F ()

Raça: _____ Cor: _____

Idade Aprox.: _____ Peso: _____

Habita área próxima de matas: Sim () Não ()

Porte: Pequeno () Médio () Grande ()

Tipo de Pelagem: Curta () Longa () Normal () Opaca ()

Alopécia: Ausente () Geral () Localizada ()

Descamação: Ausente () Presente ()

Emagrecimento: Ausente () Leve () Moderado () Acentuado ()

Ascite: Ausente () Presente ()

Dermatite: Ponta da orelha () _____ () Generalizada ()

Secreção ocular: Ausente () Presente ()

Ceratoconjuntivite: Ausente () Presente ()

Opacificação da córnea: Ausente () Presente ()

Cegueira: Ausente () Presente ()

Mucosas hipocoradas: Ausente () Presente ()

Hiperqueratose: Ausente () Presente () _____

Edema de Patas: Ausente () Presente ()

Onicogribose: Ausente () Presente ()

Paresia de patas: Ausente () Presente ()

Escore: _____ C () N () O ()

Úlceras: Ausente () Presente ()

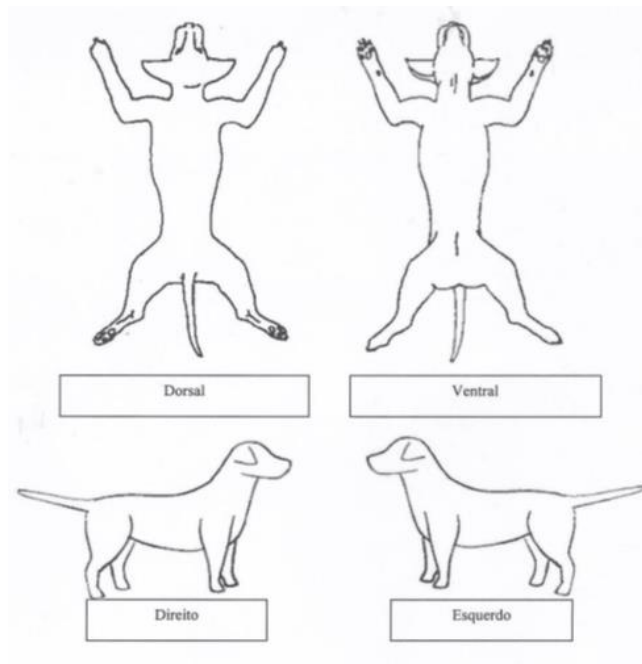
(Na presença de úlceras preencher ficha de exame dermatológico).

Linfoadenopatia: Normal () Localizada () Geral ()

Hepatomegalia: Ausente () Leve () Moderada () Acentuada ()
Esplenomegalia: Ausente () Leve () Moderada () Acentuada ()

Observações: _____

Exame Dermatológico: localização e número de lesões:



DIAGNÓSTICO

Parasitológico

Microscopia de lâminas: _____

Cultura de MO: _____

Moleculares: _____

Outros: _____

Sorológico: _____

Data da eutanásia: ____/____/____.