

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Jennifer Ottino

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DA VARIABILIDADE GENÔMICA DE
ISOLADOS DE *LEISHMANIA* SPP. OBTIDOS DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL EM DIFERENTES ÁREAS ENDÊMICAS NO BRASIL**

Belo Horizonte
2021

Jennifer Ottino

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DA VARIABILIDADE
GENÔMICA DE ISOLADOS DE *LEISHMANIA* SPP. OBTIDOS DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL EM DIFERENTES ÁREAS
ENDÊMICAS NO BRASIL**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

Co-orientador: Dr. Rodrigo de Paula Baptista

Belo Horizonte
2021

- 043 Ottino, Jennifer.
Caracterização comparativa da variabilidade genômica de isolados de *Leishmania* spp. obtidos de cães com leishmaniose visceral em diferentes áreas endêmicas no Brasil [manuscrito] / Jennifer Ottino. - 2021.
144 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu. Co-orientador:
Dr. Rodrigo de Paula Baptista.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Cães. 4. *Leishmania*. 5. Coinfecção. 6. Variação Genética. I. Bartholomeu, Daniella Castanheira. II. Baptista, Rodrigo de Paula. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.
- CDU: 576.88/.89



Universidade Federal de Minas Gerais



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Jennifer Ottino

316/2021/04
entrada
2º/2016
2016751678

Às quatorze horas do dia 27 de abril do ano de 2021, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://zoom.us/j/94399308189>, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Caracterização comparativa da variabilidade genômica de isolados de *Leishmania* spp. obtidos de cães com leishmaniose visceral em diferentes áreas endêmicas no Brasil", área de concentração: Imunoparasitologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu	UFMG	Aprovada
Dr. Edmundo Carlos Grisard	UFSC	Aprovada
Dr. Fabiano Sviatopolk-Mirsky Pais	IRR/FIOCRUZ-MG	Aprovada
Dr. Gustavo Fontes Paz	IRR/FIOCRUZ-MG	Aprovada
Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto	CPqAM-FIOCRUZ/PE	Aprovada
Dr. Rodrigo de Paula Baptista	UGA, Athens, EUA	Aprovada

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS - SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	-----
Recomendações	Recomenda-se que a aluna faça as modificações no documento da tese como discutido com a banca examinadora.
Sugestões	-----

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) 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, 27 de abril de 2021.

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

(Orientadora)

DC Bartholomeu

Dr. Edmundo Carlos Grisard



Documento assinado digitalmente

Edmundo Carlos Grisard
Data: 04/06/2021 20:24:11-0300
CPF: 573.319.019-15

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dr. Fabiano Sviatopolk-Mirsky Pais

Fabiano Sviatopolk-Mirsky Pais

Dr. Gustavo Fontes Paz

Gustavo Fontes Paz

Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto

Osvaldo Pompilio de Melo Neto

Dr. Rodrigo de Paula Baptista

(Coorientador)

Rodrigo de Paula Baptista

Ata-COVID19- período isolamento social

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA TESE

Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP – ICB/UFMG
Projeto ChiCão – Comunidade de São Joaquim de Bicas/MG
Santo Agostinho Hospital Veterinário – SAHV – Belo Horizonte/MG

ORIENTAÇÃO

Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

COLABORADORES**Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG*****Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP – ICB/UFMG***

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara
Dra. Lilian Lacerda Bueno
Dra. Mariana Santos Cardoso
Dr. João Luís Reis Cunha
Ms. Gabrielle Ariadne Bento
Ms. Anderson Coqueiro dos Santos
Ms. Laila Viana de Almeida

Laboratório de Leishmanioses ICB/UFMG

Dra. Héliida Monteiro de Andrade
Dr. João Carlos França da Silva
Ms. Ramon Vieira Nunes

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP***Laboratório de Imunopatologia – LI***

Dr. Alexandre Barbosa Reis
Dr. Bruno Roatt

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC***Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia***

Dr. Edmundo Carlos Grisard

Universidade Federal da Bahia - UFBA e**Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-BA**

Dra. Aldina Maria Prado Barral
Dra. Camila Indiani de Oliveira

Santo Agostinho Hospital Veterinário e Projeto ChiCão

Dr. Vitor Márcio Ribeiro
Dr. Guilherme Ribeiro do Valle

Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco - PERU

Dr. Hugo Oswaldo Valdivia Rodríguez

Welcome Sanger Institute – Cambridgeshire – UK

James A. Cotton

University of Georgia – USA
Dr. Rodrigo de Paula Baptista
Dra. Jessica C. Kissinger

Karolinska Institute, Suécia
Dr. Bjorn Anderson

AGÊNCIAS FINANCIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

Dedico esse trabalho aos meus pais, ao meu noivo, ao Sweet e a todos que acreditam e contribuem para um mundo melhor.

***“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho
original”.***

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus que dia a dia nos presenteia com o dom da Vida e nos permite compartilhar nossas vitórias com quem amamos.

À espiritualidade Amiga e aos nossos mentores que nos intuem em nossa jornada e evolução.

Aos meus amados Papi, Graziano e à minha Mãe Inês que pelo amor incondicional que me oferecem a cada dia me permitem acreditar nas minhas capacidades e perseverar naquilo que acredito. Tudo é possível porque Deus me concedeu a honra de ter vocês como pais. Vocês são tudo que mais amo!

Ao Sweet que durante 16 anos me concedeu um amor puro e incondicional como nunca havia experimentado e pelo amor que, tenho certeza que ainda oferece de onde está. Obrigada por isso e pelo presente de grego que me enviou, o Pequeno Lord Sweet, a quem agradeço também!

Ao Maurício, meu tesouro, noivo, companheiro e amigo que com todo o seu amor e gentileza torna tudo mais sereno e leve. Você continua a iluminar os meus dias e a encher minha vida de alegria!

Agradeço a mim mesma pelo esforço e dedicação que me permitiram concluir mais essa etapa com destino aos meus sonhos e propósitos.

Aos meus avós, Giovanni e Orsolina, Dorvalino e Terezinha, fonte de tudo, exemplo de força, dedicação e amor incondicional!

Às minhas Madrinhas Claudia e Toninha por sempre me darem amor, colocaram-me em suas orações e me apoiarem em tudo! Ao meu padrinho Claudio pelo carinho e por sempre querer me proporcionar bons e divertidos momentos!

Aos meus tios, Titi, tia Sherly, tia Maria, tia Salete e tio Léo e aos meus primos Olaf, Rafaela e Lukas que dão um significado todo especial à palavra Família!

Ao Vitor, professor e amigo querido que me abre tantas portas e é exemplo de profissionalismo e de ser humano! Obrigada por ter dado início a essa incrível caminhada!

Aos professores Domenico, Gaetano e Riccardo por todos os ensinamentos e por me apresentarem o incrível mundo da Ciência e todas as suas possibilidades!

À professora Daniella Bartholomeu por me abrir as portas de seu laboratório e grupo de pesquisa, pela orientação, por acreditar em mim e por todos os valiosos aprendizados ao longo do meu Doutorado!

À Mari e Gabi, amigas que o Doutorado me trouxe, pelos conselhos, pela cumplicidade e por toda alegria que me trazem!

Ao BMGP group pela acolhida, pela paciência e por todos os ensinamentos que permitiram me aventurar pelo mundo da Bioinformática!

Ao LIGP, ao professor Ricardo Fujiwara, à Michele, à Vanessa e a todos os colegas pelos auxílios e por tornar a jornada mais simples e tranquila!

À professora Jessica Kissinger e ao Dr. Rodrigo Baptista por me receberem em seu laboratório, pela gentileza e por trazerem ainda mais robustez a esse trabalho e à minha experiência profissional!

A todos os colaboradores, em especial à Dra. Hélida e ao Ramón que viabilizaram e enriqueceram esse trabalho!

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia e, em especial à Sumara e Sibebe que com sua gentileza e cordialidade estão sempre disponíveis e prontas a ajudar!

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao CNPq e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica no Brasil e em países do Velho e Novo Mundos. As manifestações clínicas da doença dependem da infectividade da espécie envolvida e da resposta imune dos hospedeiros. *Leishmania (Leishmania) infantum* está associada à forma visceral da doença em humanos e cães, mas alguns estudos evidenciam o potencial de visceralização de *Leishmania (L.) amazonensis*. Casos de coinfeção com presença de mais de uma espécie de *Leishmania* infectando o mesmo hospedeiro são menos relatados na literatura podendo estar subestimados. Sabe-se que esses tripanosomatídeos possuem grande potencial de adaptabilidade frente às mais adversas condições ambientais e seu ciclo biológico pode sofrer alterações em virtude do meio em que estão inseridos e, principalmente, pelas modificações de caráter antroponótico no ecossistema. A sobrevivência e perpetuação de *Leishmania* dependem de modificações a nível genético que podem alterar sua expressão gênica. Dessa forma, existe grande relevância em empregar amostras de campo isoladas de hospedeiros, como cães e humanos, provenientes de áreas endêmicas para leishmaniose visceral (LV), onde de fato, os parasitos sofrem pressões ambientais podendo alterar sua composição genômica e eventualmente a expressão gênica em função da oferta de reservatórios, vetores e hospedeiros. Esse trabalho objetiva realizar uma análise comparativa de isolados, preponderantemente de cães naturalmente infectados, oriundos de diversas regiões geográficas do Brasil – Bahia, Governador Valadares, Januária, Rio Grande do Norte e Santa Catarina. Através de ferramentas de bioinformática e biomarcadores moleculares, 85 isolados foram analisados quanto à variação do número de cópias cromossômicas, variação de SNVs (*Single Nucleotide Variants*), filogenia, estrutura populacional e enriquecimento gênico. Além disso, 24 amostras de campo de cães do município de São Joaquim de Bicas e de um Hospital Veterinário em Belo Horizonte foram caracterizadas através de biomarcadores subgênero-específicos, *Viannia* e *Leishmania*, a fim de identificar as espécies circulantes na região. Os estudos *in silico* demonstraram que existem variações intra e interpopulacionais entre as áreas geográficas e diferentes espaços de tempo para essas amostras não clonais, o que evidencia a dinâmica da variação populacional que ocorre na espécie com formação de subpopulações distintas ao longo de vários anos. As análises também apontam para a ocorrência de mais de uma população ancestral entre os isolados sugerindo a coexistência e interação entre parasitos de origens distintas em um mesmo ambiente elevando a diversidade genotípica e fenotípica desses parasitos. As análises de CCNV (*Chromosome Copy Number Variation*) revelaram aneuploidias evidentes nos cromossomos 8, 23 e 31, nos quais estão contidos genes enriquecidos relacionados às atividades metabólicas, sobrevivência e virulência dos parasitos. A segunda parte do trabalho demonstrou a ocorrência de padrões atípicos de infecção em cinco cães da região metropolitana de Belo Horizonte que tiveram amostras caracterizadas sendo que quatro deles foram positivos para ambos subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, evidenciando um padrão de coinfeção, e um deles positivo apenas para o subgênero *Viannia*, sugerindo um perfil de visceralização de uma espécie até então relacionada com a forma tegumentar da doença, uma vez que a amostra utilizada foi obtida através de aspirado de medula óssea. Quatro dessas caracterizações foram confirmados através de sequenciamento de produtos de PCR. As análises populacionais e de enriquecimento gênico mostram-se bastante promissoras no desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos e de marcadores de subpopulações o que irá permitir uma maior compreensão dos isolados circulantes nas regiões endêmicas para a leishmaniose. Ainda, o estudo da LV a campo aliada às ferramentas moleculares e de bioinformática são de grande relevância para o melhor entendimento da

dinâmica populacional e adaptativa de isolados de *Leishmania*, o que pode influenciar diretamente no controle atualmente preconizado para a LV.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose Visceral. Cães; *Leishmania* spp.. Variabilidade genômica. Adaptabilidade. Coinfecção.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus, endemic in Brazil and in countries of the Old and New worlds. The clinical manifestations of the disease depend on the infectivity of the species involved and the host immune response. *Leishmania (Leishmania) infantum* is associated with the visceral form of the disease in humans and dogs, but some studies evidence the potential of visceralization of *Leishmania (L.) amazonensis*. Coinfection cases with the presence of more than one *Leishmania* species infecting the same host are less reported in the literature and may be underestimated. It is known that these trypanosomatids have great potential of adaptability in the face of the most adverse environmental conditions. The biological cycle of these parasites can undergo changes due to the environment in which they are exposed and, mainly, by anthroponotic changes in the ecosystem. The survival and perpetuation of *Leishmania* are related to modifications at the genetic level, which can modify its gene expression. Hence, there is great relevance in employing field samples from hosts, such as dogs and humans, from endemic areas for visceral leishmaniasis (VL), where parasites certainly undergo environmental pressures and can alter their genomic content and eventually their gene expression due to reservoirs, vectors and hosts availability. This work aims at performing a comparative analysis of *Leishmania infantum* isolates, predominantly from naturally infected dogs from different geographic regions of Brazil – Bahia, Governador Valadares, Januaria, Rio Grande do Norte and Santa Catarina. Through bioinformatics tools and molecular biomarkers, 85 isolates were analyzed for variation of chromosome number, variation of SNVs (*Single Nucleotide Variants*), phylogeny, population structure and gene enrichment. In addition, 24 field samples from dogs from the municipality of São Joaquim de Bicas, MG and from a Veterinary hospital in Belo Horizonte were characterized by employing subgenus-specific biomarkers, *Viannia* and *Leishmania*, in order to identify the circulating species in the region. The *in silico* analyses have demonstrated that there are intra and interpopulational variations between geographic areas and different time lapse for these non-clonal samples, which displays the dynamics of population variability that occurs defining distinct subpopulations over several years. The analyzes also point to the occurrence of more than one ancestral population among the isolates, suggesting the coexistence and interaction between parasites of different origins in the same environment increasing the genotypic and phenotypic diversity of these parasites. The CCNV (*Chromosome Copy Number Variation*) analyzes revealed aneuploidies more evident on chromosomes 8, 23 and 31, which contain enriched genes related to the metabolic activities, survival and virulence of the parasites. The second part of the work demonstrated the occurrence of atypical patterns of infection in five dogs from the metropolitan region of Belo Horizonte that had characterized samples, and four of them were found positive for both subgenus, *Viannia* and *Leishmania*, presenting a pattern of coinfection, and one of them was positive only for *Viannia* subgenus, suggesting a visceralization profile of species so far related to the tegumentary form of the disease, since the sample used was obtained through bone marrow aspiration. PCR products sequencing confirmed four of these results. Population and gene enrichment analyzes are very promising in the development of potential therapeutic targets and subpopulation markers, which will allow a greater understanding of circulating isolates in endemic regions for leishmaniasis. Moreover, the study of VL in field conditions associated to molecular tools and bioinformatics are of great relevance for better understanding population and adaptive dynamics of *Leishmania*, which may directly influence the VL control employed so far.

KEYWORDS: Visceral Leishmaniasis. Dogs. *Leishmania* spp.. Genomic variability. Adaptability. Coinfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo da <i>Leishmania infantum</i> nos hospedeiros mamíferos e inseto vetor..	26
Figura 2 - Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> sp. quanto aos três subgêneros a que pertencem e as principais espécies relacionadas ao complexo das leishmanioses.	27
Figura 3 - Mapas representativos das regiões geográficas de obtenção dos isolados de cães e humanos.	41
Figura 4 - Representações gráficas obtidas através do FastQC para avaliação da qualidade das <i>reads</i> sequenciadas.	53
Figura 5 - Histograma de distribuição geral da frequência de variação do número de cópias cromossômicas dos isolados em relação ao genoma de referência.	57
Figura 6 - <i>Heatmap</i> com a distribuição de CCNV e dendograma da clusterização hierárquica baseada no padrão de aneuploidias dos isolados de <i>L. infantum</i> de cada região geográfica.	58
Figura 7 - <i>Heatmap</i> com a distribuição de CCNV e dendograma da clusterização hierárquica baseada no padrão de aneuploidias dos isolados de <i>L. infantum</i> provenientes de Januária.....	60
Figura 8 – Prevalência de genes anotados enriquecidos de acordo com a função hierárquica.	63
Figura 9 – Análise de enriquecimento gênico quanto a <i>Biological Process</i> (BP).....	66
Figura 10 – Análise de enriquecimento gênico quanto a <i>Cellular Component</i> (CC)...	67
Figura 11– Análise de enriquecimento gênico quanto a <i>Molecular Function</i> (MF)...	69
Figura 12 – Divergência dos isolados quanto a diferença de nucleotídeos incluindo todas as regiões geográficas estudadas – representação em gráfico 2D.....	75
Figura 13 – Divergência dos isolados quanto a diferença de SNVs incluindo todas as regiões geográficas estudadas – representação em gráfico 3D.....	76
Figura 14 – Divergência temporal dos isolados de GV quanto a diferença de SNVs..	77
Figura 15 – Divergência dos isolados de Januária quanto a diferença de SNVs e área de coleta.....	78
Figura 16 - Árvore de divergência genética dos isolados mapeados no genoma de referência..	80
Figura 17 - Árvore de divergência genética dos isolados de GV mapeados no genoma de referência..	81
Figura 18 – Estimativa de ancestralidade pela análise de <i>admixture</i> dos isolados.....	84
Figura 19– Estimativa de ancestralidade pela análise de <i>admixture</i> para os isolados de GV..	85
Figura 20 –Estimativa de ancestralidade pela análise de <i>admixture</i> dos cromossomos dos isolados.....	87
Figura 21 - Perfil de amplificação de amostras de cães com sinais clínicos de LVC utilizando iniciadores subgênero-específicos	94

Figura 22 - Perfil de amplificação de amostra de cão com recidiva em tratamento para a LVC utilizando iniciadores subgênero-específicos.	95
Figura 23 - Perfil de amplificação de amostras de cão assintomático positivo apenas para subgênero <i>Viannia</i>	96
Figura 24 - Eletroferograma representativo de amostra positiva para o subgênero <i>L. Leishmania</i> analisada no <i>Sequencher</i>	97
Figura 25 - Resultado da análise de similaridade por BLASTn (GenBank – NCBI) das sequências obtidas..	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização geomorfológica e climáticas das cidades do RN incluídas no estudo.....	42
Tabela 2. Caracterização dos isolados incluídos nos estudos quanto a origem e data de coleta.....	44
Tabela 3. Número de <i>reads</i> totais e mapeadas no genoma de referência para os isolados de cada região geográfica.	54
Tabela 4. Número de variantes totais (SNPs, <i>indels</i> e heterozigotos) mapeadas no genoma de referência para os isolados de cada região geográfica.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA – Bahia
BAM - Binary Alignment Map
BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool - *Nucleotide*
BOD - *Biochemical Oxygen Demand*
BP – *Biological process*
BSA – *Bovine Serum Albumin*
CC – *Cellular component*
CCNV – *Chromosome copy number variation*
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CRISPR - *Clusters of regularly interspaced short palindromic repeats*
CV error – *Cross validation error*
DNA - *Deoxyribonucleic Acid*
DPP - *Dual Path Platform*
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
gDNA –*genomic Deoxyribonucleic Acid*
GO – *Gene Ontology*
gp63 – *Glycoprotein 63*
GTR – *General Time Reversible*
GV – Governador Valadares
HIV – *Human immunodeficiency virus*
J – Januária
JTT - *Jones-Taylor-Thornton*
kDNA – *kinetoplastic Deoxyribonucleic Acid*
KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
km - quilômetros
LIGP – Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos
LC – Leishmaniose cutânea
LCD - Leishmaniose cutâneo-difusa
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
Li – Leishmania infantum
LMC – Leishmaniose muco-cutânea
LPG – Lipofosfoglicanos (*lipophosphoglycans*)
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV – Leishmaniose Visceral
LVC – Leishmaniose Visceral Canina
LVH – Leishmaniose Visceral Humana
µL – Microlitro
m – Metro
mL – Mililitro
MF – *Molecular function*
MG – Minas Gerais
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng – Nanograma
NNN – Neal, Novy, Nicolle
OMS - Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de base
PBMC - *Peripheral blood mononuclear cell*
PCA - *Principal Component Analysis*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PCR-RFLP - *Restriction fragment length polymorphism PCR*
PFGE - *pulsed field gel electrophoresis*
PKDL – *Post kalazar dermal leishmaniasis*
PUC – Pontifícia Universidade Católica
rKDDR - recombinant Kinesin Degenerated Derived Repeat
RN – Rio Grande do Norte
rpm – rotação por minuto
SAM - Sequence Alignment Map
SC – Santa Catarina
SFB – Soro Fetal Bovino
SJB – São Joaquim de Bicas
SMF - Sistema Monocítico Fagocitário
SNP – *Single nucleotide polymorphism*
SRA – *Sequence read archive*
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
VL – Visceral leishmaniasis
WGS – *Whole Genome Sequence*
°C – Graus *Celsius*
% - Porcentagem/ Frequência
 Σ - Somatório

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. <i>Leishmania</i> spp. e as leishmanioses	25
2.2. Variações no ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	28
2.3. Plasticidade genômica.....	31
2.3.1. Adaptabilidade frente a pressões ambientais	31
2.3.2. Variação do número de cópias cromossômicas e aneuploidia em mosaico	33
3. JUSTIFICATIVA	36
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivos gerais.....	37
4.2. Objetivos específicos:	37
CAPÍTULO I:	39
<i>Comparação da variabilidade genômica de isolados de Leishmania spp. de humanos e cães naturalmente infectados provenientes de cinco regiões brasileiras distintas.</i>	39
5. MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1. Caracterização das amostras e das áreas endêmicas estudadas	40
5.2. Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> , extração de DNA e caracterização dos isolados	46
5.3. Obtenção de <i>reads</i> de banco de dados públicos e sequenciamento dos genomas	47
5.4. Processamento das <i>reads</i> obtidas no sequenciamento	48
5.5. Mapeamento das <i>reads</i> no genoma de referência.....	48
5.6. Cálculo da variação do número de cópias cromossômicas (CCNV)	49
5.6.1. Dendograma de clusterização	49
5.7. Análise de <i>single nucleotide variants</i> (SNVs) - PCA	49
5.8. Análise de divergência genética	50
5.9. Estimativa individual de ancestralidade	51
5.9.1. Análise por indivíduo.....	51
5.9.2. Análise por cromossomo.....	51
5.10. Análises de ontologia gênica – GO.....	52
6. RESULTADOS	53
6.1. Análise das <i>reads</i> e porcentagem das <i>reads</i> que mapearam no genoma de referência de <i>L. infantum</i> JPCM5 v45	53
6.2. Variação do número de cópias cromossômicas	56
6.3. Análises de ontologia gênica– GO.....	62
6.4. Divergência genética dos isolados através da análise de variantes	70
6.4.1. Quantificação e análise do número de variantes.....	70
6.4.2. Análise de componente principal.....	75
6.5. Análise de divergência genética	78
	XX

6.6. Estimativa individual de ancestralidade	82
6.6.1. Por indivíduo	82
6.6.2. Por cromossomo	85
CAPÍTULO II:.....	88
<i>Investigação de casos de coinfeção por Leishmania spp. em cães de área endêmica, naturalmente infectados através de marcadores biomoleculares.</i>	<i>88</i>
7. INTRODUÇÃO.....	89
7.1. Casos de infecção atípica por <i>Leishmania</i> spp.....	89
8. MATERIAIS E MÉTODOS	90
8.1. Obtenção das amostras de campo e ética no uso de animais	90
8.2. Triagem e inclusão dos cães no estudo.....	90
8.3. Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	91
8.4. Extração de gDNA e caracterização molecular.....	91
8.5. Sequenciamento de <i>amplicons</i> de amostras positivas	92
9. RESULTADOS	93
9.1. Triagem e inclusão dos cães no estudo	93
9.2. Caracterização genotípica de isolados de cães naturalmente infectados	93
9.3. Sequenciamento de <i>amplicons</i> de amostras positivas	97
10. DISCUSSÃO	99
11. CONCLUSÃO	116
12. PERSPECTIVAS	118
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
14. ANEXOS.....	136

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose compreende um complexo de doenças causadas por parasitos digenéticos do gênero *Leishmania* (Família Trypanosomatidae) com distribuição mundial e um espectro de manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas leves a acometimento visceral e óbito de acordo com a espécie envolvida e *status* imune e nutricional do hospedeiro vertebrado (DEN BOER *et al.*, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

De maneira geral, a doença manifesta-se por duas principais formas clínicas: tegumentar e visceral e pode ser causada por cerca de 20 diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015). No Brasil a espécie *L. infantum* (Maurício *et al.*, 1999, Maurício *et al.*, 2000) é aquela mais associada aos quadros de leishmaniose visceral (LV) e as espécies como *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, estão relacionadas à forma clínica tegumentar da doença, embora alguns estudos indiquem o potencial de visceralização de *L. braziliensis* (Hernández *et al.*, 1993; Kaye & Beattie, 2016) e alguns grupos de pesquisa tenham isolado tanto *L. braziliensis* (CARVALHO *et al.*, 2015; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; MARQUEZ *et al.*, 2017) como *L. amazonensis* (DIAS *et al.*, 2011; TOLEZANO *et al.*, 2007; VALDIVIA *et al.*, 2017) de cães naturalmente infectados com quadros de manifestação clínica de LV.

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam a incidência anual da leishmaniose em 1,3 milhão de casos. Destes, 0,3 milhão corresponde à LV e um milhão à leishmaniose tegumentar humana. Ainda, foi reportado que as leishmanioses estão distribuídas mundialmente entre 200 países sendo que cinco deles – Afeganistão, Brasil, Irã, Iraque e Síria - concentram 75% dos casos de LT (leishmaniose tegumentar) e sete deles – Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul – abrangem 90% dos casos reportados de LV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Em termos globais, estimam-se 20.000-40.000 óbitos de humanos relacionados à leishmaniose ao ano (ALVAR *et al.*, 2012).

No Brasil, estimou-se no triênio 2016-2018 uma incidência de 15,8 casos/100.000 habitantes representada por 15.632 novos casos de leishmaniose cutânea (LC) e 800 novos casos de leishmaniose muco-cutânea (LMC) que representam 84% do total de casos notificados nas Américas (PAHO/WHO, 2019). A forma visceral da doença é a mais grave e, se não tratada, estima-se que 90% dos casos possam evoluir para o óbito (PAHO/WHO, 2019). O Brasil representa um dos quatro países com o maior número de casos de

leishmaniose visceral humana (LVH), representando 14% dos casos globais e 97% das Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A incidência anual no ano de 2018 foi de 5,05 casos/100.000 habitantes com 276 mortes contabilizadas (PAHO/WHO, 2019).

Nos cães a prevalência da leishmaniose visceral canina (LVC) é bastante variável entre regiões geográficas e períodos distintos de levantamento com ausência de dados oficiais completos. Através de estudos epidemiológicos pela detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* é possível realizar uma estimativa da ocorrência de LVC no Brasil. Em um estudo conduzido por Camargo-Neves *et al.* (2001) em Araçatuba, São Paulo, foi encontrada uma prevalência geral de 12,1% referente ao ano de 1999; em Pancas, Espírito Santo, foi observada uma prevalência de 57,0% dentre 43 cães testados entre 2003-2004 (FALQUETO *et al.*, 2009). No período entre setembro de 2015 e novembro de 2016, foram testados 516 cães de Goiana, Pernambuco e 307 cães de São Joaquim de Bicas, Minas Gerais, e em 14,7% e 19,5%, respectivamente, foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* (DANTAS-TORRES *et al.*, 2020).

Dados adicionais do estado de Minas Gerais demonstraram uma prevalência de 10,2% dentre 957 cães estudados (BORGES *et al.*, 2014); além disso, um levantamento realizado por Bruhn *et al.* (2018) demonstrou uma proporção de soroprevalência canina (razão entre os cães soropositivos no ELISA e IFATT e o número de cães incluídos no estudo) em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período entre 2006 a 2012 de 7,31%. Em Governador Valadares, no período de 2008 a 2011 foi conduzido um estudo por Barata *et al.* (2013) em 35 distritos da cidade com um total de 16.529 cães e foi encontrada uma soroprevalência de 30,2%.

O diagnóstico clínico para a LV em humanos é complexo, uma vez que a sintomatologia se confunde com a de outras doenças, sobretudo na ocorrência de coinfeção e imunossupressão. Para os cães, o Ministério da Saúde preconiza a realização do teste imunocromatográfico para triagem- DPP (*Dual Path Platform*) – e o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) como teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Ainda não existe um fármaco de uso veterinário eficaz capaz de conduzir à cura parasitológica dos cães, mas promove a redução da carga parasitária e o abrandamento ou supressão dos sinais clínicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O controle indicado para a contenção da leishmaniose consiste em uma tríade, que preconiza o tratamento dos humanos infectados, combate dos flebotomíneos com inseticidas de efeito residual aspergidos no domicílio e peridomicílio e a eutanásia dos cães soropositivos (TESH, 1995). Porém, levando em consideração os dados de incidência de casos de LVC e

LVH, mortalidade e prevalência disponibilizadas pelas instituições de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) fica claro que existe uma falha nos métodos de controle vigentes.

Muito além disso é importante considerar o comportamento biológico de *Leishmania* spp. e sua elevada capacidade de adaptação frente a condições adversas determinadas pela terapêutica incorreta da doença, processo de urbanização e mudanças ambientais (LAFFITTE *et al.*, 2016; RAMEZANKHANI *et al.*, 2018). Essa plasticidade genômica dos parasitos contribui para a ocorrência de populações variadas do parasito, adaptadas a diferentes condições ambientais e, por vezes, mais virulentas e resistentes. Além disso, o conhecimento da ocorrência de coinfeção com mais de uma espécie e diferentes populações de *Leishmania* spp. no mesmo hospedeiro, assim como o potencial de visceralização de espécies dermatotrópicas do parasito ainda possui várias lacunas.

Dessa forma, caracterização e genotipagem de isolados de *Leishmania*, assim como estudos de genômica de população e de perfis de expressão são abordagens promissoras para uma maior compreensão do ciclo evolutivo e adaptativo desses parasitos e podem contribuir para o direcionamento de diagnóstico, tratamento e métodos de controle mais precisos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Leishmania* spp. e as leishmanioses

A leishmaniose é um complexo de doenças transmitidas por vetores, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), hospedeiros invertebrados, pertencem ao gênero *Phlebotomous* nos países do Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e *Lutzomyia* spp. em territórios do Novo mundo (Américas) e podem transmitir os agentes etiológicos das leishmanioses (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; DEN BOER *et al.*, 2011).

Durante o ciclo biológico desses parasitos, fêmeas dos insetos vetores realizam o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados com *Leishmania* spp., dentre eles humanos e cães, estes considerados os principais reservatórios urbanos da LV no Brasil e em outros países endêmicos (QUINNELL; COURTENAY, 2009; SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020).

Nos hospedeiros vertebrados são encontradas formas amastigotas do parasito que infectam os flebotomíneos no momento do repasto sanguíneo da fêmea. Nestes, o protozoário realiza parte de seu ciclo biológico que culmina com a evolução do parasito para a forma promastigota metacíclica, infectante ao hospedeiro mamífero. As promastigotas metacíclicas são regurgitadas no momento em que o flebotomíneo realiza a hematofagia em seu hospedeiro e estas alcançam células do sistema fagocitário mononuclear (SMF), dentre elas neutrófilos e macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo (KILLICK-KENDRICK, 1999; LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). As amastigotas possuem curso de replicação rápida e após sucessivas divisões binárias as células infectadas se rompem e liberam as amastigotas na corrente sanguínea (BARRAL-NETTO *et al.*, 1986; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). De forma dinâmica, estas irão infectar novas células do SMF, dentre as quais macrófagos residentes da pele, o que favorece a infecção de flebotomíneos em um próximo repasto sanguíneo, podendo atingir também órgãos hematopoiéticos, como medula óssea, baço e fígado (REITHINGER *et al.*, 2007; WHO, 2015) (Figura 1).

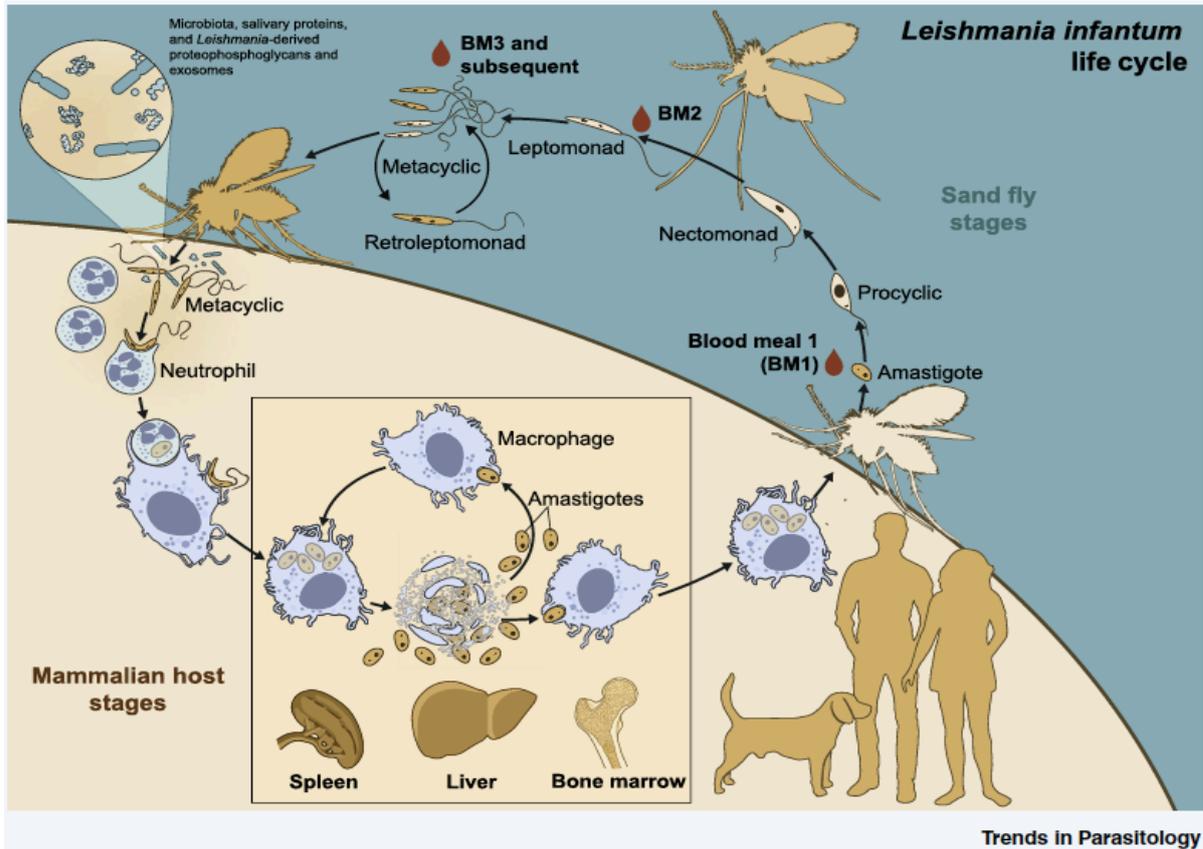


Figura 1 - Ciclo da *Leishmania infantum* nos hospedeiros mamíferos e inseto vetor. Disponível em SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, (2020).

Sabe-se que atualmente, aproximadamente 50 espécies do parasito já foram descritas sendo que 31 delas parasitam mamíferos e destas, 20 são patogênicas para o homem (AKHOUNDI *et al.*, 2016; CHAUHAN *et al.*, 2015; DESJEUX, 2004). Diferentes espécies de *Leishmania* podem estar relacionadas com uma ou mais manifestações clínicas, o que irá determinar a forma na qual as leishmanioses se apresentam.

Quando o hospedeiro vertebrado apresenta apenas lesões ulcerativas no local da picada do flebotomíneo, a doença é caracterizada como *leishmaniose cutânea localizada* (LCL); nódulos múltiplos não ulcerados caracterizam a *leishmaniose cutâneo-difusa* (LCD); lesões de padrão inflamatório nas mucosas designam a *leishmaniose muco-cutânea* (LMC). Todas elas constituem manifestações tegumentares da doença (LT) (PACE, 2014; REITHINGER *et al.*, 2007). A forma dermal pós-calazar (PKDL) possui manifestação cutânea, mas está comumente associada a recidivas de pacientes com LV, causada por *L. donovani* que tiveram cura clínica aparente. Os agentes etiológicos associados a cada forma clínica estão relacionados na Figura 2.

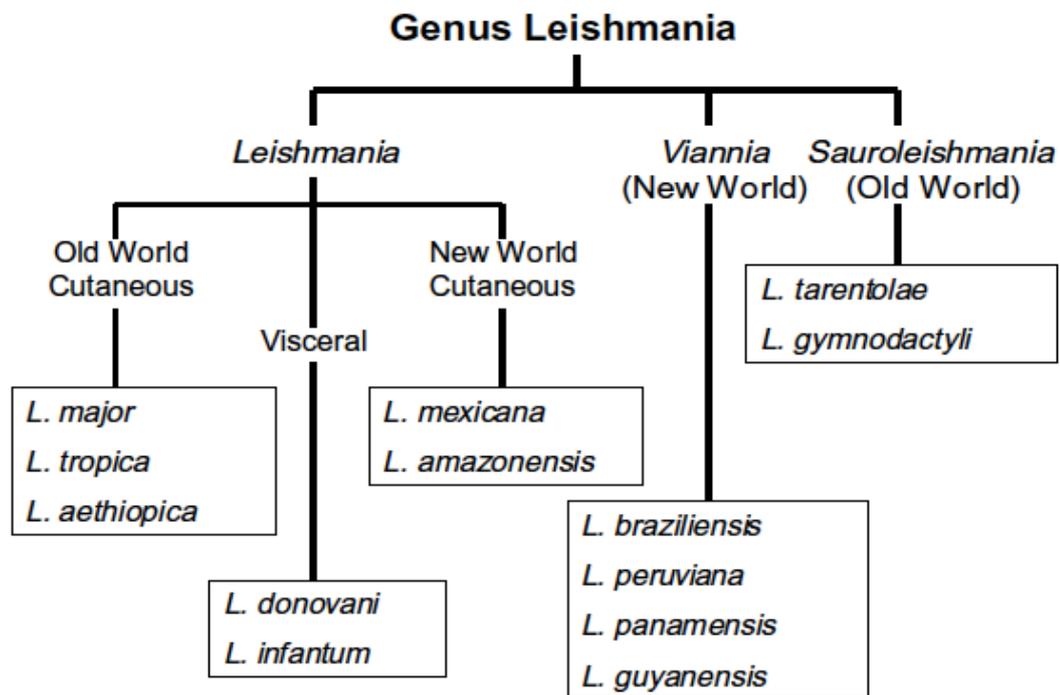


Figura 2 - Classificação das espécies de *Leishmania* sp. quanto aos três subgêneros a que pertencem e as principais espécies relacionadas ao complexo das leishmanioses. Disponível em BATES (2007).

Antes do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular aplicadas à genotipagem do parasito, as espécies de *Leishmania* consideradas viscerotrópicas eram *L. donovani*, *L. infantum*, (sin. *L. chagasi*) e *L. archibaldi* (BATES, 2007; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Estudos adicionais realizados através de análises bioquímicas e filogenéticas (FRAGA *et al.*, 2010, 2013; SCHÖNIAN; MAURÍCIO; CUPOLILLO, 2010) demonstraram que essas espécies apresentavam variabilidade genética limitada. Dessa forma *L. infantum*, (sin. *L. chagasi*) e *L. archibaldi* foram incluídas no complexo *Leishmania donovani* como subespécies (FERNÁNDEZ-ARÉVALO *et al.*, 2020; MAURÍCIO, 2018). Populações de *L. infantum* e *L. chagasi* oriundas da Europa e América do Sul, respectivamente são indistinguíveis através de biomarcadores moleculares (KUHLS *et al.*, 2007), dessa forma mantem-se o consenso de que *L. infantum* e *L. chagasi* referem-se a mesma espécie sendo consideradas sinônimas (DANTAS-TORRES, 2006; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). Atualmente, *L. donovani* é considerado o agente etiológico causador da leishmaniose visceral antroponótica na Ásia, Oriente Médio e África e *L. donovani infantum* a espécie relacionada a LV de caráter zoonótico nas Américas, Europa e também em alguns territórios asiáticos e do Oriente Médio.

De maneira geral, as infecções por *L. donovani* e *L. infantum* determinam episódios irregulares de febre e esplenomegalia. Alterações como pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia com deposição de imunocomplexos em tecidos e caquexia também podem ocorrer (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Vale ressaltar que essa variação de manifestações clínicas se deve, em parte, à existência de diferentes cepas de *L. infantum*, que podem apresentar diversos níveis de virulência determinando a gravidade da doença. Fatores associados ao hospedeiro como raça, *status* imunológico e nutricional também implicam diretamente no curso de evolução da doença, determinando quadros sintomáticos ou assintomáticos (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

2.2. Variações no ciclo biológico de *Leishmania*

Vários relatos têm evidenciado casos de infecções e lesões atípicas causadas por *Leishmania* spp., além de alterações nos padrões de desenvolvimento da doença e mudanças na relação entre os componentes da tríade vetor-parasito-hospedeiro (BANETH *et al.*, 2017; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; GOSCH *et al.*, 2018; GULDEMIR; USLUCA; NALBANTOGLU, 2020; MADEIRA *et al.*, 2006; PIRES *et al.*, 2014; POMBI *et al.*, 2020; VALDIVIA *et al.*, 2017; VEASEY *et al.*, 2020).

OLIVEIRA NETO *et al.* (1986b) descreveram pela primeira vez a ocorrência de infecção mista por diferentes espécies de *Leishmania* em uma criança de cinco anos no Rio de Janeiro, Brasil. Neste estudo, *L. braziliensis* foi isolada de uma úlcera na testa da criança e *L. infantum* foi isolada de aspirado de medula óssea. O mesmo grupo também identificou *L. infantum* em lesão cutânea em um paciente humano e em um cão, ambos sem manifestações clínicas sistêmicas (OLIVEIRA NETO *et al.*, 1986a). Caso semelhante foi observado por LYRA *et al.* (2015) em uma mulher de 89 anos, moradora de uma zona urbana do Rio de Janeiro.

CARVALHO *et al.* (1986) estudaram a progressão da leishmaniose visceral em pacientes baianos no Brasil e relataram o primeiro caso humano de LV causada por *L. amazonensis*. Neste estudo, a espécie do parasito foi identificada através de análise de perfil de eletroforese de isoenzimas e por um painel de anticorpos monoclonais espécie e subespécie-específicos.

Em uma área rural do Tocantins, no Brasil, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* foram isoladas de lesões cutâneas disseminadas de um homem de 68 anos (GOSCH *et al.*, 2018). Com o tratamento das infecções causadas por *Leishmania* spp., em geral, espera-se a remissão dos sinais clínicos. Contudo, particularmente nesse quadro de coinfeção o paciente foi submetido a diversos esquemas terapêuticos em decorrência de recidivas das lesões. Além disso, as análises histopatológicas e imunocitoquímica revelaram um perfil misto de resposta inflamatória.

Os autores sugeriram que a infecção por ambos os parasitos pode ter induzido falha terapêutica, uma vez que infecções causadas por *L. (V.) guyanensis* induzem resposta celular e humoral menos intensa, explicando o maior número de parasitos nas lesões, enquanto que *L. (L.) amazonensis* apresenta alta capacidade de bloquear a resposta imune celular específica (GOSCH *et al.*, 2018).

Na medicina veterinária existem diversos estudos que evidenciam padrões de infecções atípicas por *Leishmania* (BANETH *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2011; MADEIRA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2020; TOLEZANO *et al.*, 2007; VALDIVIA *et al.*, 2017). Infecções mistas foram relatadas por FERREIRA *et al.* (2015) em roedores de áreas urbanas no estado de Minas Gerais, Brasil. Aproximadamente 10% dos animais, considerados reservatórios de parasitos relacionados à LT, foram positivos para *L. braziliensis*, isolada da pele, e *L. infantum*, isolada do sangue periférico, fígado, baço e medula óssea através de *nested* PCR e sequenciamento de DNA, concomitantemente.

MADEIRA *et al.* (2006) reportaram o primeiro caso de infecção mista natural e autóctone em um cão na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. O animal apresentava uma úlcera cutânea na superfície interna da orelha e sem sinais clínicos sistêmicos. Amostras biológicas foram coletadas e caracterizadas molecularmente como *L. (V.) braziliensis* isolada da lesão cutânea e *L. (L.) infantum* de células mononucleares e aspirado de linfonodo poplíteo. Alguns anos depois, o mesmo grupo de pesquisa utilizou a técnica RFLP-PCR para identificar dois cães com o mesmo padrão de infecção mista, reforçando a ideia de que cães também podem atuar como reservatórios para espécies de *Leishmania* associadas à forma cutânea da doença (PIRES *et al.*, 2014).

O trabalho de Santos *et al.* (2020) também aponta para a possível participação do cão no ciclo de transmissão da LT em vilarejos da Amazônia brasileira, uma vez que foi detectado DNA de *L. braziliensis* (3/40) e *L. guyanensis* (5/40) em amostras de sangue periférico, tendo os achados sido confirmados por sequenciamento.

Estudos como esses destacam a importância de considerar outras espécies além de *L. infantum* durante o diagnóstico da LVC. Nesse sentido, SANCHES *et al.* (2016) demonstraram a importância de identificar corretamente as espécies de *Leishmania* em cães. Nesse estudo, em análises sorológicas e moleculares, 74,8% dos cães incluídos testaram positivo para *L. amazonensis* e 16,5% para *L. infantum*; os 8,7% restantes foram positivos para ambos os parasitos.

Em diferentes estados brasileiros como Bahia, Pernambuco e Paraná, foram realizados estudos com cães e gatos infectados por *L. braziliensis* em diferentes tecidos biológicos e através de técnicas moleculares, sorológicas e parasitológicas distintas (CARVALHO *et al.*, 2015; COSTA-VAL *et al.*, 2020; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; FIGUEREDO *et al.*, 2012; MARQUEZ *et al.*, 2017). Outros trabalhos detectaram *L. amazonensis* em cães com manifestações clínicas viscerais (DIAS *et al.*, 2011; TOLEZANO *et al.*, 2007; VALDIVIA *et al.*, 2017).

DIAS *et al.* (2011) isolaram *L. amazonensis* de cinco cães de uma área endêmica do estado de Minas Gerais e identificaram *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *flaviscutellata* como o vetor deste parasito na área geográfica estudada. A capacidade do parasito em colonizar o intestino de flebotomíneos que não são considerados seus vetores naturais eleva a possibilidade desses parasitos infectarem outros hospedeiros em diferentes habitats. Alguns autores correlacionam ainda, a competência do vetor e os LPGs de superfície de promastigotas de *Leishmania* spp. como fatores determinantes para o desenvolvimento completo desses parasitos em diferentes flebotomíneos e na possível transmissão de diferentes espécies desses protozoários durante o repasto sanguíneo (VOLF; PECKOVA, 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o grupo do Prof. Alexandre Reis da Universidade de Ouro Preto, iniciou um estudo em Governador Valadares, região endêmica de LV em Minas Gerais, com o objetivo de caracterizar os genomas de isolados de *Leishmania* obtidos de cães com manifestações clínicas sugestivas de LV. Por meio de genotipagem molecular de parasitos isolados através de aspirados de medula óssea e linfonodos de cães com sinais clínicos viscerais foi possível identificar dois isolados caracterizados como *L. amazonensis*, confirmado através de sequenciamento, enquanto outros 34 isolados foram caracterizados como sendo *L. infantum* (VALDIVIA *et al.*, 2017). Os testes sorológicos realizados em todas as amostras utilizando o kit EIE-LVC revelaram reatividade cruzada com soros de cães infectados com *L. amazonensis*. Este estudo enfatiza a necessidade de uma investigação proativa das diferentes espécies de *Leishmania* que causam a forma

visceral da doença neste e em outros focos endêmicos. Além disso, os esforços de controle nesta e outras regiões endêmicas brasileiras devem considerar a presença de *L. amazonensis* e avaliar a ocorrência de padrões de infecções atípicas e coinfeção em pacientes com leishmaniose.

Todos esses estudos demonstram que os padrões de infecção e a relação existente entre a tríade parasito-vetor-hospedeiro são mais complexos do que se tem conhecimento e possivelmente, de ocorrência mais frequente do que se tem noticiado.

Apesar de infecções experimentais serem extensivamente realizadas, as interações que ocorrem em infecções naturais nem sempre vão de encontro àquilo que se observa em um sistema controlado. Dessa forma, qualquer alteração que envolva aspectos biológicos desses tripanosomatídeos pode influenciar de forma direta na abordagem do paciente com leishmaniose, de forma que o diagnóstico, tratamento e profilaxia da doença devem evoluir juntamente com novas descobertas (QUINNELL; COURTENAY, 2009).

Hoje sabe-se que parasitos do gênero *Leishmania* possuem uma alta plasticidade genômica, o que os permite adaptar a diversas condições de pressões ambientais (LAFFITTE *et al.*, 2016). Essa particularidade pode explicar, em parte, os casos atípicos de infecção que ocorrem. Dessa forma, estudos de genômica de populações podem contribuir para um melhor entendimento das variações genotípicas temporais e espaciais de isolados do parasito obtidos em diferentes áreas endêmicas.

2.3. Plasticidade genômica

2.3.1. Adaptabilidade frente a pressões ambientais

Evolutivamente, os organismos de diferentes espécies têm se adaptado de acordo com as pressões ambientais dos *habitats* em que estão inseridos (BATESON, 2017). A oferta de alimento, nos mais variados níveis da cadeia alimentar, e mudanças ambientais no que diz respeito à estruturação de fauna e flora e variações climáticas são fatores que têm constantemente sofrido alterações, principalmente por ação do homem (GAGE *et al.*, 2008; HENDRY; GOTANDA; SVENSSON, 2017; TUON; AMATO NETO; SABBAGA AMATO, 2008).

De maneira geral, tripanosomatídeos possuem grande potencial de adaptação frente mudanças ambientais (LUKEŠ *et al.*, 2014) e, mais recentemente, parasitos do gênero

Leishmania estão sendo intensamente estudados pela sua plasticidade genômica e capacidade de adaptação na alternância de seus hospedeiros (DUMETZ *et al.*, 2017; SINHA *et al.*, 2018).

Algumas evidências apontam que a evolução de *Leishmania* spp. acompanha a migração dos seus vetores (AKHOUNDI *et al.*, 2016; PERROTEY *et al.*, 2005). Além disso, análises *bayesianas* e estudos de tempo de divergência permitem avaliar a proximidade ou distanciamento entre populações ou até mesmo isolados do mesmo parasito ao longo do tempo (NOYES, 1998; ZHARKIKH, 1994). Dessa forma é possível constatar a presença de um ancestral comum que fornecem indícios de uma longa perpetuação da população naquele meio ou uma introdução recente de novos indivíduos através de um relógio molecular (IBRAHIM; BARKER, 2001; MOMEN; CUPOLILLO, 2000; VALDIVIA *et al.*, 2017).

Contudo, mudanças climáticas que ocorrem em consequência do desmatamento e urbanização têm alterado a dinâmica biológica dos parasitos (GRAMICCIA; GRADONI, 2005). Além de fatores imunológicos e genéticos, alguns estudos demonstram que a interferência do homem no meio-ambiente pode afetar o comportamento dos parasitos (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

A ação antropogênica provocou mudanças expressivas em ambientes silvestres, onde pequenos roedores, marsupiais e outros mamíferos figuravam como principais reservatórios de *Leishmania* spp., sobretudo das espécies relacionadas à forma tegumentar da doença (TRÜEB *et al.*, 2018). Dessa forma, tanto a diminuição da oferta dos reservatórios naturais do parasito como a entrada do homem nos ambientes silvestres para execução de atividades como extração de madeira e agropecuária em geral, expuseram os humanos aos flebotomíneos, vetores de *Leishmania* spp. (REITHINGER *et al.*, 2007; VALDERRAMA; TAVARES; ANDRADE-FILHO, 2011). De maneira contrária, as destruições do *habitat* natural dos insetos vetores propiciaram sua inserção nos meios urbanos. Os flebotomíneos são altamente sinantrópicos, o que propicia a sua permanência nas cidades e a expansão dos casos de leishmaniose urbana (DINIZ *et al.*, 2008).

A adaptabilidade dos parasitos a novos reservatórios, o aumento de virulência e capacidade de visceralização de espécies dermatotrópicas de *Leishmania* sp. podem estar relacionados à alta plasticidade genômica do parasito, causando variações do número de cópias cromossômicas e de expressão gênica em resposta às modificações ambientais (ROGERS *et al.*, 2011).

2.3.2. Variação do número de cópias cromossômicas e aneuploidia em mosaico

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam grande plasticidade genômica, o que pode impactar em sua expressão gênica e conferir a eles capacidade de rápida adaptação a condições adversas como *stress* ambiental, pressão de drogas, mudanças em seu *habitat* natural ou na alternância e adaptação em diferentes hospedeiros (DUMETZ *et al.*, 2017; LACHAUD *et al.*, 2014; PRIETO BARJA *et al.*, 2017; SHAW, 1997). Essas características são conferidas, preponderantemente, pela ocorrência de SNVs (*Single Nucleotide Variants*), variações no número de cópias cromossômicas e de cópias gênicas.

Nesse sentido, vários grupos de pesquisa têm se dedicado aos estudos de genômica com o intuito de melhor compreender os mecanismos de evolução dos tripanosomatídeos e sua plasticidade genômica (BUSSOTTI *et al.*, 2018; DUMETZ *et al.*, 2017; LACHAUD *et al.*, 2014; ROGERS *et al.*, 2011; STERKERS *et al.*, 2012, 2014; VALDIVIA *et al.*, 2017).

Em um estudo conduzido por Dumetz *et al.* (2017), demonstrou-se que *L. donovani* possui a capacidade de alterar o padrão do número de cópias cromossômicas em resposta à manutenção do parasito *in vitro* ou *in vivo*, no hospedeiro invertebrado ou em hamsters. Essas alterações do número de cópias cromossômicas foram acompanhadas por mudanças no nível de expressão gênica, através de um mecanismo conhecido como *gene dosage*, sendo demonstrada uma correlação positiva entre número de cópias cromossômicas e níveis correspondentes de transcrição, apesar de mecanismos independentes de aneuploidia de regulação gênica terem sido observados para os cromossomos 5, 8 e 31. Promastigotas resisoladas dos insetos vetores tiveram um aumento de ploidia significativo quando comparado a amastigotas axênicas e isoladas de hamsters.

Ubeda *et al.* (2014) também demonstraram que subpopulações de *Leishmania* que carregam alterações no número de cópias cromossômicas possuem uma capacidade de resposta aumentada e mais rápida frente a mudanças ambientais. Alguns parasitos possuem elementos extracromossomais de sequências repetitivas, que caracterizam subpopulações com plasticidade genômica mais pronunciada (UBEDA *et al.*, 2014).

Sabe-se que o tamanho do genoma e número de cromossomos possui variação interespecífica: enquanto *L. donovani*, *L. infantum* e *L. major* possuem 36 cromossomos (WINCKER *et al.*, 1996), *L. braziliensis* possui 35 cromossomos resultantes da fusão entre os cromossomos 20 e 34 (BRITTO *et al.*, 1998) e *L. mexicana*, através de rearranjos cromossomais entre os cromossomos 8 e 29 e 20 e 36 totaliza 34 cromossomos (BRITTO *et*

al., 1998). Em todos os casos os experimentos foram realizados utilizando a tecnologia PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*). Esses rearranjos genômicos que ocorrem durante a evolução das espécies de *Leishmania* podem ter implicações para a adaptabilidade do parasito em diversos hospedeiros, o que influencia diretamente no curso de infecção em cada espécie (ROGERS *et al.*, 2011).

Apesar da maior parte do conteúdo gênico haploide estar conservado entre diferentes espécies do gênero *Leishmania*, variações do número de cópias cromossômicas pode ocorrer entre espécies, entre isolados da mesma espécie e entre células de uma mesma população de parasitos de uma mesma espécie. Esse padrão de heterogeneidade entre células de uma mesma população de parasitos constitui o que se chama de *aneuploidia em mosaico* (LACHAUD *et al.*, 2014; STERKERS *et al.*, 2012). Acredita-se que este mecanismo permita ao parasito se adaptar rapidamente a diferentes condições ambientais a que é submetido durante seu ciclo de vida (DUMETZ *et al.*, 2017; LAFFITTE *et al.*, 2016).

A análise de SNVs avalia a variação de nucleotídeo em uma posição específica do genoma. A identificação de SNVs em todo o genoma pode ser feita através do alinhamento de sequências de *whole genome sequencing* de diferentes isolados do parasito contra um genoma de referência. Essas variações podem, por exemplo, levar a alterações nas sequências proteicas correspondentes e/ou impactar os níveis de expressão gênica (BUSSOTTI *et al.*, 2018; DUMETZ *et al.*, 2017). Esses polimorfismos podem afetar a diversidade de manifestações clínicas, resistência a tratamento e adaptabilidade a pressões ambientais que ocorrem dentro da vasta diversidade populacional de isolados de *Leishmania* (PRIETO BARJA *et al.*, 2017; RASTROJO *et al.*, 2018).

Essas variações revelam-se frequentes quando se estuda parasitos de regiões geográficas diferentes, onde existem barreiras naturais, diversidade de ecossistema e influência antroponótica, que exerce forte influência na disponibilidade tanto de reservatórios como vetores dos parasitos (REIS-CUNHA *et al.*, 2018; TRÜEB *et al.*, 2018; VALDIVIA *et al.*, 2015).

Estudos relacionados à variação que existe dentro de uma mesma população de parasitos e entre isolados de populações distintas permitem uma melhor compreensão do comportamento dos tripanosomatídeos e a capacidade de rapidamente se adaptarem frente às pressões ambientais. Dados inerentes a alterações que ocorrem a nível cromossômico e que alteram a expressão gênica dos parasitos para melhor se adaptarem são essenciais e, especificamente para *Leishmania* sp. que possuem elevada plasticidade genômica, estudos

relacionados à variação de SNVs e divergência filogenética no tempo-espaço, tornam-se de grande utilidade na compreensão da dinâmica de populações desses parasitos, assim como fatores intimamente ligados à infectividade, virulência e resistência a fármacos (BOITÉ *et al.*, 2012; BUSSOTTI *et al.*, 2018; STEVERDING, 2017).

O estudo do aumento do número de cópias gênicas contribui na compreensão das vias metabólicas, mecanismos biológicos e funções e interações moleculares envolvidas quando o organismo é submetido a determinadas condições de pressão ambiental. Funções gênicas podem ser descritas a partir de funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos (DESSIMOZ; WALKER, 2017). Dessa forma, pela observação dos cromossomos aumentados de isolados de *Leishmania* spp. é possível investigar os genes que potencialmente se encontram enriquecidos em determinada circunstância.

As análises acima citadas foram aplicadas na execução desse trabalho a fim de melhor compreender as variações genômicas e fenotípicas que ocorrem em isolados de *Leishmania* spp. provenientes de diversas regiões geográficas brasileiras endêmicas para LV. Também foram explorados aspectos filogenéticos, de variação populacional e enriquecimento gênico dos isolados de campo o que possibilitaram uma melhor compreensão acerca do comportamento desses parasitos no ambiente em que estavam inseridos. Esse estudo, também poderá propiciar análises futuras para o desenvolvimento de potenciais marcadores a serem utilizados na investigação de populações específicas de *Leishmania* sp. assim como fenótipos populacionais que ocorrem em condições naturais.

3. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose, doença endêmica no Brasil e em vários outros territórios nos Novo e Velho Mundos, é causada por parasitos do gênero *Leishmania*, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença tropical negligenciada. Diversos estudos têm demonstrado uma elevada capacidade de adaptação de *Leishmania* sp. frente às mais diversas pressões e alterações ambientais, incluindo modificações de origem antroponótica. Atualmente o tratamento e controle vigentes tanto para os humanos e cães infectados possuem várias limitações, algumas delas relacionadas às variações genotípicas do parasito que podem impactar sua expressão gênica, resposta ao tratamento, eficácia vacinal e acurácia dos testes de diagnóstico. Além disso, tem sido cada vez mais frequente o relato de casos de infecções atípicas envolvendo uma ou mais espécies de *Leishmania*, o que pode impactar no tratamento da LV atualmente preconizado. Diante do exposto, nosso trabalho envolve o estudo minucioso e comparativo de isolados de *Leishmania* spp. de cães provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, endêmicas para a leishmaniose em diversos espaços temporais e a análise populacional que compreende os estudos de variabilidade genômica, divergência evolutiva e enriquecimento gênico desses isolados, além do estudo de casos de coinfeção.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

CAPÍTULO I: Comparação da variabilidade genômica de isolados de *Leishmania infantum* de cães e humanos naturalmente infectados provenientes de cinco regiões brasileiras distintas em diferentes espaços temporais.

CAPÍTULO II: Investigação de casos de coinfeção por *Leishmania* spp. em cães de área endêmica, naturalmente infectados através de biomarcadores moleculares.

4.2. Objetivos específicos:

CAPÍTULO I

-Avaliar a ocorrência de divergência genômica de isolados de *Leishmania infantum* em cães naturalmente infectados e pacientes quando em espaços temporais e regiões geográficas brasileiras distintos;

-Avaliar se ocorrem variações nos genomas montados quanto ao número de cópias cromossômicas e aneuploidias;

-Avaliar quais as funções possivelmente enriquecidas nos cromossomos com maior variação no número de cópias cromossômicas dentre os isolados avaliados e correlacionar com mecanismos de adaptação dos parasitos;

-Investigar se existem divergências intra e interpopulacionais significativas ou agrupamentos populacionais entre os isolados de acordo com sua origem geográfica e/ou espaço temporal;

- Estimar o número e frequência de populações ancestrais de *L. infantum* presentes nos genomas avaliados, assim como a nível cromossômico avaliando possíveis indícios de recombinação genômica.

CAPÍTULO II

-Investigar a ocorrência de infecções atípicas e coinfeções por mais de uma espécie de *Leishmania* sp. em cães naturalmente infectados no município de São Joaquim de Bicas e no Santo Agostinho Hospital Veterinário utilizando dois pares de iniciadores subgênero-específicos e sequenciamento de *amplicons*.

CAPÍTULO I:

Comparação da variabilidade genômica de isolados de Leishmania spp. de humanos e cães naturalmente infectados provenientes de cinco regiões brasileiras distintas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Caracterização das amostras e das áreas endêmicas estudadas

Os isolados incluídos nesse estudo são provenientes de cinco regiões geográficas distintas coletados em diversos espaços de tempo (Figura 3).

No Rio Grande do Norte (RN), estado do Nordeste brasileiro, foram coletadas amostras pelo grupo da Dra. Selma Jerônimo, ao longo de um período de 26 anos (n=20, sendo 15 de humanos e 5 de cães). Para isso foi realizado um estudo em nove cidades com características geográficas diferentes (Tabela 1). As sequências referentes a estas amostras foram obtidas em banco de dados públicos.

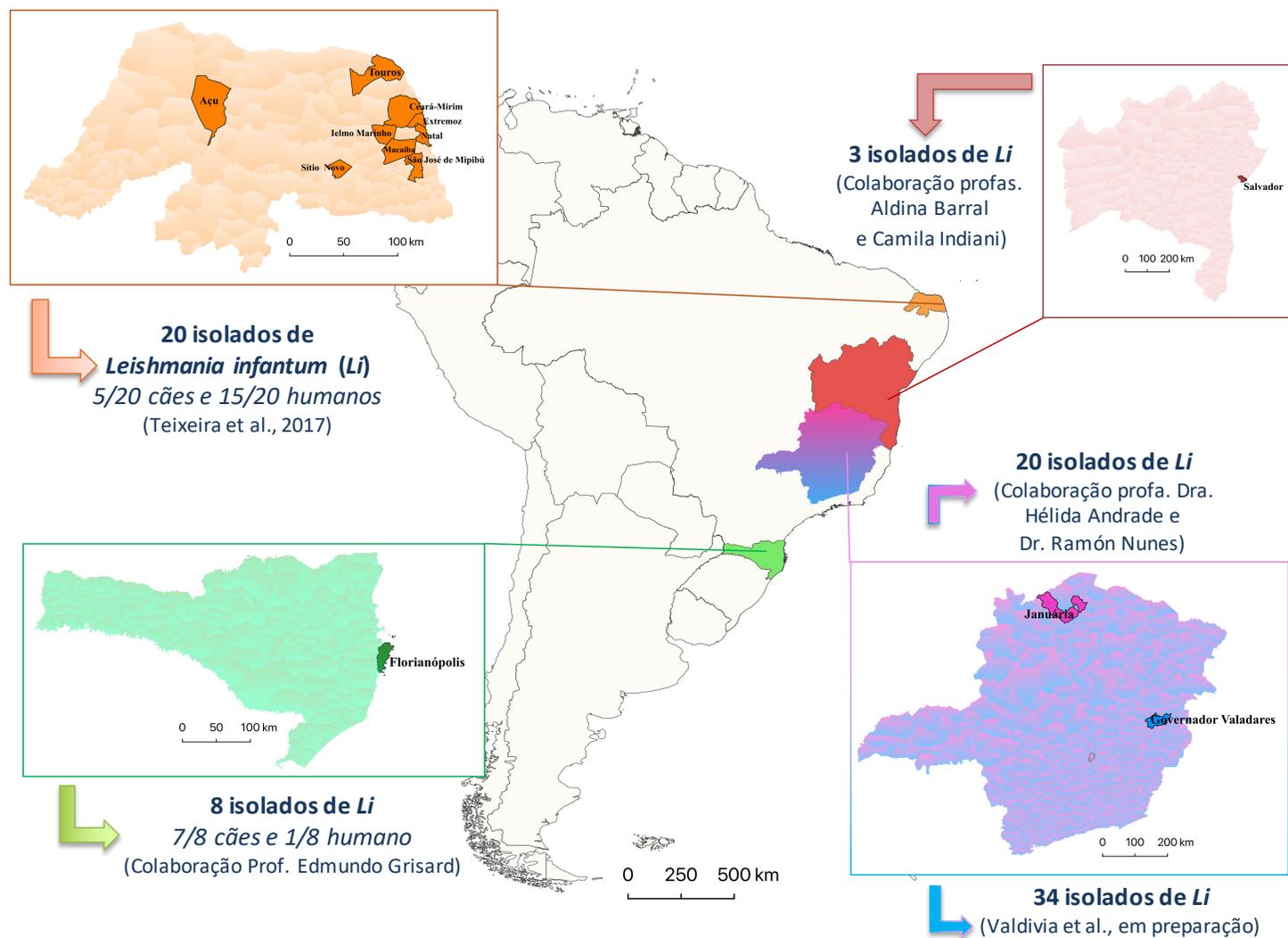


Figura 3 - Mapas representativos das regiões geográficas de obtenção dos isolados de cães e humanos. RN – Rio Grande do Norte; SC- Santa Catarina; BA – Bahia; GV- Governador Valadares; *Li* – *Leishmania infantum*. Imagem gerada através do software QGIS v3.12.

Tabela 1. Caracterização geomorfológica e climáticas das cidades do RN incluídas no estudo

CIDADE	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	MICRORREGIÃO	LOCALIZAÇÃO	ALTITUDE (metros)	CLIMA	TOTAL DE AMOSTRAS
Açu	05°47'42"S 35°12'32'O	Vale do Açu	Oeste de Natal	0-100	Semiárido	Humano: 1/20
Ceará-Mirim	05°38'02"S 35°25'33'O	Litoral do RN	Região metropolitana de Natal	0-100	Tropical úmido	Humano: 1/20
Extremoz	05°42'21"S 35°18'25'O	Litoral do RN	Região metropolitana de Natal	0-100	Tropical úmido	Humano: 2/20
Ielmo Marinho	05°49'26"S 35°33'07'O	Agreste Potiguar	Região metropolitana de Natal	0-100	Tropical úmido	Humano: 1/20
Macaíba	05°51'28"S 35°21'14'O	Margem do Rio Jundiáí	Região metropolitana de Natal	0-100	Tropical úmido	Humano: 3/20
Natal	05°34'37"S 36°54'32'O	Litoral do RN	Capital, região leste de RN	0-100	Tropical úmido	Cão: 5/20 Humano: 3/20
São José Mipibú	06°04'30"S 35°14'16'O	Leste Potiguar	Região metropolitana de Natal	50-100	Tropical úmido	Humano: 1/20
Sítio Novo	06°06'14"S 35°54'39'O	Borborema Potiguar	Sudeste de Natal	100-200	Tropical semiárido	Humano: 2/20
Touros	05°11'56"S 35°27'39'O	Litoral do RN	Nordeste de Natal	0-100	Tropical semiúmido e semiárido	Humano: 1/20

As amostras de Santa Catarina (SC), Sul do Brasil, são provenientes de Florianópolis, cidade insular e capital do estado, localizada a 27°35'49"S e 48°32'56"O, ao nível do mar e de clima subtropical úmido. Os isolados foram obtidos através de uma colaboração com o Prof. Dr. Edmundo Grisard, da Universidade Federal de Santa Catarina (n=8 – 7/8 de cães e 1/8 de humano) (Figura 3).

De Governador Valadares (GV) foram obtidas 34 amostras de cães, coletadas nos anos de 2008, 2012 e 2015 em 16 diferentes bairros da cidade, em colaboração com o Prof. Dr. Alexandre Reis (Universidade Federal de Ouro Preto) e sequenciadas durante o trabalho de doutorado do Dr. Hugo Valdivia desenvolvido no nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Dr. James Cotton do Sanger Institute (Figura 3). A cidade está localizada no Sudeste do estado de Minas Gerais a 18°51'03"S e 41°56'56"O, na mesorregião do Vale do Rio Doce, entre 250-550m de altitude e possui clima tropical quente semiúmido.

As amostras de Januária foram coletadas em setembro de 2017 e outubro de 2019 em diferentes localizações dentro da cidade, sendo n=8 de área urbana e n=12 de área rural. Estas amostras foram obtidas através de uma colaboração com a Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia/UFMG. Januária localiza-se no Norte do estado de Minas Gerais, na microrregião do médio São Francisco a 15°29'16"S e 44°21'43"O. Possui cerca de 400m de altitude um clima tropical com estação seca.

Ainda, em colaboração com a Dra. Aldina Barral e Dra. Camila Indiani foram inclusos no estudo três isolados de cães provenientes de Salvador, Bahia (Figura 3). A cidade é a capital do estado, localizada no litoral baiano a 12°58'40"S e 38°30'06"O com elevação de 36m e clima tropical.

Rio Grande do Norte, Governador Valadares, Januária e Bahia são regiões sabidamente endêmicas para leishmaniose, seja tegumentar ou visceral e Santa Catarina é um estado de emergência de casos da doença, onde têm sido encontrados cães e humanos infectados. As características referentes a cada isolado estão reunidas na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização dos isolados incluídos nos estudos quanto a origem e data de coleta

ID DOS ISOLADOS	HOSPEDEIRO	CIDADE DA COLETA	DATA DE COLETA	ORIGEM DA AMOSTRA
BA_Li-1055	Cão	Salvador -BA	1989-1992	Medula óssea
Ba_Li-1222	Cão	Salvador -BA	1989-1992	Medula óssea
BA_Li-262	Cão	Salvador -BA	1989-1992	Medula óssea
GV15795_5_1	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV15795_5_2	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV15795_5_3	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV_15795_5_4	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV_15795_5_5	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV_15795_5_6	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV_15795_5_7	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV_15795_5_8	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV_15795_5_9	Cão	GV -MG	2008	Medula óssea
GV_15795_5_10	Cão	GV -MG	2012	Medula óssea
GV_15795_5_11	Cão	GV -MG	2012	Medula óssea
GV_15795_5_12	Cão	GV -MG	2012	Medula óssea
GV_15795_5_13	Cão	GV -MG	2012	Medula óssea
GV_15795_5_14	Cão	GV -MG	2012	Medula óssea
GV_16453_7_1	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_2	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_4	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_5	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_7	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_8	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_9	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_10	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_11	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_12	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_13	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_14	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_15	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_16	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_17	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_18	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_19	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_20	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_21	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
GV_16453_7_22	Cão	GV -MG	2015	Medula óssea
J4	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J5	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J10	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J14	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J16	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J27	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J28	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J34	Cão	Januária -MG (AU ^{*1})	2017	Medula óssea
J75	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J76	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea

J82	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J83	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J84	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J88	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J94	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J97	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J99	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J101	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J106	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
J107	Cão	Januária -MG (AR ^{*2})	2019	Medula óssea
RN1	Cão	Natal - RN	2012	Baço
RN2	Humano	Sítio Novo -RN	2013	Medula óssea
RN3	Humano	Macaíba - RN	2012	Medula óssea
RN4	Cão	Natal - RN	2010	Baço
RN5	Humano	Sítio Novo -RN	2013	Sangue periférico
RN6	Cão	Natal - RN	2011	Baço
RN7	Humano	Extremoz - RN	2011	Sangue periférico
RN8	Humano	Natal - RN	1991	Medula óssea
RN9	Humano	Natal - RN	2011	Sangue periférico
RN10	Humano	Touros - RN	2011	Sangue periférico
RN11	Humano	Macaíba	2009	Pele
RN12	Humano	Natal - RN	2012	Sangue periférico
RN13	Humano	S. José Mipibu - RN	1993	Medula óssea
RN14	Humano	Extremoz - RN	2012	Medula óssea
RN15	Humano	Ceará Mirim - RN	1993	Medula óssea
RN16	Humano	Açu - RN	2012	Medula óssea
RN17	Humano	Macaíba - RN	1992	Medula óssea
RN18	Cão	Natal - RN	2012	Baço
RN19	Humano	Ielmo Marinho - RN	1992	Medula óssea
RN20	Cão	Natal - RN	2012	Baço
SC1002	Cão	Florianópolis -SC	2017	Medula óssea
SC1003	Cão	Florianópolis -SC	2018	Medula óssea
SC1004	Cão	Florianópolis -SC	2018	Medula óssea
SC1005	Cão	Florianópolis -SC	2018	Medula óssea
SC1006	Cão	Florianópolis -SC	2015	Medula óssea
SC1007	Cão	Florianópolis -SC	2016	Medula óssea
SC1008	Cão	Florianópolis -SC	2010	Medula óssea
SC1009	Humano	Florianópolis -SC	2017	Medula óssea

*1AU – área urbana de Januária; *2 AR– área rural de Januária

5.2. Obtenção de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, extração de DNA e caracterização dos isolados

As amostras obtidas de Januária em colaboração com o Laboratório de Leishmanioses eram provenientes de punção aspirativa de medula óssea de cães e foram cultivadas em tubos cônicos de 15mL (Falcon[®], Becton Dickinson - BD, New Jersey, USA) em meio de cultura bifásico NNN contendo *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) enriquecido com 10% de SFB (Cultilab, São Paulo, BR), penicilina 2mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e ágar-sangue preparado com sangue de coelho defibrinado cedido pelo Instituto René Rachou, FIOCRUZ-MG. As amostras foram incubadas em estufa biológica refrigerada BOD (Tecnal[®], modelo TE-371) à temperatura de 23°C. Amostras positivas com promastigotas em fase de crescimento estacionária foram contados e 1×10^8 parasitos/mL foram centrifugados a 2200 rpm (centrífuga refrigerada modelo Hettich Universal 32R, DJB Labcare, Newport Pagnell, UK), durante 10 minutos a 4°C para obtenção de pellet seco.

Para a extração de gDNA das amostras obtidas de cultura de parasitos foi utilizado o kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), de acordo com instruções do fabricante.

Em seguida, as amostras tiveram a concentração e qualidade do gDNA dosados por espectrofotometria (NanoDrop 2000c, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) e as concentrações ajustadas para 50ng/μL. Ainda, o material resultante da extração teve a integridade do gDNA checada e testada a contaminação por *Mycoplasma* spp. em reação de PCR usando os iniciadores: (MGSO: 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3' e GPO3: 3'-GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT-5'; fragmento de 270bp) assim como previamente descrito por TIMENETSKY *et al.* (2006).

A caracterização dos isolados foi realizada através de PCR convencional utilizando iniciadores subgênero-específicos para detecção de kDNA geral do subgênero *Viannia* (MP1L: 5'-TACTCCCCGACATGCCTCTG-3' e MP3H: 5'-GAACGGGGTTTCTGTATGC-3') com fragmento de 70pb e subgênero *Leishmania* (kDNA.Leish.F: 5'-CGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' como descrito por LOPEZ *et al.* (1993) e kDNA.Leish.R: 5'-CCGAAGCAGCCGCCCTATT-3') com fragmento de 135pb (CARDOSO *et al.*, 2019). Os fragmentos foram amplificados em termociclador MJ Mini (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA), a resolução dos fragmentos amplificados realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídeo e as imagens capturadas em

fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE *Healthcare*, Illinois, USA). A caracterização das espécies de *Leishmania* nos isolados de Januária foi confirmada através da utilização de um painel de iniciadores espécie-específicos desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (BENTO, G.A., em preparação).

5.3. Obtenção de *reads* de banco de dados públicos e sequenciamento dos genomas

Para a análise genômica comparativa de isolados de diferentes regiões geográficas brasileiras foram utilizadas *reads* (sequências obtidas durante a reação de sequenciamento genômico em plataforma *Illumina* que posteriormente são montadas e/ou alinhadas em um genoma de referência), obtidas do RN depositadas por Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA *et al.*, 2017) no banco de dados *online* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) onde foi realizado o *download* a partir do banco de dados SRA (*Sequence read archive*) (SRR5117893, SRR5117893, SRR5117894, SRR5117895, SRR5117896, SRR5117897, SRR5117898, SRR5117900, SRR5117901, SRR5117902, SRR5117903, SRR5117904, SRR5117905, SRR5117906, SRR5117907, SRR5117908, SRR5117909, SRR5117910, SRR5117911, SRR5117912).

As *reads* de Santa Catarina – SC foram obtidas em colaboração com o professor Edmundo Grisard da Universidade Federal de Santa Catarina e Dr. Bjorn Anderson do Karolinska Institute, Suécia e as da Bahia, obtidas e sequenciadas em colaboração com a Dra. Aldina Barral e Dra. Camila Indiani.

Para a análise das amostras de GV utilizamos *reads* previamente depositadas em nosso banco de dados, coletadas e sequenciadas anteriormente pelo Dr. Hugo Valdivia nos anos de 2008, 2012 e 2015 (artigo em preparação).

Os isolados de *L. infantum* de Januária foram obtidos em colaboração com o grupo da professora Héli da Monteiro de Andrade do departamento de Parasitologia ICB/UFMG. Assim como as amostras provenientes da Bahia, após o cultivo de parasitos e extração de gDNA, massas de 3-5µg das amostras foram encaminhadas para sequenciamento genômico completo na empresa Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea). As bibliotecas foram montadas através da tecnologia *Illumina*, plataforma HiSeq, com tamanho médio de inserto aproximado de 400-1000pb e utilizadas para produzir *reads paired-ended* de 100 pares de bases.

O genoma de referência utilizado foi de *Leishmania infantum* JPMC5 versão 45, disponível no banco de dados do TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/>).

5.4. Processamento das *reads* obtidas no sequenciamento

Os dados relativos à qualidade do *base calling* das *reads* foram obtidos utilizando o programa FastQC v0.11.3 (disponível em <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). As *reads* de baixa qualidade e os adaptadores foram removidas usando o programa Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) versão 0.33. Foram mantidas as *reads* com tamanho mínimo de 50 nucleotídeos e com uma qualidade de *phred* maior que 25 (1 erro a cada 500 bases), os parâmetros de *leading* e *trailing* foram ajustados em 25 e *slidingwindow* em 5:30.

5.5. Mapeamento das *reads* no genoma de referência

As *reads* filtradas de cada isolado foram alinhadas no genoma de referência de *L. infantum* JPCM5, versão 45 (TriTrypDB) utilizando o alinhador BWA-mem v.0.7.15 (LI; DURBIN, 2010). Depois disso foram filtradas por um *cut-off* mínimo de qualidade de mapeamento 30 (1 read mapeada errada a cada 1000 *reads* mapeadas) utilizando o SAMtools versão 1.3.1 (LI *et al.*, 2009). O mapeamento foi analisado utilizando o Picard tools v2.4.1 (<http://broadinstitute.github.io/picard>) para editar os arquivos BAM gerados com marcação de duplicatas, acréscimo de informações dos *read groups* e indexamento, assim como remoção das *reads* não mapeadas.

Através do *software* SAMtools flagstat foi possível checar a quantidade de *reads* utilizadas no mapeamento e a porcentagem delas que mapearam no genoma de referência.

5.6. Cálculo da variação do número de cópias cromossômicas (CCNV)

Para estimar variações no número de cópias cromossômicas de cada isolado foi utilizado o *CADin, script* em *perl* desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Coqueiro-dos-Santos em preparação). Inicialmente a qualidade do mapeamento foi filtrada (mapping quality 30) e calculada a profundidade de cobertura dos cromossomos e identificação da cobertura média de cada cromossomo dos diferentes isolados de *Leishmania* sp. e a variação do número de cópias cromossômicas existente entre eles (ROGERS *et al.*, 2011). A normalização foi realizada pela mediana da profundidade de cobertura das *reads* para um cromossomo dissômico (somia = 1.0). As representações gráficas dos resultados obtidos foram apresentados por histograma com a distribuição geral da frequência de variação do número de cópias cromossômicas dos isolados e *heatmap* gerado em R utilizando os pacotes *ggplot* e *gplots* e *RColorBrewer* respectivamente (R CORE TEAM, 2019).

5.6.1. Dendograma de clusterização

A análise de clusterização hierárquica baseada nas distâncias euclidianas da ploidia predita de cada cromossomo de todos os isolados de *Leishmania* sp. avaliados foi realizada usando os pacotes *gplots* e *RColorBrewer* da plataforma R. Dois métodos foram utilizados: *Manhattan* para cálculo das distâncias entre os isolados e *average* para estimativa de clusterização. O valor de *bootstrap* foi 1000 e os gráficos foram gerados pelo RStudio juntamente com o *heatmap*.

5.7. Análise de *single nucleotide variants* (SNVs) - PCA

Os isolados foram agrupados por região geográfica e para o cálculo da diversidade de nucleotídeos entre cada um deles foi utilizado um *pipeline* automatizado de chamada de variantes (*SNV Calling*) desenvolvido pelo Dr. Rodrigo Baptista. O pipeline utiliza como arquivo de entrada as sequências brutas obtidas no sequenciamento com formato *.fq* (FASTQ), o arquivo de extensão *.fasta* do genoma de referência e requer a seleção da ploidia do indivíduo a ser analisado (no caso diploide). São utilizados principalmente os programas

GATK (Genome Analysis Toolkit) v3.8 *HaplotypeCaller* (POPLIN *et al.*, 2017) e *Freebayes* v1.3.2 (GARRISON; MARTH, 2012).

Os resultados obtidos foram gerados no formato gvcf, que mantem a informação de todas chamadas de bases alinhadas para cada isolado. SNVs de baixa qualidade foram filtrados utilizando o programa *VariantFiltration* do GATK utilizando os filtros *phred score* (QUAL), *depth* (DP), *quality of depth* (QD) e *mapping quality* (MQ) ajustados com os seguintes parâmetros "QUAL < 30.0 || DP < 10 || QD < 1.5 || MQ < 25.0"

Os gvcfs foram então combinados em um único arquivo usando o módulo *GenotypeGVCF* disponível no pacote do GATK. Para a análise de componente principal e estimativa da distância entre os isolados baseado nos SNPs, inserções, deleções (*indels*) e heterozigotos foi gerada uma sequência consenso para cada isolado a partir do arquivo combinado gvcf utilizando um *script* em *bash*. Após o alinhamento das sequências consenso das variantes utilizando o programa *MAFFT online* v7.475 (KATOH; ROZEWICKI; YAMADA, 2019) a representação gráfica dos dados foi gerada no *Jalview* v2.11.0 (WATERHOUSE *et al.*, 2009) que calculou o componente principal a partir do alinhamento. O *software* RStudio (v1.1.453) e o pacote *plotly* foram utilizados para gerar a imagem representativa do PCA (*Principal Component Analysis*) em gráficos 2D e 3D (MCKENNA *et al.*, 2010) de acordo com a divergência genética dos isolados.

A partir dos arquivos *gvcfs* também foi calculada a frequência de variantes homo (0/0, 1/1, 2/2, 3/3, 4/4, 5/5 e 6/6) e heterozigóticas (0/1 a 0/6, 1/2 a 1/6, 2/3 a 2/6, 3/4 a 3/6, 4/5, 4/6 e 5/6) dividindo o somatório de cada uma delas pelo número absoluto do total de SNVs.

5.8. Análise de divergência genética

Para a realização da filogenia o arquivo *fasta* consenso contendo as variantes de cada região geográfica foi submetido ao *jModelTest* v2.1.7 para determinação do melhor modelo estatístico utilizado para cálculo de substituição de nucleotídeos (GUINDON; GASCUEL, 2003). Para a análise filogenética por máximo verossimilhança foi utilizado o *PhyML* v3.0, no qual foi utilizado o modelo de distribuição nucleotídica GTR+I+G (*General Time Reversible*) (*gamma shape* = 0.47 e *proportion of invariable sites* = 0.21) e 1000 replicatas de *bootstrap* (GUINDON *et al.*, 2010). Para a árvore filogenética de GV foi utilizado o modelo de distribuição nucleotídica GTR (*gamma shape* = 0.41 e *proportion of invariable sites* =

0.33) e 1000 replicatas de *bootstrap*. O genoma de *L. infantum* JPCM5 foi incluído como grupo externo para ambas as árvores. A visualização gráfica das árvores filogenéticas foi feita utilizando o *software* FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

5.9. Estimativa individual de ancestralidade

5.9.1. Análise por indivíduo

Para o cálculo de estimativa de ancestralidade foi utilizado o programa ADMIXTURE v1.3 (ALEXANDER; NOVEMBRE; LANGE, 2009). Os arquivos de entrada foram criados a partir do concatenado de *gvcfs* gerado de cada isolado incluído no trabalho (n=85) além do genoma de referência. Assim, utilizando o VCFtools v. 0.1.17 (DANECEK *et al.*, 2011) e PLINK v.1.07 (PURCELL *et al.*, 2007) foi gerado um arquivo *bed*, como arquivo de entrada para o ADMIXTURE. As análises de ancestralidade foram realizadas através do cálculo do valor de *K* variando de duas até dez populações ancestrais sendo que o valor de *CV* (*Cross validation*) *error* para cada população foi computado e plotado em uma curva no Excel. O valor mais inferior na curva representou o número de populações ancestrais provável para o grupo de indivíduos analisados.

5.9.2. Análise por cromossomo

Para estimativa de ancestralidade por cromossomo foi utilizado o VCFtools v. 0.1.17 para extração de cada cromossomo, de 1 a 36, do concatenado dos 85 isolados em extensão *gvcfs*. Os passos seguintes foram os mesmos utilizados para a análise individual descrita acima. Ainda que o valor de *CV error* tenha sido realizado para cada população (K=2 - K=10), para essa análise foi padronizado K=4 com base no resultado obtido na análise acima para o genoma completo.

5.10. Análises de ontologia gênica – GO

As análises de enriquecimento foram feitas considerando os cromossomos aumentados nos isolados avaliados – 8, 23 e 31 - e a partir de uma lista contendo os genes de interesse com o pacote *topGO* do R. As amostras foram submetidas às análises de GO a fim de acessar informações referentes à *molecular function*, *cellular component* e *biological process* contidas nos genes enriquecidos. As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Fisher ajustado utilizando o algoritmo *Elim* que testa de maneira hierárquica crescente o enriquecimento de cada categoria do GO contido em um *gene set*.

Foram considerados resultados para *adjustfisherElim* $p < 0,05$ e o suporte estatístico é calculado levando em consideração a quantidade de cópias de genes anotados esperados no cromossomo e a quantidade encontrada para os isolados avaliados. Os dados para cada cromossomo foram representados por gráficos de *pizza* gerados no *Excel* v16.49.

6. RESULTADOS

*Avaliação da ocorrência de divergências genômicas de isolados de *L. infantum* de cães naturalmente infectados e pacientes quando em espaços temporais e regiões geográficas brasileiras distintos*

6.1. Análise das *reads* e porcentagem das *reads* que mapearam no genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 v45

Um total de 85 isolados foram incluídos no estudo além do genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 v45. Todas elas apresentaram boa qualidade de sequenciamento e escore de qualidade de bases sequenciadas acima de 25, como desejado (Figura 4).

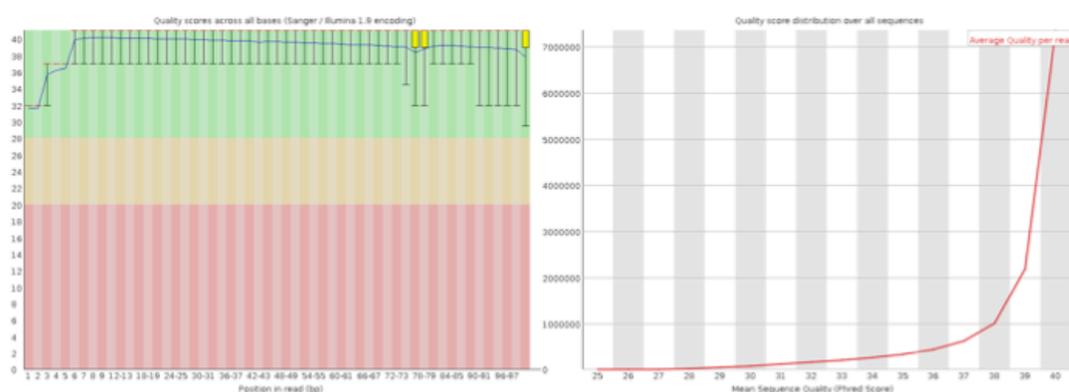


Figura 4 - Representações gráficas obtidas através do FastQC para avaliação da qualidade das *reads* sequenciadas. O gráfico à esquerda representa a qualidade de sequenciamento por bases sequenciadas; à direita está representado um escore com distribuição da qualidade das sequências geradas.

As porcentagens de mapeamento das *reads* no genoma de referência para os isolados de Governador Valadares (GV) foram acima de 87% (com exceção de 16453_7_11, 16453_7_14, 16453_7_15); para Januária, acima de 91%; para RN acima, de 89%; e para SC, acima de 94% (exceto para SC1003 e SC1005) (Tabela 3).

Tabela 3. Número de *reads* totais e mapeadas no genoma de referência para os isolados de cada região geográfica.

ID DOS ISOLADOS	TOTAL DE <i>READS</i>	TOTAL DE <i>READS</i> MAPEADAS NO GENOMA DE REFERÊNCIA (ABSOLUTO)	TOTAL DE <i>READS</i> MAPEADAS NO GENOMA DE REFERÊNCIA (%)
Bahia			
BA_Li-1055	11339893	11291332	99,57
Ba_Li-1222	16440305	16342616	99,41
BA_Li-262	15170103	15097949	99,23
Governador Valadares			
15795_5_1	11432858	11114830	97,22
15795_5_2	10445711	10055710	96,27
15795_5_3	10855698	10695983	98,53
15795_5_4	10659820	10322676	96,84
15795_5_5	10484340	10356545	96,97
15795_5_6	10448156	9846477	94,24
15795_5_7	10679798	10356545	96,97
15795_5_8	11115174	10807943	97,24
15795_5_9	9717119	9557571	98,36
15795_5_10	8288300	8036186	96,96
15795_5_11	9377854	9063855	96,65
15795_5_12	10197807	9865515	96,74
15795_5_13	10551237	10091579	95,64
15795_5_14	9794616	9335785	95,32
16453_7_1	15927742	15538611	97,56
16453_7_2	15180850	14695209	96,80
16453_7_4	12249873	11966325	97,69
16453_7_5	9922139	9708930	97,85
16453_7_7	12861463	12424786	96,60
16453_7_8	12174657	11895690	97,70
16453_7_9	116783614	16581139	98,79
16453_7_10	14941489	14718202	98,51
16453_7_11	17833078	9246469	51,85
16453_7_12	13649103	12889918	94,44
16453_7_13	15542651	15352451	98,78
16453_7_14	11304775	8373351	74,07
16453_7_15	12457376	9003459	72,27
16453_7_16	14034326	13528226	96,39
16453_7_17	13594724	12441094	91,51
16453_7_18	14616941	13796912	94,39
16453_7_19	16301187	14676125	90,03
16453_7_20	10112127	9352807	92,49
16453_7_21	13544129	12681894	93,63
16453_7_22	14184543	12354307	87,10
Januária			
J4	25727529	23847917	92,69
J5	25147672	23408002	93,08

J10	27093182	24999926	92,27
J14	22338303	21618141	96,78
J16	20327945	19875517	97,77
J27	19992063	19507593	97,58
J28	25254084	23459802	92,90
J34	19936191	19481313	97,72
J75	31971664	31320088	97,96
J76	31625431	28953411	91,55
J82	30484182	29935632	98,20
J83	31834996	31308786	98,35
J84	29908651	29433596	98,41
J88	31658422	30981182	97,86
J94	31832240	31508552	98,98
J97	32536435	32128967	98,75
J99	32601699	32233000	98,87
J101	31159056	30672400	98,44
J106	32441434	31965941	98,53
J107	31736032	29785525	93,85
Rio Grande do Norte			
RN1	59661113	56820459	95,24
RN2	59592677	54971278	92,25
RN3	62747575	58716902	93,58
RN4	66287766	62297798	93,98
RN5	70545321	65235501	92,47
RN6	51856836	49374853	95,21
RN7*	27153086	24463336	90,09
RN8	69666368	64420043	92,47
RN9	72451287	68386898	94,39
RN10	63592340	60737516	95,51
RN11	58475567	54380605	93,00
RN12	63797049	60149234	94,28
RN13	67169756	63750355	94,91
RN14	55352569	49594813	89,60
RN15	66547002	62292161	93,61
RN16	63427704	58687767	92,53
RN17	63592917	61241716	96,30
RN18	67106504	64552140	96,19
RN19	62979035	60396554	95,90
RN20	60129034	54758249	91,07
Santa Catarina			
SC1002	144446640	144378050	99,95
SC1003	154054686	95325034	61,88
SC1004	133895221	126740293	94,66
SC1005	171875991	114224488	66,46
SC1006	31023769	30580867	98,57
SC1007	47403190	46696389	98,51
SC1008	34339931	33575246	97,77
SC1009	40066312	38486664	96,06

*single-ended

Avaliação da ocorrência de variações nos genomas montados quanto ao número de cópias cromossômicas

6.2. Variação do número de cópias cromossômicas

A visualização do número de cópias cromossômicas de todos os isolados analisados neste trabalho está representada através de histograma (Figura 5), *heatmap* e por análise de clusterização hierárquica (Figura 6), que permitem uma comparação global dos dados. Essa última análise foi representada por um dendograma que agrupou os isolados de acordo com a variação no número de cópias cromossômicas (Figura 6).

Através da análise de proporção geral da ocorrência de cromossomos extranumerários de todos os isolados foi observado que no cromossomo 8 ocorre uma variação no número de cópias cromossômicas em 38,8% (33/85) dos isolados, 58,8% (50/85) no cromossomo 23, e 100% (85/85) de polissomia do cromossomo 31 como já descrito em *Leishmania* sp. (ROGERS *et al.*, 2011).

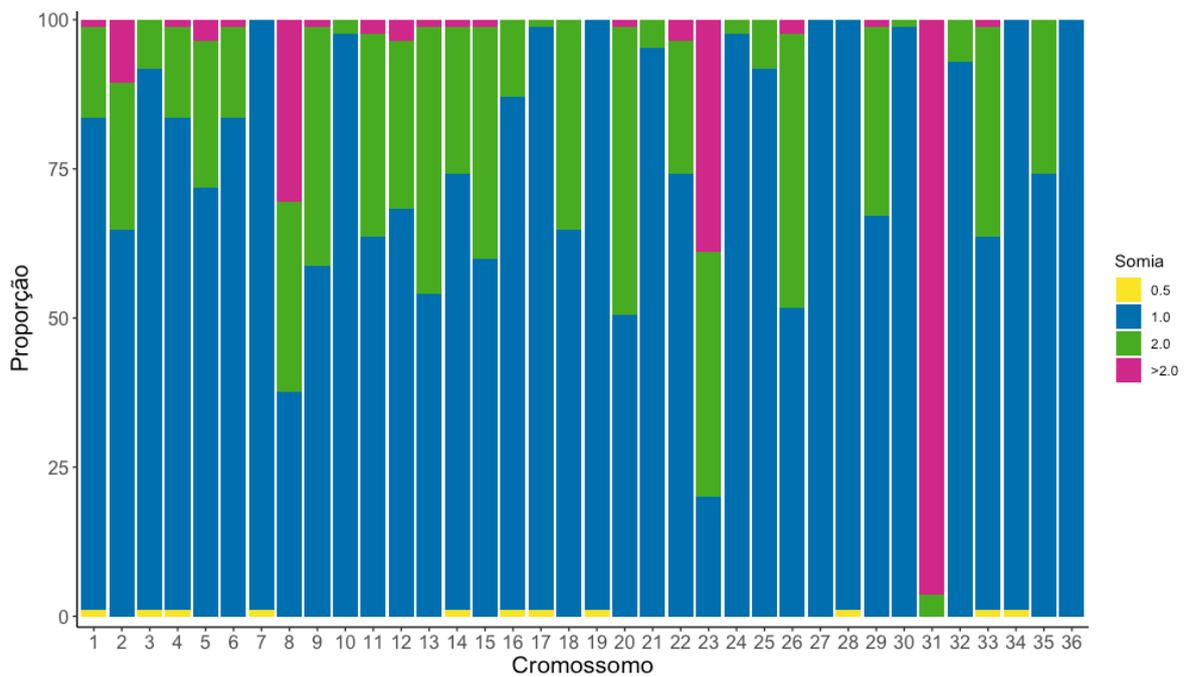


Figura 5 - Histograma de distribuição geral da frequência de variação do número de cópias cromossômicas dos isolados em relação ao genoma de referência. Nos gráficos estão representados todos os isolados (n=85) incluídos neste estudo. O eixo x corresponde aos números de cromossomos (1-36) de *Leishmania infantum* e o eixo y a proporção geral da ocorrência de cada somia nos isolados. À direita está representada a legenda com os valores de somia encontrados para cada cromossomo dos isolados. O valor 1.0 representa a mediana da profundidade de cobertura das *reads* para um cromossomo dissômico; 0.5 – cromossomos monossômicos; 2.0 – cromossomos tetrassômicos; e >2.0 cromossomos penta ou hexassômicos.

Em GV observa-se uma maior heterogeneidade do número de cópias cromossômicas entre os isolados em relação às outras regiões estudadas. Alguns isolados como GV15795_5_1, GV16453_7_2, GV16453_7_10 e GV16453_7_22 apresentam esse padrão de maneira mais nítida e de maneira geral, os cromossomos 8, 23 e 31 são aqueles com aumento de somia mais frequente para essa região. Apenas um dos 34 isolados de GV (GV16453_7_5) apresentou um padrão homogêneo de cromossomos predominantemente dissômicos.

Os isolados da Bahia, Januária e RN apresentaram-se mais homogêneos com cromossomos predominantemente dissômicos quando comparados a GV. Contudo, quando analisados de maneira isolada, percebe-se que um dos isolados da Bahia (BA-1055) possui um maior número de cópias extranumerárias e os outros dois apresentam-se mais homogêneos e preponderantemente dissômicos.

Os isolados de Januária (n=20) foram analisados de acordo com a área de origem, urbana (n=8 – J4 a J34) ou rural (n=12 – J75 a J107) e apesar de apresentarem perfil de aumento ou diminuição no número de cópias cromossômicas semelhante, percebe-se que os isolados da área urbana apresentam uma maior variação no número de cópias cromossômicas quando comparados aos isolados de área rural como também demonstrado no dendograma de clusterização hierárquica. Esses apresentam cromossomos com valores mais próximos da mediana (dissomia; CNV=1,0). Para os isolados de área urbana observa-se, em todos eles valores extranumerários para o cromossomo 23 (Figura 6-7).

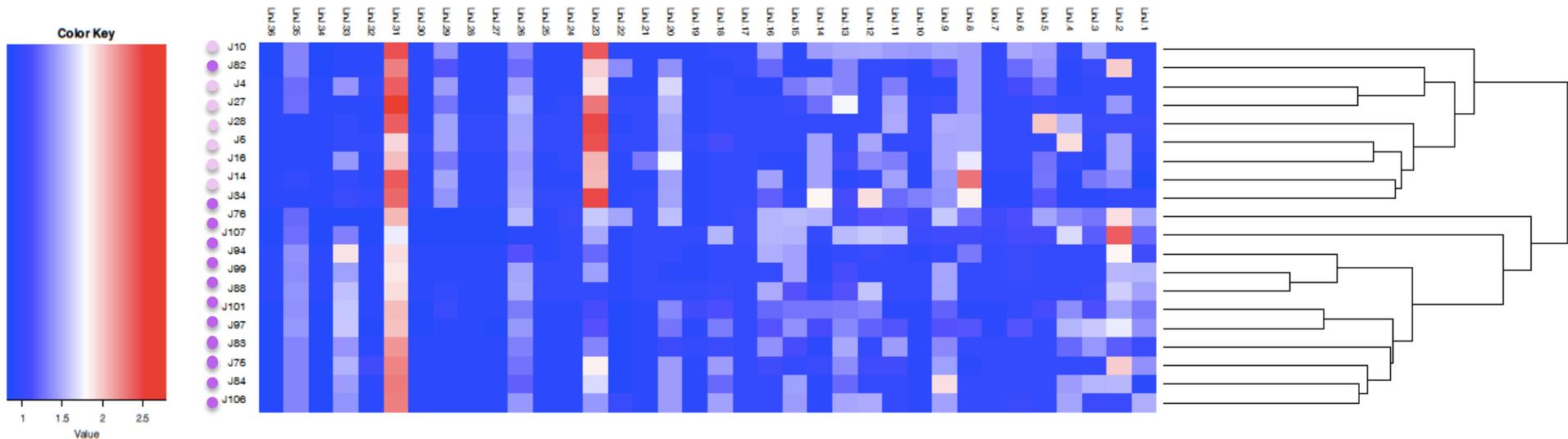


Figura 7 - Heatmap com a distribuição de CCNV e dendograma da clusterização hierárquica baseada no padrão de aneuploidias dos isolados de *L. infantum* provenientes de Januária. Todos os isolados estão representados no eixo *x* e os cromossomos de 1-36 estão representados no eixo *y*. A estimativa de variação no número de cópias cromossômicas para cada um deles está apresentada por intensidade de cor que varia de azul, menor número de cópias, a vermelho, que representa um maior número de cópias. A análise de clusterização hierárquica está representada por dendograma e foi baseada nas distâncias euclidianas da ploidia predita de cada cromossomo dos isolados de *L. infantum*. Isolados da área urbana (AU – plot rosa claro) e área rural (AR – plot lilás).

De maneira geral, as amostras de RN apresentam maior variação no número de cópias cromossômicas quando comparados aos da Bahia e área rural de Januária, mas menor do que aquelas de GV e da área urbana de Januária. Cerca de metade das amostras (9/20) apresentam padrão heterogêneo de variação no número de cópias e o restante com pouca ou nenhuma variação. Apesar de RN incluir isolados provenientes de humanos (15/20), nas análises realizadas não foi observado nenhum padrão de variação cromossômica (Figura 6) ou divergência filogenética (Figura 11) quando comparado com as amostras de cães (5/20). Nessas, ainda que o número amostral seja pequeno, em 3/5 amostras o cromossomo 23 era tetra ou maior que tetrassômico (> 2.0), sendo todas elas de animais provenientes de Natal e com coletas realizadas no baço.

As amostras RN2 e RN5 tiveram parasitos isolados a partir de coletas no mesmo indivíduo (humano) no ano de 2013 sendo a primeira através de punção de medula óssea e na última sangue total periférico. Em RN5 há maior número de cromossomos extranumerários (16/36) do que em RN2 (13/36).

Dos oito isolados de Santa Catarina, dois apresentaram um perfil mais heterogêneo com maior quantidade de cromossomos extranumerários (SC1007 e SC1009) quando comparados aos demais isolados da mesma região geográfica. Esses apresentaram-se predominantemente dissômicos. Ainda assim, SC é a região com menor variação no número de cópias cromossômicas dentre as cepas isoladas quando comparada as outras regiões geográficas analisadas.

Dessa forma, quanto à variação no número de cópias cromossômicas, em ordem crescente, os isolados com perfil mais heterogêneo e maior quantidade de cromossomos extranumerários foram aqueles de GV, seguidos da área urbana de Januária, RN, área rural de Januária, SC e Bahia, esses com perfil próximo e mais homogêneo (Figuras 6 e 7). Percebe-se que os isolados de GV e área urbana de Januária apresentam a maior variação no número de cópias cromossômicas e tendem a se agrupar e apresentar um padrão mais semelhante de expansão cromossômica entre si quando comparado com isolados de outras áreas endêmicas.

Sabe-se que o CCNV pode variar, também de acordo com o número de passagens em cultura. Apesar de não terem sido realizadas análises para averiguar essa influência, a análise dos dados gerados demonstra que independentemente da quantidade de passagens a somia dos isolados tendem a homogeneidade quando provenientes da mesma área de coleta o que possivelmente exclui a influência do cultivo sobre os valores obtidos.

Avaliação das funções enriquecidas nos cromossomos com maior variação no número de cópias cromossômicas dentre os isolados avaliados

6.3. Análises de ontologia gênica– GO

A partir das análises de CCNV foram selecionados os cromossomos 8, 23 e 31 que predominantemente apresentavam aumento do número de cópias nos isolados estudados. As análises para os três cromossomos foram realizadas em relação à classificação do *Gene Ontology* (GO) quanto *biological process* (BP), *cellular component* (CC) e *molecular function* (MF).

As tabelas contendo os *GO terms* e os genes com o respectivo GO anotados no genoma (*Annotated*), os genes com o GO correspondente encontrados no genoma (*Significant*), quantos genes com o GO esperados de existir no cromossomo avaliado (*Expected*) e o suporte estatístico considerando $p < 0,05$ (*adjustfisherElin*) para cada cromossomo estão contidos nos Anexos 1-9.

Ainda foram geradas representações gráficas da frequência relativa de genes para cada função biológica correspondente nos cromossomos - *BP*, *CC* e *MF*. No cromossomo 8 prevaleceram genes com número de cópias aumentadas relacionados a *BP* e nos cromossomos 23 e 31 foram encontrados mais frequentemente genes enriquecidos referente a funções moleculares (*MF*) (Figura 8).

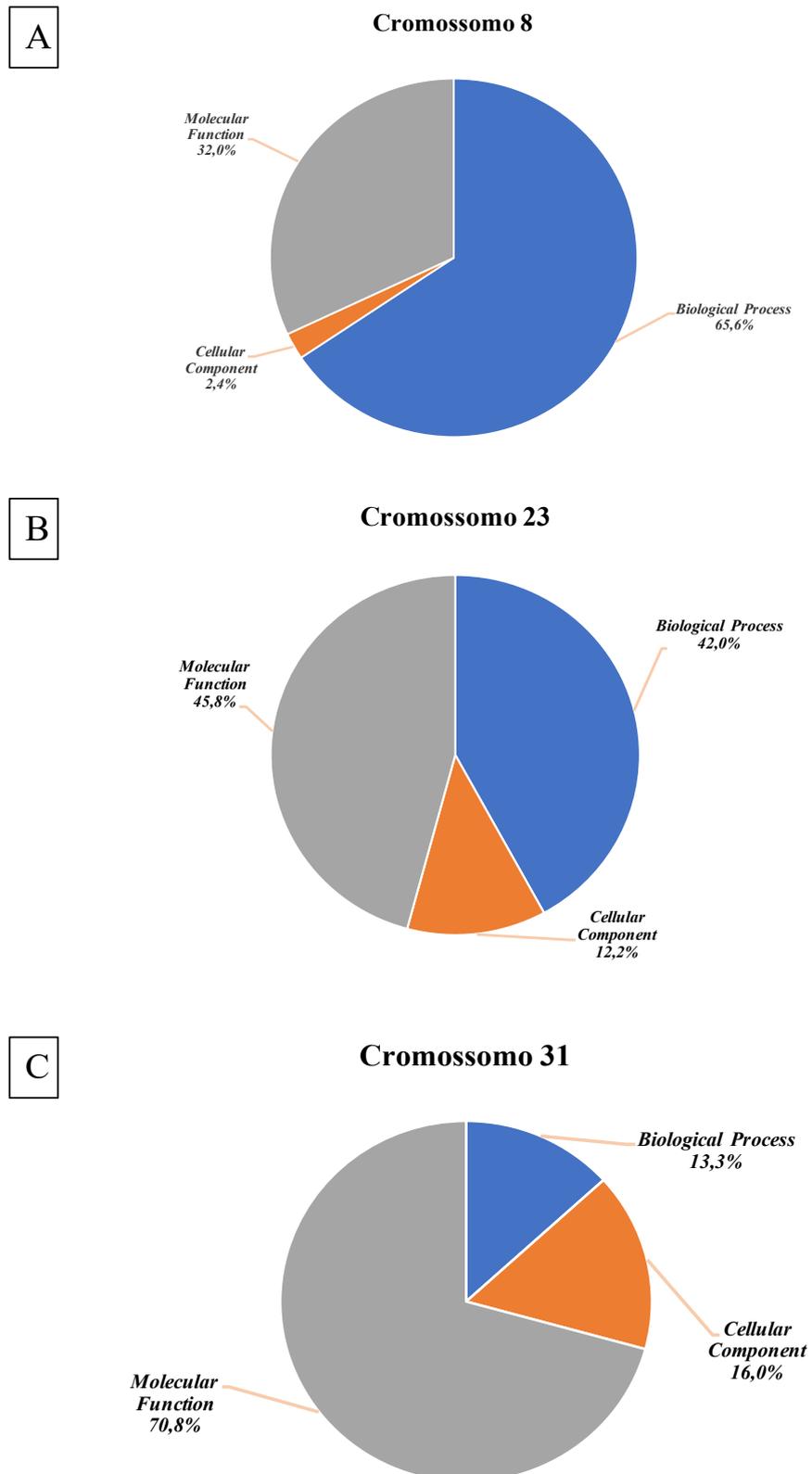


Figura 8 – Prevalência de genes anotados enriquecidos de acordo com a função hierárquica. Os gráficos de *pizza* representam a frequência relativa dos genes enriquecidos de acordo com sua categorização funcional - *BP*, *CC* ou *MF*. Cromossomo 8 – A; cromossomo 23 – B; cromossomo 31 – C.

Quando avaliados genes com funções relacionadas a *BP*, a análise de GO demonstrou que no cromossomo 8 ocorre, predominantemente, aumento do número de cópias (enriquecimento) de genes envolvidos em processos metabólicos como dos compostos organonitrogenados, proteínas e espécies reativas de oxigênio (Figura 9A). Para o cromossomo 23, prevalecem processos biológicos relacionados ao transporte transmembrana como aquele de íons (Figura 9B). No cromossomo 31, também se encontram enriquecidos genes relacionados ao transporte de substâncias, assim como alguns relacionados a processos metabólicos de lipídios e de DNA (Figura 9C).

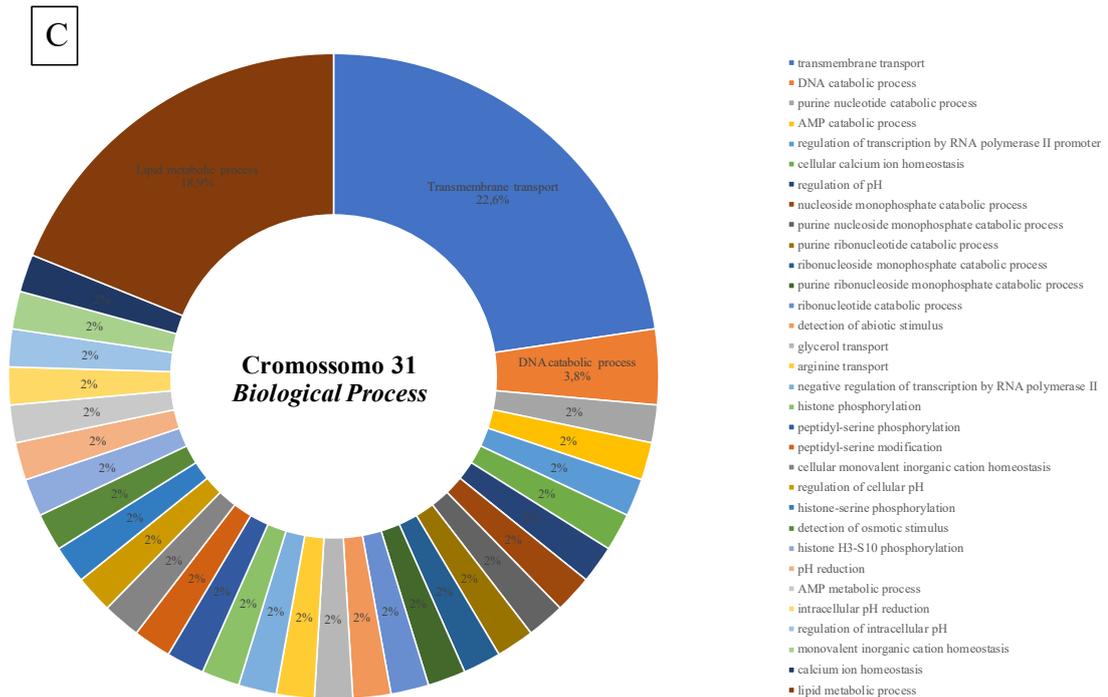


Figura 9 – Análise de enriquecimento gênico quanto a *Biological Process* (BP). Os gráficos de *pizza* representam a categorização funcional dos genes enriquecidos quanto aos processos biológicos para cada cromossomo. Os valores percentuais representam a frequência de genes enriquecidos para a função avaliada. Cromossomo 8 – A; cromossomo 23 – B; cromossomo 31 – C.

A categorização funcional quanto a *CC* demonstra que o cromossomo 8 apresenta genes enriquecidos relacionados a mecanismos de excitose, fluxo de proteínas no citoplasma e processos translacionais (Figura 10A). O cromossomo 23 apresenta genes com cópias aumentadas relacionados principalmente ao funcionamento de transportadores de prótons (Figura 10B) e no cromossomo 31, componentes de membrana (Figura 10C).

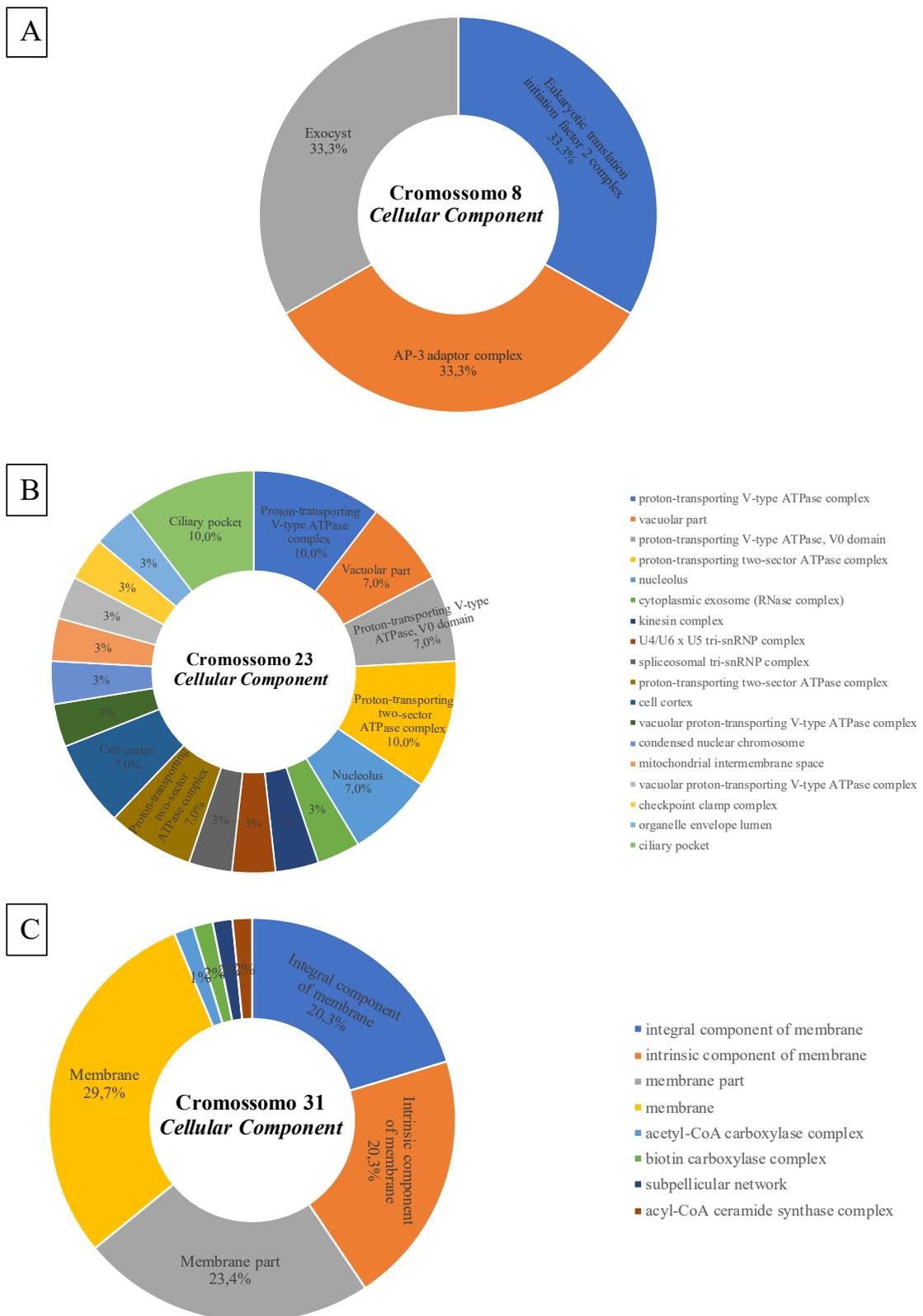


Figura 10 – Análise de enriquecimento gênico quanto a *Cellular Component* (CC). Os gráficos de *pizza* representam a categorização funcional dos genes enriquecidos quanto aos componentes celulares para cada cromossomo. Os valores percentuais representam a frequência de genes enriquecidos para a função avaliada. Cromossomo 8 – A; cromossomo 23 – B; cromossomo 31 – C.

Adicionalmente foram avaliados os genes enriquecidos relacionados à *MF* e no cromossomo 8 predominaram atividades catalíticas e de peptidases (Figura 11A). Para o cromossomo 23 genes com número de cópias possivelmente aumentadas eram aqueles relacionados a atividade de enzimas como ATPases e oxirredutases e de transportadores transmembrana (Figura 11B). Finalmente, no cromossomo 31 ocorrem genes enriquecidos relacionados a funções enzimáticas como das hidrolases e a atividades catalíticas (Figura 12B).

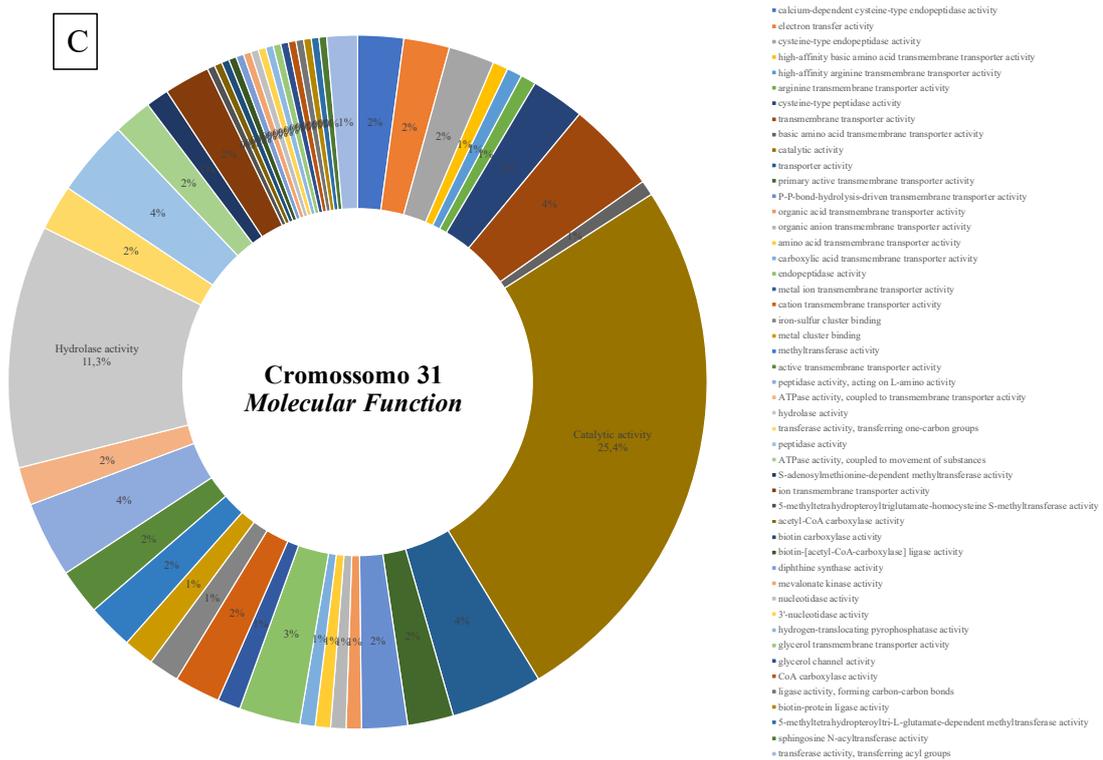


Figura 11– Análise de enriquecimento gênico quanto a *Molecular Function* (MF). Os gráficos de *pizza* representam a categorização funcional dos genes enriquecidos quanto às funções moleculares para cada cromossomo. Os valores percentuais representam a frequência de genes enriquecidos para a função avaliada. Cromossomo 8 – A; cromossomo 23 – B; cromossomo 31 – C.

Avaliação da ocorrência de divergências intra e interpopulacionais ou agrupamentos populacionais entre os isolados de acordo com sua origem geográfica e/ou data de coleta

6.4. Divergência genética dos isolados através da análise de variantes

6.4.1. Quantificação e análise do número de variantes

Quanto ao número total de variantes, os isolados de SC foram aqueles com maior número médio (8822), seguidos pelas amostras provenientes de GV com uma média de 6669 mutações pontuais considerando a totalidade de seus genomas, Januária com 5861, Bahia com 5504 SNPs, e RN com 5399 (Tabela 4).

Os isolados da Bahia apresentaram o maior número de *indels*, 1950, seguido por aqueles de GV, 1694, Januária, 1381, RN, 1206 e SC com 1058. De maneira geral, os isolados de GV coletados em 2008 e 2012 possuem mais *indels* quando comparados àqueles com coleta no ano de 2015.

Quando analisados o número relativo do total de variantes – SNPs e *indels* – observa-se que nos isolados de todas as áreas geográficas estudadas ocorre uma maior frequência de SNPs (de 73,9% nos isolados da Bahia a 89,3% nos isolados de SC) em relação à proporção de *indels* (10,7% em SC a 26,1% na Bahia).

A frequência de homo e heterozigotos está bem distribuída para os isolados da Bahia com cerca de 50% de cada um para todos os isolados (Tabela 4). Em GV e SC existe uma frequência maior de heterozigotos (média de 65,8% e 77,4%, respectivamente), enquanto nos indivíduos de RN e Januária ocorre um maior número de isolados com predomínio de variáveis homozigóticas (média de 61,2% e 52,9%, respectivamente). Para Januária ocorre uma tendência a heterozigosidade discretamente maior para os isolados da área rural.

Em dois indivíduos de Januária (J76 e J107), todos isolados da área rural, ocorre uma maior frequência de alelos homozigotos quando comparado à média geral observada nessa área geográfica (75,8% e 72,7%, respectivamente). Em 1/20 dos isolados predominam alelos heterozigóticos, diferente dos valores observados para as demais amostras dessa área geográfica (63,3%). Quanto ao tipo de hospedeiro não foi observada nenhuma particularidade entre cães e humanos provenientes de RN e SC na análise de variantes.

Tabela 4. Número de variantes totais (SNPs, *indels* e heterozigotos) mapeadas no genoma de referência para os isolados de cada região geográfica.

ID DOS ISOLADOS	Σ HOMOZIGOTOS	% HOMOZIGOTOS	Σ HETEROZIGOTOS	% HETEROZIGOTOS	Σ SNPs	Σ VARIANTES			
						INDELS	NÚMERO ABSOLUTO	%SNPs	%INDELS
Bahia									
BA_Li-1055	2732	51.15	2609	48.85	5341	2211	7552	70.72	29.28
Ba_Li-1222	2792	49.10	2894	50.90	5686	1718	7404	76.80	23.20
BA_Li-262	2730	49.77	2755	50.23	5485	1921	7406	74.06	25.94
Governador Valadares									
15795_5_1	2169	33.94	4221	66.06	6390	1936	8326	76.75	23.25
15795_5_2	2190	35.88	3914	64.12	6104	2043	8147	74.92	25.08
15795_5_3	2135	33.79	4183	66.21	6318	1981	8299	76.13	23.87
15795_5_4	2190	35.21	4030	64.79	6220	1973	8193	75.92	24.08
15795_5_5	2118	33.82	4144	66.18	6262	2007	8269	75.73	24.27
15795_5_6	2177	34.63	4109	65.37	6286	2000	8286	75.86	24.14
15795_5_7	2224	35.13	4106	64.87	6330	1950	8280	76.45	23.55
15795_5_8	2246	34.98	4175	65.02	6421	1953	8374	76.68	23.32
15795_5_9	2148	34.04	4163	65.96	6311	2072	8383	75.28	24.72
15795_5_10	2232	37.24	3761	62.76	5993	2216	8209	73.01	26.99
15795_5_11	2259	36.63	3908	63.37	6167	2067	8234	74.90	25.10
15795_5_12	2168	34.35	4144	65.65	6312	2084	8396	75.18	24.82
15795_5_13	2245	34.71	4222	65.29	6467	1956	8423	76.78	23.22
15795_5_14	2134	34.82	3995	65.18	6129	2086	8215	74.61	25.39

ID DOS ISOLADOS	Σ HOMOZIGOTOS	% HOMOZIGOTOS	Σ HETEROZIGOTOS	% HETEROZIGOTOS	Σ SNPs	Σ VARIANTES			
						INDELS	NÚMERO ABSOLUTO	%SNPs	%INDELS
Governador Valadares - Continuação									
16453_7_1	2176	29.75	5138	70.25	7314	1364	8678	84.28	15.72
16453_7_2	2247	31.99	4778	68.01	7025	1378	8403	83.60	16.40
16453_7_4	2437	35.29	4469	64.71	6906	1481	8387	82.34	17.66
16453_7_5	2386	35.33	4367	64.67	6753	1528	8281	81.55	18.45
16453_7_7	2403	34.67	4528	65.33	6931	1428	8359	82.92	17.08
16453_7_8	2434	34.86	4549	65.14	6983	1496	8479	82.36	17.64
16453_7_9	2391	32.88	4881	67.12	7272	1277	8549	85.06	14.94
16453_7_10	2411	33.49	4788	66.51	7199	1349	8548	84.22	15.78
16453_7_11	2271	33.86	4436	66.14	6707	1617	8324	80.57	19.43
16453_7_12	2380	34.26	4566	65.74	6946	1413	8359	83.10	16.90
16453_7_13	2368	33.76	4646	66.24	7014	1409	8423	83.27	16.73
16453_7_14	2196	33.51	4357	66.49	6553	1657	8210	79.82	20.18
16453_7_15	2378	35.98	4231	64.02	6609	1613	8222	80.38	19.62
16453_7_16	2330	33.53	4618	66.47	6948	1409	8357	83.14	16.86
16453_7_17	2346	33.54	4649	66.46	6995	1389	8384	83.43	16.57
16453_7_18	2358	33.78	4622	66.22	6980	1437	8417	82.93	17.07
16453_7_19	2358	33.52	4677	66.48	7035	1388	8423	83.52	16.48
16453_7_20	2392	35.99	4254	64.01	6646	1647	8293	80.14	19.86
16453_7_21	2354	32.96	4789	67.04	7143	1474	8617	82.89	17.11
16453_7_22	2166	30.58	4918	69.42	7084	1516	8600	82.37	17.63
Januária									
J4	3382	56.79	2573	43.21	5955	1434	7389	80.59	19.41
J5	3356	59.56	2279	40.44	5635	1516	7151	78.80	21.20
J10	3417	55.60	2729	44.40	6146	1386	7532	81.60	18.40
J14	3370	57.55	2486	42.45	5856	1522	7378	79.37	20.63
J16	3364	57.62	2474	42.38	5838	1427	7265	80.36	19.64
J27	3397	57.28	2533	42.72	5930	1452	7382	80.33	19.67
J28	3379	57.67	2480	42.33	5859	1429	7288	80.39	19.61
J34	3449	58.59	2438	41.41	5887	1352	7239	81.32	18.68
J75	2796	47.47	3094	52.53	5890	1317	7207	81.73	18.27
J76	3727	75.78	1191	24.22	4918	1577	6495	75.72	24.28
J82	2792	47.16	3128	52.84	5920	1351	7271	81.42	18.58
J83	2777	46.45	3201	53.55	5978	1341	7319	81.68	18.32
J84	2237	35.91	3993	64.09	6230	1286	7516	82.89	17.11
J88	2612	43.53	3389	56.47	6001	1267	7268	82.57	17.43
J94	2866	48.88	2997	51.12	5863	1309	7172	81.75	18.25
J97	2367	36.70	4082	63.30	6449	1177	7626	84.57	15.43
J99	2768	46.77	3150	53.23	5918	1300	7218	81.99	18.01
J101	2837	47.02	3196	52.98	6033	1327	7360	81.97	18.03
J106	2894	48.17	3114	51.83	6008	1308	7316	82.12	17.88
J107	3562	72.74	1335	27.26	4897	1542	6439	76.05	23.95

ID DOS ISOLADOS	Σ HOMOZIGOTOS	% HOMOZIGOTOS	Σ HETEROZIGOTOS	% HETEROZIGOTOS	Σ SNPs	Σ VARIANTES			
						INDELS	NÚMERO ABSOLUTO	%SNPs	%INDELS
Rio Grande do Norte									
RN1	3331	60.70	2157	39.30	5488	1087	6575	83.47	16.53
RN2	3293	59.80	2214	40.20	5507	1076	6583	83.65	16.35
RN3	3316	60.47	2168	39.53	5484	1098	6582	83.32	16.68
RN4	3359	61.01	2147	38.99	5506	1087	6593	83.51	16.49
RN5	3294	59.31	2260	40.69	5554	1085	6639	83.66	16.34
RN6	3311	60.51	2161	39.49	5472	1070	6542	83.64	16.36
RN7*	2854	74.95	954	25.05	3808	3473	7281	52.30	47.70
RN8	3278	59.17	2262	40.83	5540	1068	6608	83.84	16.16
RN9	3407	61.69	2116	38.31	5523	1029	6552	84.29	15.71
RN10	3337	60.97	2136	39.03	5473	1086	6559	83.44	16.56
RN11	3367	61.34	2122	38.66	5489	1084	6573	83.51	16.49
RN12	3392	62.31	2052	37.69	5444	1107	6551	83.10	16.90
RN13	3234	59.67	2186	40.33	5420	1099	6519	83.14	16.86
RN14	3348	61.73	2076	38.27	5424	1114	6538	82.96	17.04
RN15	3287	59.62	2226	40.38	5513	1040	6553	84.13	15.87
RN16	3256	59.52	2214	40.48	5470	1093	6563	83.35	16.65
RN17	3202	60.22	2115	39.78	5317	1182	6499	81.81	18.19
RN18	3342	60.01	2227	39.99	5569	1097	6666	83.54	16.46
RN19	3258	59.46	2221	40.54	5479	1059	6538	83.80	16.20
RN20	3364	61.07	2144	38.93	5508	1084	6592	83.56	16.44
Santa Catarina									
SC1002	2012	21.91	7169	78.09	9181	870	10051	91.34	8.66
SC1003	2038	22.42	7052	77.58	9090	1067	10157	89.49	10.51
SC1004	2039	22.68	6952	77.32	8991	899	9890	90.91	9.09
SC1005	2032	22.24	7106	77.76	9138	957	10095	90.52	9.48
SC1006	1970	22.59	6750	77.41	8720	1199	9919	87.91	12.09
SC1007	1969	22.70	6706	77.30	8675	1070	9745	89.02	10.98
SC1008	1938	22.91	6523	77.09	8461	1223	9684	87.37	12.63
SC1009	1960	23.56	6360	76.44	8320	1179	9499	87.59	12.41

6.4.2. Análise de componente principal

A análise de componente principal (PCA) de todos os SNPs, *indels* e heterozigotos presentes nas amostras analisadas demonstra, de maneira geral, um agrupamento espacial e temporal das amostras estudadas (Figuras 12 e 13).

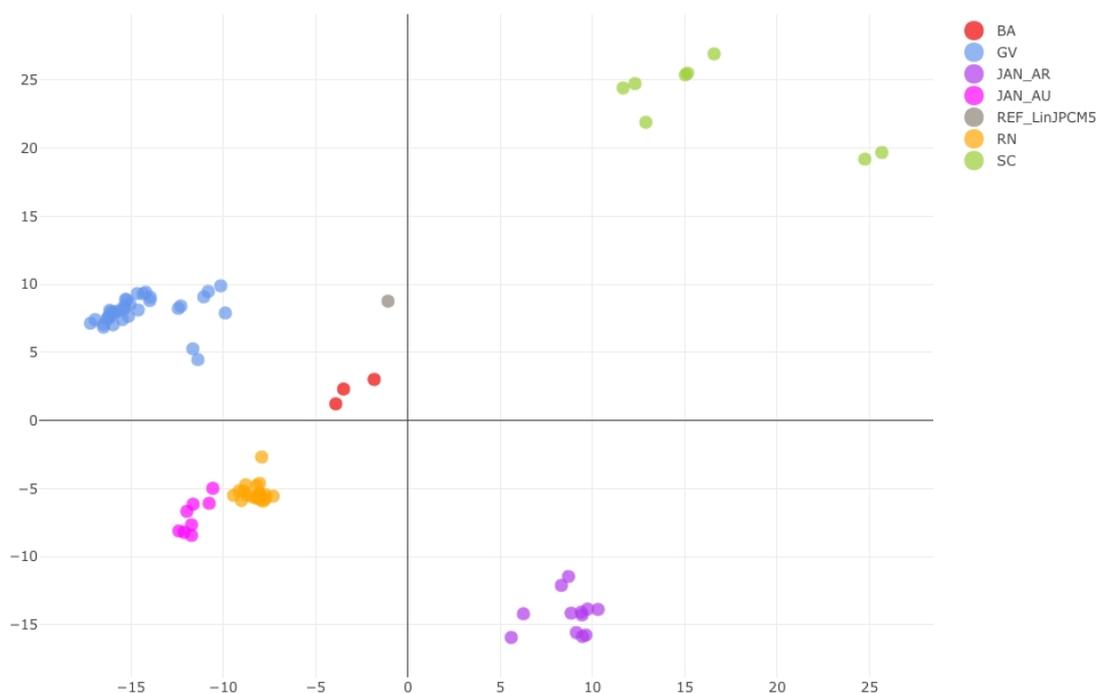


Figura 12 – Divergência dos isolados quanto a diferença de nucleotídeos incluindo todas as regiões geográficas estudadas – representação em gráfico 2D. Cada ponto corresponde a um isolado colorido de acordo com sua origem geográfica como demonstrado na legenda à direita. Os eixos x e y representam a distância genética entre os isolados. O ponto em cinza corresponde ao genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 (REF_LinJPCM5), proveniente de Madrid, Espanha. BA- Bahia; GV – Governador Valadares; JAN_AR – Januária área rural; JAN_AU – Januária área urbana; RN – Rio Grande do Norte; SC – Santa Catarina.

Os isolados da Bahia, Governador Valadares, Januária e RN encontram-se em quadrantes mais próximos àquele do genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 quando comparados àqueles de SC (Figuras 12 e 13). Entretanto existem algumas peculiaridades quando os isolados são avaliados de acordo com a região geográfica a que pertencem.

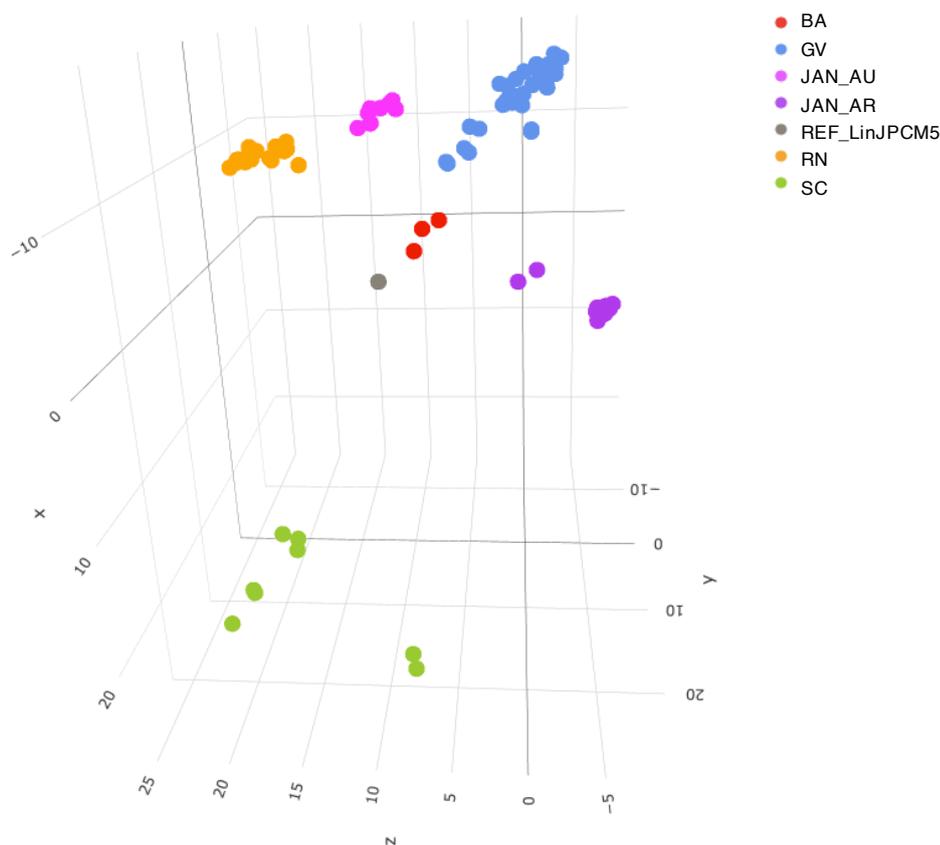


Figura 13 – Divergência dos isolados quanto a diferença de SNVs incluindo todas as regiões geográficas estudadas – representação em gráfico 3D. Cada ponto corresponde a um isolado colorido de acordo com sua origem geográfica como demonstrado na legenda à direita. Os eixos x e y representam a distância genética entre os isolados. O ponto em cinza corresponde ao genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 (REF_LinJPCM5), proveniente de Madrid, Espanha. BA- Bahia; GV – Governador Valadares; JAN_AR – Januária área rural; JAN_AU – Januária área urbana; RN – Rio Grande do Norte; SC – Santa Catarina.

Os isolados da Bahia e RN são aqueles com menor divergência intrapopulacional, uma vez que os isolados provenientes da mesma região geográfica se apresentam mais próximos entre si no gráfico (Figura 13) evidenciados por um agrupamento de *plots* de mesma coloração quando analisados de acordo com a região geográfica de origem. As amostras oriundas de SC agrupam-se no mesmo quadrante do gráfico, mas distanciadas entre si e dos isolados provenientes das outras áreas estudadas o que evidencia uma maior variação intra e interpopulacional. Ainda dois dos isolados (SC1008 – cão/2010 e SC1009 – humano/2017) apresentam-se mais divergentes dos demais da mesma área demonstrado por uma maior variação intrapopulacional dessas amostras.

Assim como para SC as amostras de GV e Januária também apresentam uma demarcada variação intrapopulacional entre seus isolados quando comparado às demais regiões geográficas avaliadas. Dessa forma, para os isolados de GV observa-se um agrupamento temporal evidenciado pela presença de dois *clusters* bastante distintos que se agrupam de acordo com o ano de coleta, o primeiro com datas de 2008 e 2012 e o segundo, no período de 2015 demonstrando uma variação intrapopulacional quando analisados em diferentes períodos temporais. Esses dados foram previamente confirmados em análises realizadas pelo nosso grupo de pesquisa (Valdivia *et al.*, em preparação) (Figura 14). Vale lembrar que não foi observada separação entre os isolados de 2008 e 2012.

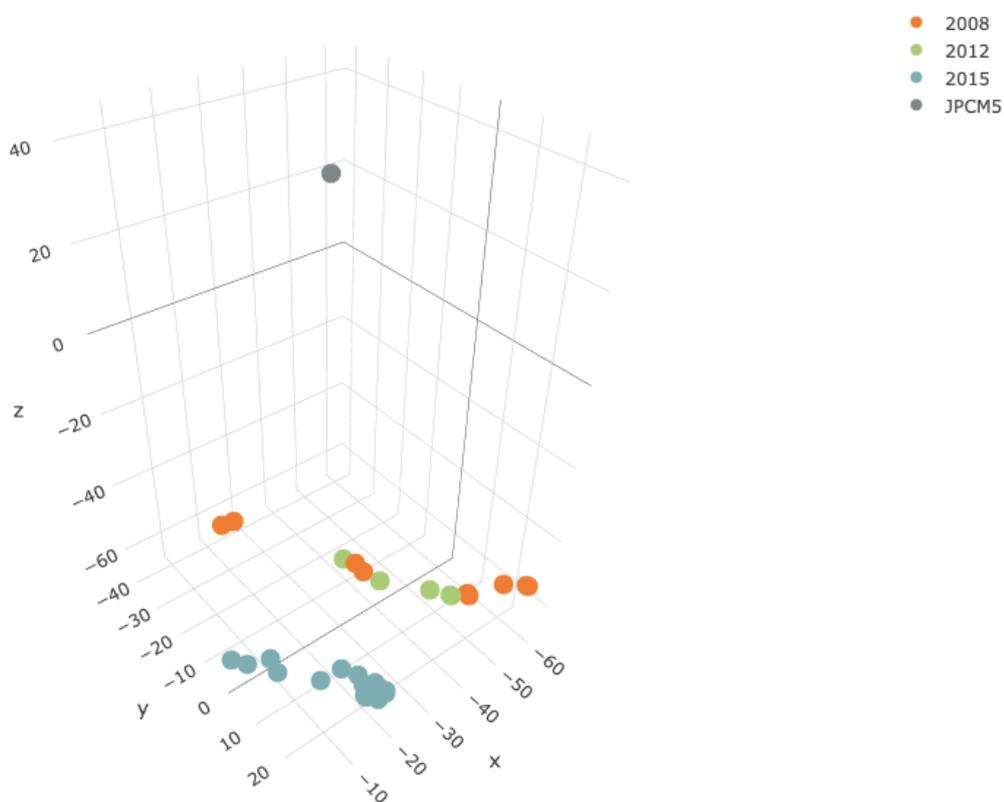


Figura 14 – Divergência temporal dos isolados de GV quanto a diferença de SNVs. Cada ponto corresponde a um isolado de Governador Valadares colorido de acordo com o ano de coleta como demonstrado na legenda à direita. Os eixos *x* e *y* representam a distância genética entre os isolados. O ponto em cinza corresponde ao genoma de referência de *L. infantum* JPCM5, proveniente de Madrid, Espanha.

Os isolados de Januária apresentam nítidas variações inter e intrapopulacionais, essa última evidenciada pela ocorrência de um agrupamento regional por área e ano de coleta, urbana (AU – 2017) ou rural (AR – 2019) como demonstrado no PCA individual gerado para essa região geográfica (Figura 15).

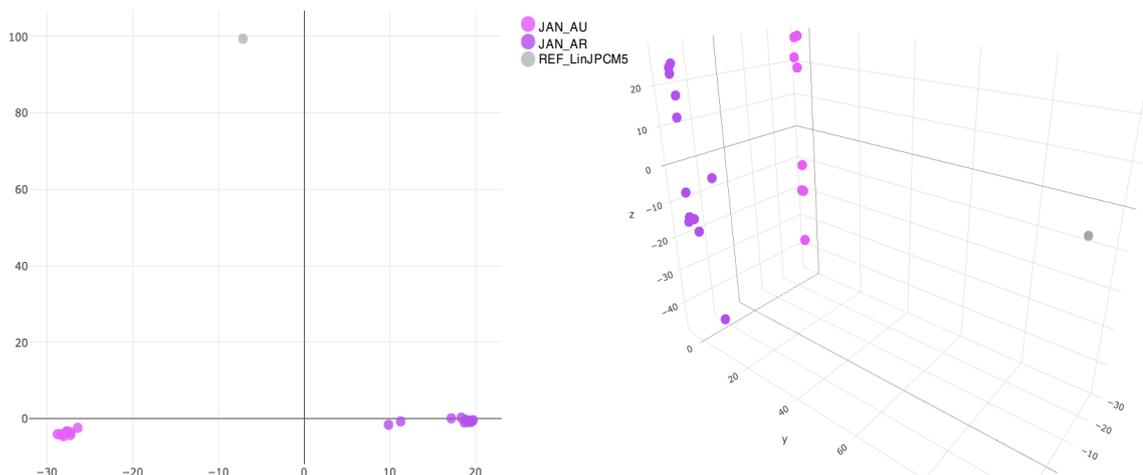


Figura 15 – Divergência dos isolados de Januária quanto a diferença de SNVs e área de coleta. Cada ponto corresponde a um isolado de Januária colorido de acordo com a área de coleta – urbana (JAN_AU) ou rural (JAN_AR) – como demonstrado na legenda ao centro. Os eixos x e y representam a distância genética entre os isolados. O ponto em cinza corresponde ao genoma de referência de *L. infantum* JPCM5, proveniente de Madrid, Espanha (REF_LinJPCM5).

6.5. Análise de divergência genética

Pelo cladograma representativo de cada região geográfica representado na Figura 16 foi possível observar resultados concordantes quando comparados à análise de SNVs pelo PCA.

Os valores de *bootstrap resampling confidence* foram próximos de 1000 replicatas, o que demonstra a confiabilidade dos clados formados. De maneira geral, para todas as regiões foi observado o agrupamento em clados por área endêmica com evidente variação interpopulacional. Observaram-se *clusters* bem delimitados para as subpopulações de *L. infantum* observadas para as amostras coletadas na Bahia (clados destacados em tons de vermelho), GV (clados destacados em tons de azul), Januária (clados destacados em tons de rosa), RN (clados destacados em tons de laranja) e SC (clados destacados em tons de verde).

Os isolados da Bahia e SC apresentaram menor divergência intrapopulacional quando comparado aos demais isolados representado por agrupamento dos isolados de cada região em

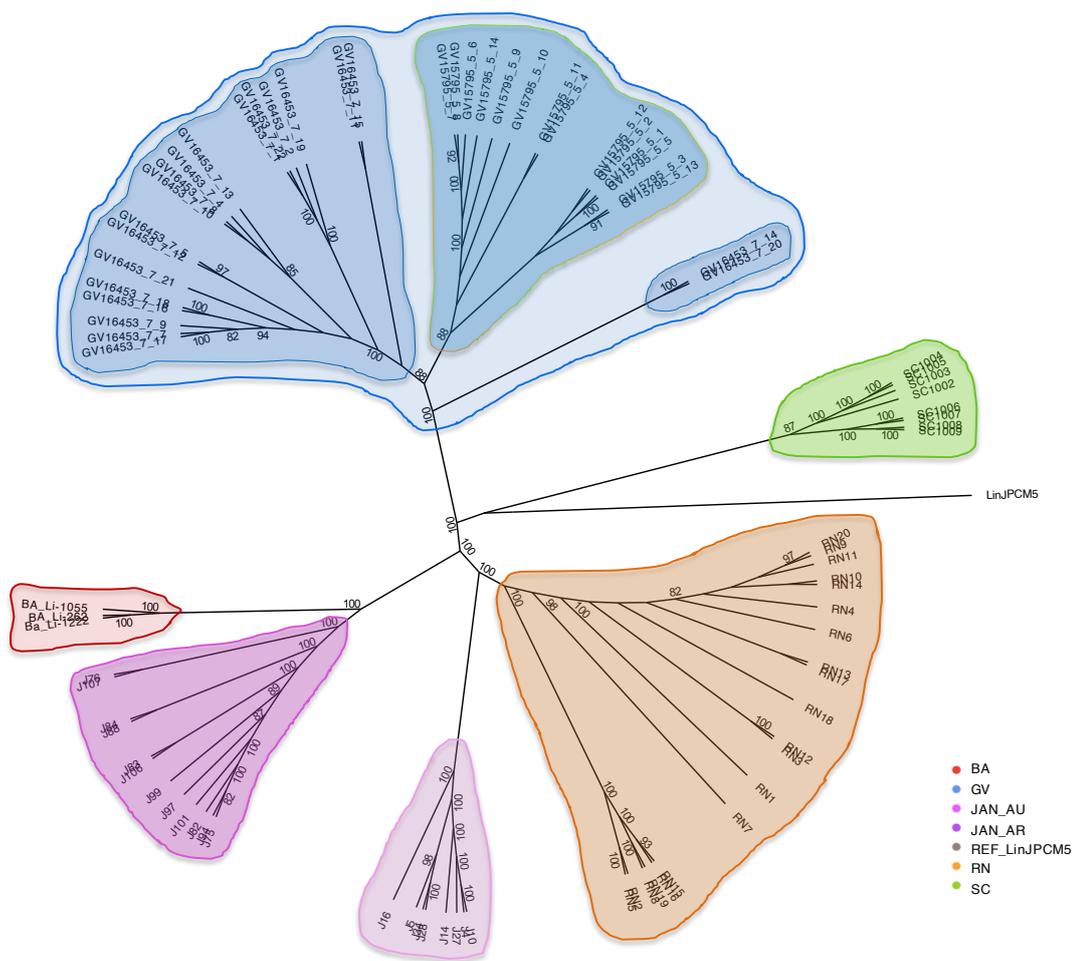
um mesmo ramo da árvore e clados bem agrupados. Diferentemente do PCA que evidenciou uma maior diversidade intrapopulacional para os isolados de SC. Ainda, no mesmo clado das amostras de SC, observou-se uma ramificação sugerindo uma menor divergência em relação ao genoma de referência LinJPCM5 (cão de origem europeia).

Ainda, para SC, apesar dos isolados SC1008 e SC1009 oriundos de um cão e um humano respectivamente, agruparem-se em um mesmo clado, observa-se uma grande similaridade filogenética com os demais indivíduos da mesma região geográfica, sobretudo com SC1006 e SC1007.

A região de RN (clados destacados em laranja) apresentou variação intrapopulacional intermediária representado pela presença de dois ramos filogenéticos, sendo o menor deles formado por seis isolados oriundos de humanos com amostras biológicas obtidas de medula óssea. O segundo clado reuniu isolados de cães e humanos de diferentes cidades e amostras biológicas distintos.

Os isolados de Januária separaram-se em dois ramos filogenéticos distintos representados por isolados coletados em área urbana no ano de 2017 (rosa claro - AU) e área rural no ano de 2019 (rosa escuro - AR) e evidenciando uma acentuada divergência filogenética para esses dois grupos. Ainda, percebe-se que o grupo AU possui proximidade filogenética com os isolados de RN, enquanto o grupo AR localiza-se em um ramo próximo dos isolados da Bahia.

Os isolados de GV agrupam-se em um grande clado que se ramifica e reúne filogeneticamente amostras por ano de coleta bem evidenciado na análise filogenética individual para a região geográfica de GV (Figura 17). Amostras coletadas nos anos de 2008 e 2012 formam um clado separado daquele representado pelas amostras do ano de 2015, indicando uma divergência temporal dos isolados nesta área. Os valores de *bootstrap* obtidos reforçam a confiabilidade da análise.



2.0

Figura 16 - Árvore de divergência genética dos isolados mapeados no genoma de referência. A análise filogenética reúne as cinco regiões geográficas estudadas, sendo que as amostras de Januária foram representadas por cores diferentes de acordo com a área/ano de coleta (JAN_AU 2017: amostras de Januária de área urbana e JAN_AR 2019: amostras de Januária de área rural). As regiões geográficas também foram agrupadas por cores: laranja – Rio Grande do Norte; rosa – Januária; vermelho – Bahia; azul - Governador Valadares; verde – Santa Catarina; e cinza - genoma de referência de *L. infantum* JPMC5. A análise foi realizada com base no alinhamento dos sítios polimórficos para o genoma de cada isolado e foi utilizado o modelo GTR+I+G e a divergência estatística utilizada corresponde a 1000 replicatas.

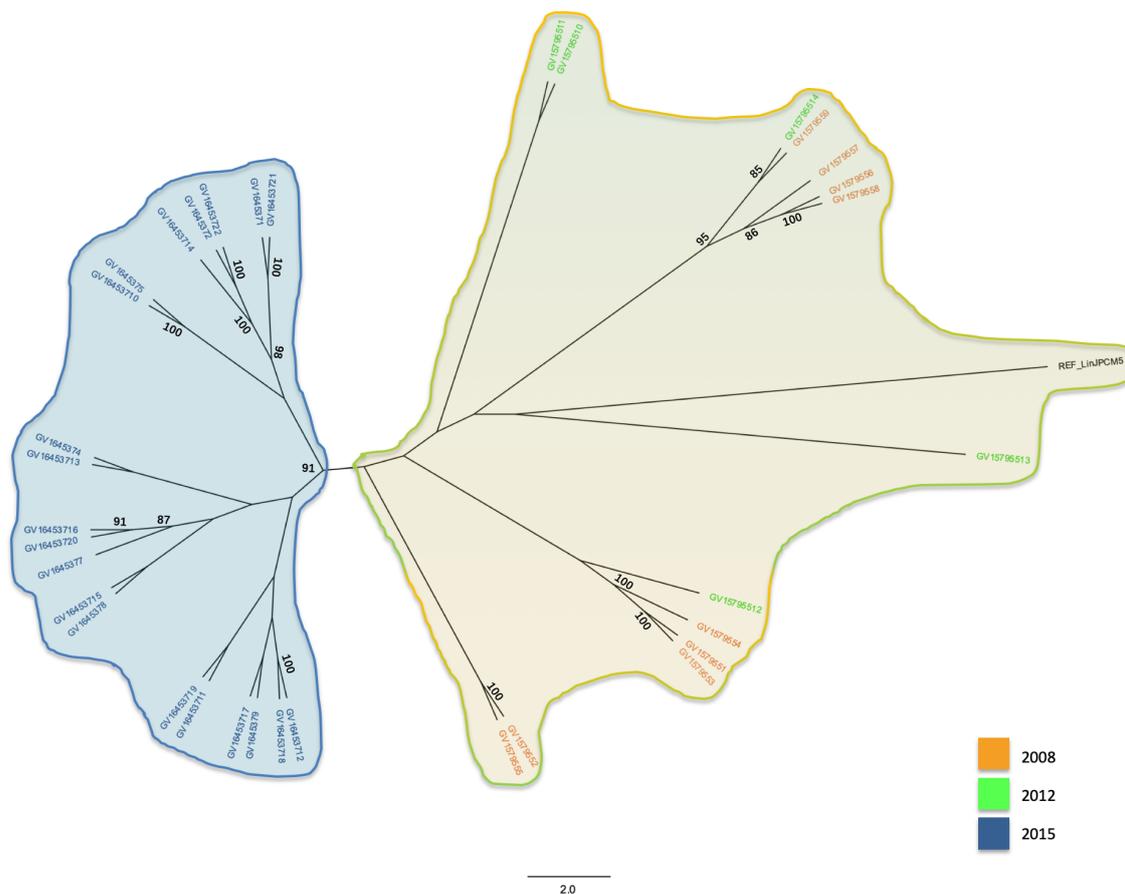


Figura 17 - Árvore de divergência genética dos isolados de GV mapeados no genoma de referência. A análise filogenética reúne os isolados de GV agrupados por ano de coleta: laranja – 2008; verde – 2012 e azul – 2015. O genoma de referência de *L. infantum* JPMC5 está representado pelo código REF_LinJPCM5. A análise foi realizada com base no alinhamento dos sítios polimórficos para o genoma de cada isolado e foi utilizado o modelo GTR e a divergência estatística utilizada corresponde a 1000 replicatas.

*Estimativa do número e frequência de populações ancestrais de *L. infantum* presentes nos genomas avaliados e a nível cromossômico*

6.6. Estimativa individual de ancestralidade

6.6.1. Por indivíduo

As análises de recombinação genômica realizadas sugerem que dentre todos os isolados, possivelmente ocorrem quatro populações ancestrais distintas de *L. infantum*, influenciadas por interferências temporais e espaciais (Figura 18).

Em SC, ocorre predominantemente a população 1 (P1); no Rio Grande do Norte P2; na Bahia uma população heterogênea composta por P1 e P4; em Governador Valadares e Januária todos as populações ancestrais são observadas, com predomínio da P3, na primeira e P4, na segunda área endêmica.

Em 6/20 dos isolados de RN, todos de humanos, está presente uma frequência de, aproximadamente, 31-34% da população P4, a mesma que ocorre em Januária, além da P2 (66-69%). Em todos os isolados de cães (5/20) ocorre apenas a P2; quanto aos isolados RN2 (medula óssea) e RN5 (sangue periférico), oriundos do mesmo indivíduo, observa-se um perfil bastante semelhante de frequência de populações composta por P2 e P4 salvo pelo fato de que em RN5 ocorre, aproximadamente 0,5% de uma terceira população P3, também encontrada nos isolados de GV (Figura 18).

Em Januária foram avaliadas duas regiões geográficas distintas com amostras coletadas em anos diferentes, área urbana (n=8 /2017) e área rural (n=12 / 2019). A área urbana é caracterizada pela presença predominante da P4 com a ocorrência sutil de P2 em alguns isolados 3/8. Na área rural os indícios de recombinação são mais frequentes com a ocorrência de duas ou mais populações em 11/12 dos isolados. Na maioria deles, P2 está presente em uma frequência de, aproximadamente 20-27%; enquanto que no isolado J88 ocorre uma terceira população ancestral P3, a mesma presente em GV, numa taxa de 23%; ainda, no isolado J84 estão presentes quatro populações distintas, P4 numa frequência de aproximadamente 59%, P1 25%, P3 14% e P2 2%.

Para todos os isolados da Bahia (n=3) foram observados indícios de recombinação evidenciada pela presença de duas populações ancestrais distintas, P1 e P4 numa frequência de, aproximadamente 32-37% e 63-68% respectivamente (Figura 18).

A análise de estimativa de ancestralidade também foi realizada separadamente para os isolados de GV (Figura 19) onde ocorrem duas populações ancestrais diferentes ($K=2$) que tendem a se separar de acordo com o ano de coleta. A P1 possui 100% de frequência nos isolados obtidos nos anos de 2008 e 2012, mas também numa proporção de aproximada de 25-30% em cinco isolados de 2015. Nas amostras coletadas em 2015 predomina a P2 com 100% de frequência e em cinco isolados ocorre na proporção de 70-75% (Figura 19). Vale ressaltar que a frequência de populações ancestrais é menor quando avaliamos os dados de GV isoladamente, uma vez que desconsideramos a influência das demais populações que ocorrem nas outras áreas geográficas.

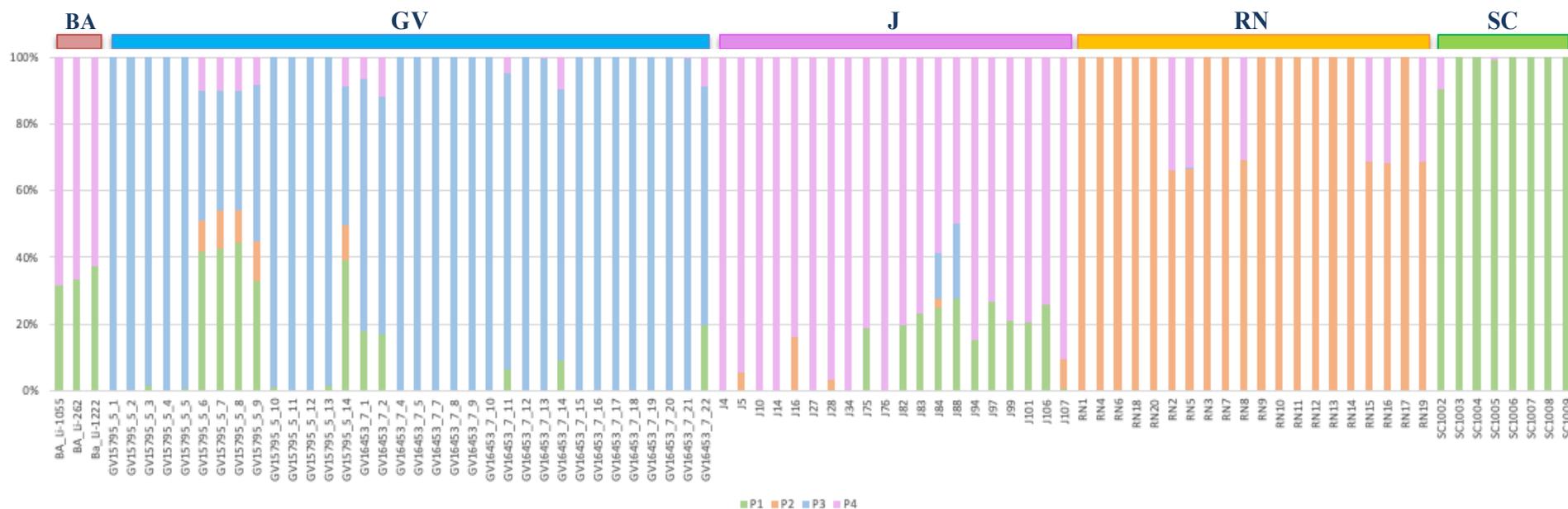


Figura 18 – Estimativa de ancestralidade pela análise de *admixture* dos isolados. A análise de estimativa de ancestralidade reúne todos os isolados (n=85) distribuídos de acordo com a frequência da ocorrência de populações ancestrais nos genomas estudados. O valor de $K=4$ representa o número estimado de populações ancestrais que ocorrem no *set* de dados e foi estimado a partir do menor valor de *CV error* quando se calcula valores de $K=2-10$.

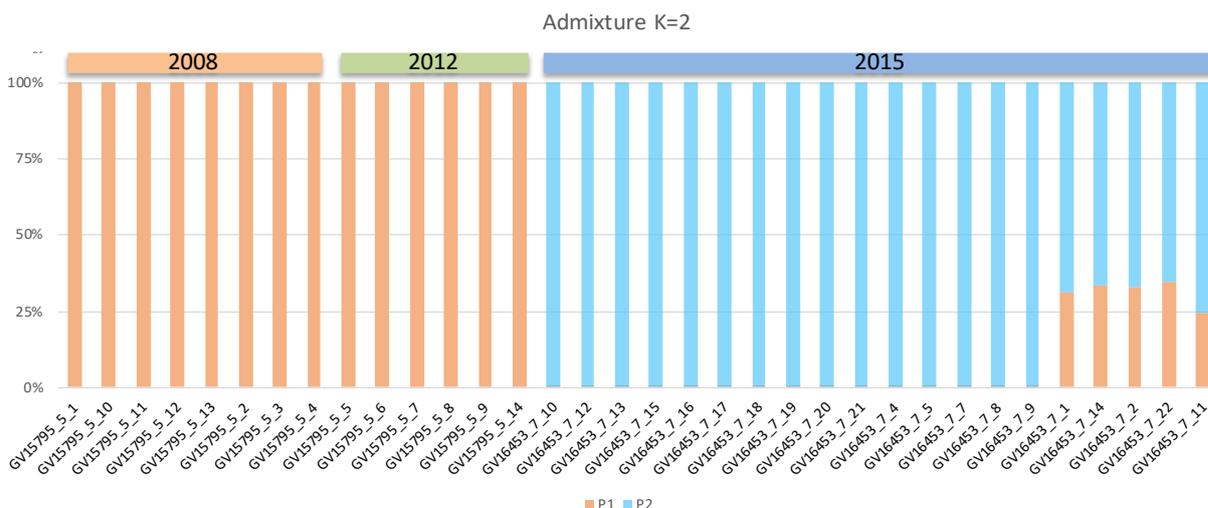


Figura 19– Estimativa de ancestralidade pela análise de *admixture* para os isolados de GV. A análise de estimativa de ancestralidade reúne apenas os isolados de GV (n=34) distribuídos de acordo com a frequência da ocorrência de populações ancestrais nos genomas estudados. O valor de $K=2$ representa o número estimado de populações ancestrais que ocorrem no *set* de dados e foi estimado a partir do menor valor de *CV error* quando se calcula valores de $K=2-10$. Os isolados estão organizados de acordo com o ano de coleta de cada amostra 2008, 2012 e 2015.

6.6.2. Por cromossomo

A contribuição das populações ancestrais na composição de cada cromossomo nos diferentes isolados foi também avaliada (Figura 20). De maneira geral, os cromossomos de SC são aqueles mais homogêneos quanto à presença de populações distintas. Nessa região predomina a P1 (verde), ainda que nos cromossomos um e três ocorram também P3 (azul) e, menos frequentemente, P4 (rosa). Para o cromossomo 25 pode ser observada, apenas nos isolados SC1008 e SC1009 (cão e humano, respectivamente) a ocorrência de P3, além de P1.

Nos indivíduos da Bahia ocorre bastante variação na frequência populacional em grande parte dos cromossomos, sendo que os cromossomos 1,3,5 e 6 são os mais homogêneos com predomínio de P1 e em 16 e 22 com a ocorrência de P4. Nos demais ocorre frequência de mais de uma população com predomínio de P4 em grande parte deles.

No RN ocorre o predomínio da P2 (laranja) em todos os cromossomos, mas em determinados indivíduos (RN2 e RN5, RN8, RN15, RN16 e RN19) ocorre a P4 (rosa) em diversos cromossomos. Além disso, para os isolados RN2 e RN5, RN8 e RN19 foi observado a ocorrência de uma terceira população P3, apenas no cromossomo 31.

A população predominante nos isolados de Januária é P4, mas sobretudo nos isolados de área rural (acima) ocorre maior heterogeneidade e foi observada uma combinação com as

demais populações em diversos cromossomos com frequências variadas. Na população urbana (abaixo), ocorre em alguns cromossomos (10, 12, 22, 24-27 e 33) a presença da P2, mas de maneira homogênea predominando em todos os indivíduos.

Como nas demais análises, pode-se perceber que quanto à estimativa de ancestralidade por cromossomo, os isolados de GV também são aqueles com maior variação em termos de número de populações ancestrais, ainda que predomine a P3 (azul). As amostras coletadas em 2015 e maneira geral, são aquelas mais homogêneas com maior frequência de P3, enquanto que os isolados coletados entre os anos de 2008 e 2012 apresentam-se mais heterogêneos com a presença mais frequente de P1 (verde) em muitos dos cromossomos. Para o último período de coleta, os cromossomos 3, 5, 6, 8, 11 e 26 apresentam predomínio de P1.

Nos cromossomos 23, 24 e 25 observa-se uma grande proximidade em termos de frequência populacional para os isolados de RN e aqueles de Januária, sobretudo da área rural com predomínio de P2, bastante frequente em RN nos demais cromossomos.

Em alguns cromossomos, em um isolado de Januária da área urbana (J88) e dois isolados de RN (RN2 e RN5 – mesmo indivíduo com coletas de materiais biológicos diferentes) pode ser observada frequentemente a presença de P3 azul, bem demarcada no cromossomo 31.



Figura 20 –Estimativa de ancestralidade pela análise de *admixture* dos cromossomos dos isolados. A análise de estimativa de ancestralidade foi realizada para cada cromossomo – *chr* - (1-36) de *L. infantum* e foi realizada a partir do arquivo *gvcf* concatenado com todos os isolados ($n=85$). O valor de $K=4$ foi previamente estipulado a partir do valor obtido na análise individual de ancestralidade.

CAPÍTULO II:
*Investigação de casos de coinfeção por Leishmania spp. em
cães de área endêmica, naturalmente infectados através de
marcadores biomoleculares.*

7. INTRODUÇÃO

7.1. Casos de infecção atípica por *Leishmania* spp.

No contexto da LV, os cães são considerados o principal reservatório de *L. infantum*, agente etiológico da LVH e da LVC, no Brasil e em outros países do Velho e Novo mundos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; QUINNELL; COURTENAY, 2009). Nesses animais a doença é considerada crônica e de progressão lenta, sendo que grande parte deles apresentam manifestações subclínicas (RIBEIRO, 2007).

Os cães possuem um papel importante na biologia e epidemiologia no ciclo da leishmaniose e, ainda que seja uma doença prevalente e endêmica em diversas regiões do Brasil e do mundo, muitos aspectos relacionados a LVC precisam ser elucidados. Ainda existe, por exemplo, pouca evidência que comprove a capacidade de reservatório dos cães para outras espécies envolvidas no ciclo de transmissão da LT (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Mas já foi demonstrada a presença em cães de espécies como *L. amazonensis* e *L. braziliensis* infectando tecidos que não a pele (CARVALHO *et al.*, 2015; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; DIAS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; MADEIRA *et al.*, 2006; REITHINGER *et al.*, 2000; SANCHES *et al.*, 2016; TOLEZANO *et al.*, 2007; VALDIVIA *et al.*, 2017) e a presença de parasitos do complexo *L. donovani* isolados de lesão cutânea primária ativa em um cão proveniente de área endêmica do Rio de Janeiro, tendo sido o primeiro relato publicado de infecção atípica no Brasil (OLIVEIRA NETO *et al.*, 1986a).

Tais padrões e frequência da ocorrência de infecções atípicas que envolvem o encontro de espécies de *Leishmania* em tecidos e em hospedeiros não usuais necessitam ser explorados, tanto em cães, como em humanos, uma vez que influenciam diretamente e podem implicar em alterações nas medidas de controle, tratamento e diagnóstico, até então preconizados e praticados.

Nesse sentido, ao longo desse trabalho amostras de medula óssea de cães naturalmente infectados proveniente de regiões endêmicas de Minas Gerais foram caracterizadas através de um painel de biomarcadores subgênero-específicos por técnica de PCR convencional a fim de identificar as espécies de parasitos circulantes nos cães da região e a ocorrência de infecções atípicas por *Leishmania* spp..

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1. Obtenção das amostras de campo e ética no uso de animais

As amostras obtidas nessa etapa do trabalho são provenientes de cães naturalmente infectados do município de São Joaquim de Bicas, Minas Gerais, durante visitas realizadas à comunidade dentro do programa de extensão *ChiCão* coordenados pelo professor da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), Betim, Minas Gerais, Dr. Guilherme do Valle e pelo Dr. Vitor Márcio Ribeiro, professor da mesma instituição, ambos colaboradores deste estudo. Algumas amostras foram obtidas no Santo Agostinho Hospital Veterinário, sobre a coordenação do Dr. Vitor Márcio Ribeiro. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (CEUA PUC-MG), pelo protocolo 015/2016 (Anexo 10).

8.2. Triagem e inclusão dos cães no estudo

Durante as visitas do programa de extensão os animais tiveram amostras de sangue total coletadas e testados para LV através de testes sorológicos rápidos, DPP (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, BR) e rKDDR (Safetest[®] Diagnósticos, Minas Gerais, BR), utilizados de acordo com instruções dos fabricantes. As amostras de sangue total também foram encaminhadas para o LIGP e com o soro obtido foi realizado ELISA utilizando a proteína recombinante KDDR, através de método *in house* como descrito por Dhom-Lemos *et al.* (2019). Em visitas subsequentes, animais positivos em, pelo menos, um dos testes realizados foram convidados para realização de punção aspirativa para obtenção de medula óssea. Além disso, uma amostra adicional foi incluída no estudo, proveniente de uma animal atendido no Hospital Veterinário da PUC-MG em Betim com histórico de LVC e recidiva no tratamento.

Um total de 24 amostras de medula óssea foram coletadas dos cães através de punção aspirativa do osso esterno utilizando seringa de 10mL e agulha 40x12mm. As amostras foram armazenadas em gelo e transportadas para o LIGP para inóculo em meio de cultura ($n=19$) ou extração direta de material genômico da medula óssea ($n=5$).

8.3. Obtenção de formas promastigotas de *Leishmania* spp.

As amostras obtidas foram cultivadas em tubos cônicos de 15mL (Falcon[®], Becton Dickinson - BD, New Jersey, USA) em meio de cultura bifásico NNN contendo *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) enriquecido com 10% de SFB (Cultilab, São Paulo, BR), penicilina 2mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e ágar-sangue preparado com sangue de coelho defibrinado cedido pelo Instituto René Rachou, FIOCRUZ-MG. As amostras foram incubadas em estufa biológica refrigerada BOD (Tecnal[®], modelo TE-371) à temperatura de 23°C. Amostras positivas com promastigotas em fase de crescimento estacionária foram contados e 1×10^8 parasitos/mL foram centrifugados a 2200rpm (centrífuga refrigerada modelo Hettich Universal 32R, DJB Labcare, Newport Pagnell, UK), durante 10 minutos a 4°C para obtenção de pellet seco.

8.4. Extração de gDNA e caracterização molecular

Para a extração de gDNA das amostras obtidas de cultura de parasitos foi utilizado o kit comercial PureLink[™] Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) e para a extração direta de medula óssea foi empregado o kit para extração de tecido *NucleoSpin[®]* da MN (Macherey-Nagel, Düren, HR) utilizando 200µL de amostra. Para ambas as extrações foram seguidas as instruções dos fabricantes.

As amostras tiveram a concentração e qualidade do gDNA dosados por espectrofotometria (NanoDrop 2000c, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) e as concentrações ajustadas para 50ng/µL.

A caracterização dos isolados foi realizada através de PCR convencional utilizando iniciadores para detecção de kDNA geral de subgênero *Viannia* (MP1L: 5'-TACTCCCCGACATGCCTCTG-3' e MP3H: 5'-GAACGGGGTTTCTGTATGC-3') com fragmento de 70pb e subgênero *Leishmania* (kDNA.Leish.F: 5'-CGTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' e kDNA.Leish.R: 5'-CCGAAGCAGCCGCCCTATT-3') com fragmento de 135pb. As amostras foram amplificadas em termociclador MJ Mini (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, USA), a leitura realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% e as imagens capturadas em fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Illinois, USA).

A amostra de um dos cães, obtida através de punção aspirativa de medula óssea, negativa em cultura e em reação de PCR convencional anterior foi testada novamente por técnica de PCR utilizando 1 ou 3µL da reação anterior, em substituição ao gDNA. Os produtos da segunda amplificação foram então resolvidos em gel de poliacrilamida a 8% revelado com nitrato de prata.

8.5. Sequenciamento de *amplicons* de amostras positivas

Das amostras positivas foi realizada a purificação do *amplicon* visualizado em gel de agarose, para recuperação do gDNA com kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Illinois, USA). O material eluído, 40µL, foi encaminhado para sequenciamento na empresa Macrogen Inc. (Seoul, Republic of Korea) através de tecnologia *Sanger*. Os dados gerados foram analisados e checados manualmente utilizando o *software* Sequencher v4.1 (Gene Codes, Ann Arbor, MI). As sequências obtidas foram analisadas no BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - *Nucleotide*, NCBI) contra um banco de dados dos genomas de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *Canis familiaris* e *Homo sapiens*.

9. RESULTADOS

Investigação da ocorrência de infecções atípicas e coinfeções por mais de uma espécie de Leishmania spp. em cães naturalmente infectados no município de São Joaquim de Bicas e no Santo Agostinho Hospital Veterinário.

9.1. Triagem e inclusão dos cães no estudo

De todos os cães triados no projeto *ChiCão* e no Santo Agostinho Hospital Veterinário, 23 foram selecionados para realização de punção de medula óssea, de acordo com positividade em pelo menos um dos dois testes imunocromatográficos testados em campo: rKDDR ou DPP. Além disso uma amostra de medula óssea foi encaminhada do hospital da PUC-MG de um cão com LVC refratário ao tratamento. O material de escolha para realização de caracterização genotípica das amostras positivas foi o *pellet* de parasitos provenientes de cultura (19/24). Contudo, em amostras nas quais a qualidade e rendimento da extração não foram satisfatórios ou não havia material suficiente foi realizada extração diretamente do aspirado de medula óssea (5/24).

9.2. Caracterização genotípica de isolados de cães naturalmente infectados

As formas promastigotas obtidas em cultura, assim como as amostras de medula óssea foram submetidas à extração de gDNA, seguido de reações de PCR usando iniciadores específicos para os subgêneros *Viannia* ou *Leishmania*. Foram obtidos *amplicons* com tamanho correspondente apenas ao subgênero *Leishmania* (135pb) em 79,17% das amostras (19/24). Em uma das amostras (4,16%) foi obtido um *amplicom* com tamanho correspondente apenas ao subgênero *Viannia* (70pb) e em quatro dos animais testados (16,67%) foram obtidos *amplicons* com o tamanho esperado para ambos os subgêneros, sugerindo um padrão de infecção com mais de uma espécie de *Leishmania*. As reações de PCR para os quatro isolados com padrão de coinfeção estão representadas nas Figuras 21-22.

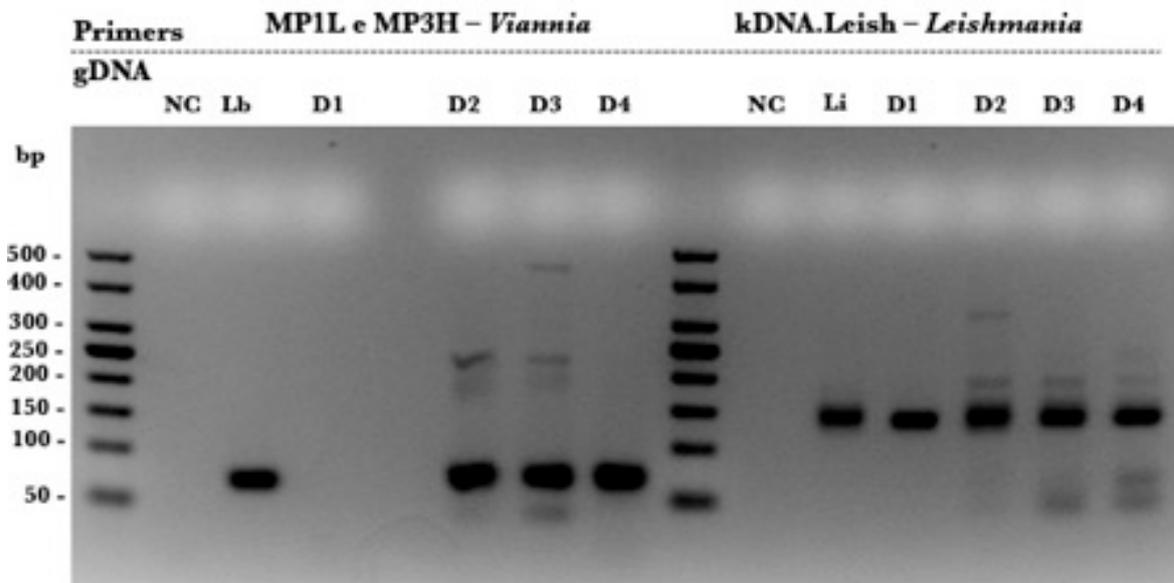


Figura 21 - Perfil de amplificação de amostras de cães com sinais clínicos de LVC utilizando iniciadores subgênero-específicos. Amostras de gDNA foram amplificadas utilizando dois pares de iniciadores: MP1L e MP3H para subgênero *Viannia* (70pb) e kDNA.Leish F/R (135pb) para subgênero *Leishmania*. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%. NC corresponde aos controles negativos; Lb e Li: gDNA de amostras de referência para *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, respectivamente; D1: cão 1 (amostra de gDNA extraída de cultura de promastigotas); D2-D4, cães 2 a 4 (amostras extraídas de aspirado de medula óssea); bp: pares de bases; e gDNA: DNA genômico.

O cão D1 foi positivo apenas para o subgênero *Leishmania*, enquanto que para os animais D2-D4 foram obtidos fragmentos com tamanhos correspondentes aos dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, indicando um padrão de coinfeção.

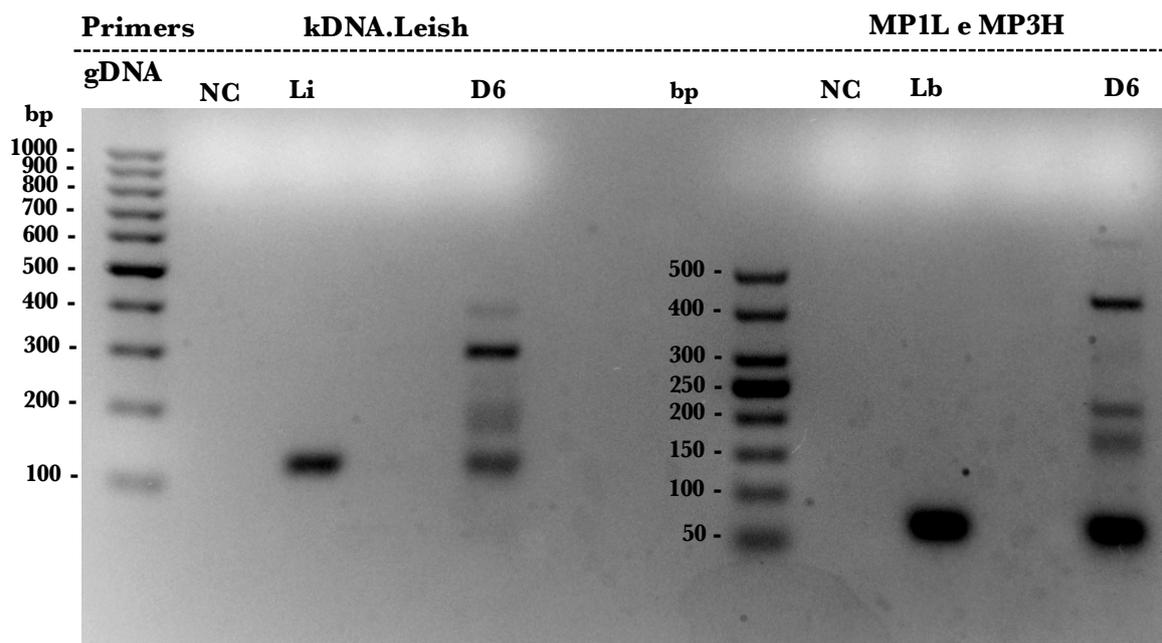


Figura 22 - Perfil de amplificação de amostra de cão com recidiva em tratamento para a LVC utilizando iniciadores subgênero-específicos. A amostra de gDNA foi amplificada utilizando dois pares de iniciadores: kDNA.Leish F/R (135pb) para subgênero *Leishmania* e MP1L e MP3H para subgênero *Viannia* (70pb). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%. NC corresponde aos controles negativos; Li e Lb: gDNA de amostras de referência para *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, respectivamente; D6, cão 6 (amostra extraída de aspirado de medula óssea); bp: pares de bases; e gDNA: DNA genômico.

Quando a amostra do cão D6 foi testada na concentração de 50ng/ μ L em PCR convencional foram observados fragmentos com intensidade de reação leve para os dois subgêneros, então foi realizada uma segunda reação de PCR de PCR com 3 μ L do produto da reação anterior que apresentou fragmentos com pares de bases correspondentes e intensidade de reação forte para ambos os subgêneros (Figura 22).

A amostra de um cão (D5) negativo em cultura, mas com sinais clínicos de LV foi testada utilizando os mesmos iniciadores em uma reação de PCR e em uma reação de re-amplificação do produto de PCR da reação anterior, fracionados em gel de poliacrilamida 8% e revelado com nitrato de prata (Figura 23). A amostra desse cão foi testada na concentração de 50ng/ μ L (D5₁) na primeira reação, não sendo observada amplificação para nenhum dos iniciadores, e com 1 μ L (D5₂) e 3 μ L (D5₃) de produto da reação de PCR anterior em substituição ao gDNA, nas quais visualizou-se fragmentos com padrão de peso molecular correspondente ao subgênero *Viannia* apenas.

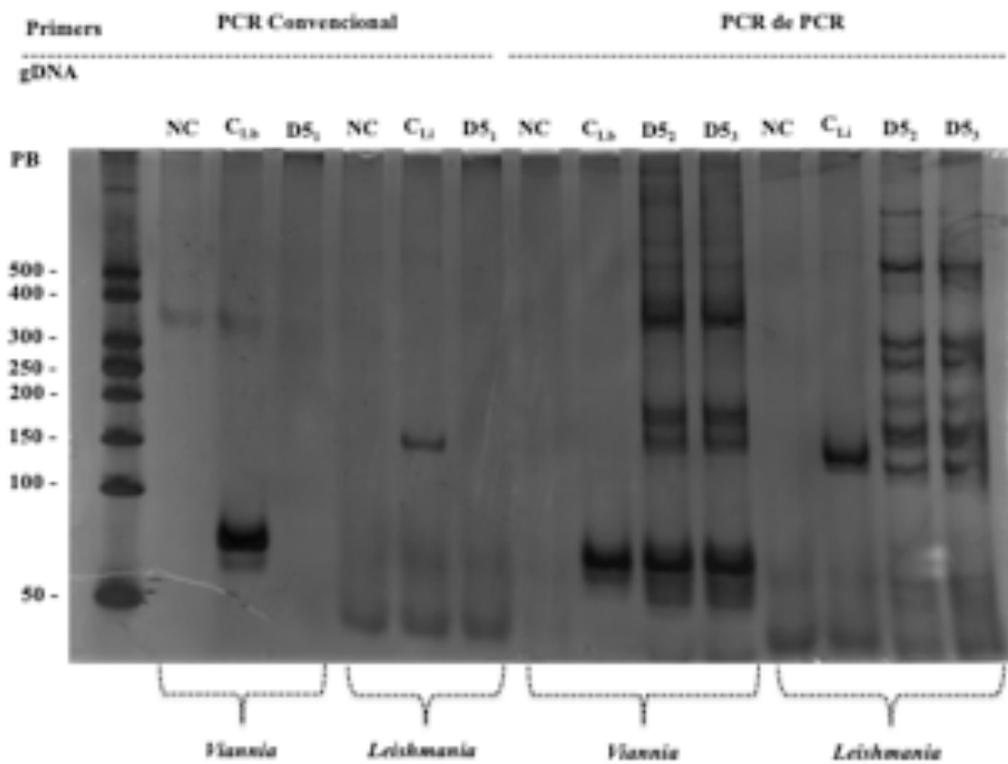


Figura 23 - Perfil de amplificação de amostras de cão assintomático positivo apenas para o subgênero *Viannia*. Amostras de gDNA foram amplificadas utilizando dois pares de iniciadores: MP1L e MP3H para subgênero *Viannia* (70pb) e kDNA.Leish F/R (135pb) para subgênero *Leishmania*. Os produtos de PCR convencional e PCR de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 8%. NC corresponde aos controles negativos; C_{Lb} e C_{Li}: gDNA de amostras de referência para *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*; D5₁: gDNA de amostra de cão na concentração de 50ng/μL (amostra de gDNA extraída de aspirado de medula óssea) D5₂ e D5₃ amostra do mesmo cão testado por PCR de PCR com 1 e 3μL da reação de PCR convencional, respectivamente; bp: pares de bases; e gDNA: DNA genômico.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Leishmania braziliensis strain MHOM/PE/00/LH699 clone LH699.34 minicircle kinetoplast, partial sequence
Sequence ID: [KY700049.1](#) Length: 81 Number of Matches: 1

Range 1: 8 to 35 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
51.8 bits(56)	1e-06	28/28(100%)	0/28(0%)	Plus/Plus

Query 9 CGATTTGGCATAACAGAAACCCCGTTCA 36
 |||
 Sbjct 8 CGATTTGGCATAACAGAAACCCCGTTCA 35

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Leishmania braziliensis strain MHOM/PE/00/LH699 clone LH699.31 minicircle kinetoplast, partial sequence
Sequence ID: [KY700046.1](#) Length: 81 Number of Matches: 1

Range 1: 8 to 35 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
51.8 bits(56)	1e-06	28/28(100%)	0/28(0%)	Plus/Plus

Query 9 CGATTTGGCATAACAGAAACCCCGTTCA 36
 |||
 Sbjct 8 CGATTTGGCATAACAGAAACCCCGTTCA 35

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Leishmania braziliensis strain MHOM/PE/00/LH699 clone LH699.26 minicircle kinetoplast, partial sequence
Sequence ID: [KY700041.1](#) Length: 81 Number of Matches: 1

Range 1: 8 to 35 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
51.8 bits(56)	1e-06	28/28(100%)	0/28(0%)	Plus/Plus

Query 9 CGATTTGGCATAACAGAAACCCCGTTCA 36
 |||
 Sbjct 8 CGATTTGGCATAACAGAAACCCCGTTCA 35

Figura 25 - Resultado da análise de similaridade por BLASTn (GenBank – NCBI) das sequências obtidas. Três dos resultados obtidos através de análise no BLASTn ao se comparar com a sequência obtida de um animal infectado apenas por parasitos do subgênero *Viannia*.

10. DISCUSSÃO

Através das análises realizadas foi possível realizar um estudo comparativo de 85 genomas completos de isolados de *L. infantum* provenientes de cães e humanos de áreas endêmicas para LV. Estudos que envolvem genômica comparativa de isolados de pacientes infectados com *L. infantum* são escassos na literatura (FRANSSEN *et al.*, 2020) e no Brasil, poucos estudos incluem amostras de cães naturalmente infectados (SCHWABL *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2017). Dessa forma o presente trabalho é inovador ao incluir e comparar genomas de isolados de amostras de campo de 69 cães e 16 humanos provenientes de áreas endêmicas para LV distintas. Nesse estudo é demonstrada a ocorrência de divergência genética entre esses isolados de acordo com a região geográfica a que pertencem e associada a fatores temporais.

Dessa forma os isolados foram avaliados quanto o número de SNVs, filogenia e número de cópias cromossômicas e, de maneira geral, isolados de uma mesma região geográfica se mostraram menos divergentes quando comparados às amostras provenientes de outras localidades.

Pela análise de CCNV demonstrou-se que em alguns isolados ocorreu uma variação no número de cópias cromossômicas caracterizando um perfil de aneuploidia. Esse padrão já foi bastante explorado por Sterkers *et al.* (2011) em *L. major*.

Essas variações podem ser explicadas como um mecanismo rápido de adaptação desses parasitos frente a pressões ambientais (DUMETZ *et al.*, 2017; LACHAUD *et al.*, 2014) e o aumento do número de cópias cromossômicas pode estar relacionado a amplificação e aumento da expressão de genes relacionados à patogênese e sobrevivência (ZHANG *et al.*, 2014). Através de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi possível determinar precisamente o número de cromossomos homólogos em uma população de parasitos da espécie analisando individualmente cada célula em interfase (STERKERS *et al.*, 2011). Alguns cromossomos variaram de monossômicos a trissômicos durante o estudo e esse padrão de variação foi transmitido dentro de uma população clonal derivada da cepa utilizada caracterizando o painel de aneuploidia em mosaico.

A variação de *gene dosage* não foi avaliada nesse estudo, mas a análise de CCNV demonstrou que ocorre expressiva variação no número de cópias cromossômicas em amostras de campo provenientes de regiões endêmicas para LTA e LV, sobretudo em isolados de GV e da área urbana de Januária observada mais frequentemente nos cromossomos 8, 23 e 31.

Resultado semelhante foi descrito também por Franssen *et al.* (2020) para esses mesmos cromossomos, além do 9, ao avaliar 151 genomas de parasitos do complexo *L. donovani* provenientes de amostras clínicas da Índia, Turquia, Sri Lanka e Brasil. Outro estudo avaliou a variação de CNV em 30 amostras clínicas obtidas de pacientes sintomáticos com LV de um hospital de Teresina e perfis variáveis de cromossomos extranumerários foram observados para 11 cromossomos (26 ao 36) (CARVALHO *et al.*, 2020).

Embora quase todos os isolados possuam cromossomos com algum nível de variação numérica, os cromossomos 8, 23 e 31, apresentaram prevalentemente o padrão de aneuploidia e estavam mais frequentemente aumentados nos isolados. Dessa forma, esses três cromossomos foram submetidos a análises de ontologia.

Os genes enriquecidos no cromossomo 8 estão envolvidos principalmente no metabolismo energético como aqueles relacionados à atividade da ribose-fosfato difosfoquinase e compostos organonitrogenados, manutenção e sobrevivência do parasito na célula hospedeira que inclui genes relacionados a processos de exocitose e atividades endo e lisossomais, na resposta ao estresse e reparação celular e síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos como genes responsáveis pela atividade das DNA polimerases, iniciadores de processos translacionais e endopeptidases.

Além disso, genes relacionados à manutenção de componentes celulares associados à fatores de virulência do parasito como invasão e modulação da resposta imune também estão enriquecidos nesses cromossomos. Dentre eles podem ser destacados os genes relacionados a regulação da produção de fator de necrose tumoral do hospedeiro, processos biossintéticos relacionados ao óxido nítrico e aqueles responsáveis pela regulação da atividade da esfingomielina fosfodiesterase. Essa última enzima degrada a esfingomielina, importante componente de membrana celular e molécula de sinalização, presente nas células dos hospedeiros mamíferos, para obtenção de etanolamina, um metabólito essencial para a sobrevivência do parasito e, em condições *in vitro* é essencial na metaciclo-gênese (ZHANG *et al.*, 2009).

Apesar da atividade da esfingomielina fosfodiesterase (GO000476) ser regulada por um gene que não está enriquecido nos cromossomos de *Leishmania* spp. através das análises realizadas é interessante destacar que o único gene responsável pela regulação dessa função molecular encontra-se no cromossomo 8. PUCADYIL *et al.* (2004) demonstraram que após a internalização da *Leishmania* inicia na célula hospedeira a degradação da esfingomielina que resulta na primeira fase de formação da ceramida, um lipídio de membrana que facilita a

adesão do parasito na membrana celular com a formação de microdomínios. Além disso, um estudo *in vitro* demonstrou que *L. donovani* foi capaz de prejudicar a apresentação de antígenos de macrófagos 24 horas após a infecção. Esse processo decorre da segunda fase de geração da ceramida com uma diminuição na biossíntese do colesterol que culmina com o deslocamento dessa molécula da membrana fosfolipídica (MAJUMDER *et al.*, 2012).

Algumas das endopeptidases de *Leishmania* constituem importantes fatores de virulência desses parasitos implicadas na patogênese e remodelamento celular durante o ciclo biológico nos hospedeiros, sendo assim constituem importantes e promissores alvos terapêuticos (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; GREWAL *et al.*, 2019). As peptidases de cisteína constituem uma família de proteínas que participam na diferenciação e sobrevivência da *Leishmania* e já foi demonstrado que a enzima ATG4, membro desse grupo possui um papel importante como fator de virulência para *L. major* (WILLIAMS; MOTTRAM; COOMBS, 2013). Essa endopeptidase é um elemento chave na via ATG8 de lipidação e essencial na biogênese dos autofagossomos, processo intracelular do parasito que o capacita para sequestrar componentes do citosol e organelas da célula hospedeira.

Grewal *et al.* (2019) deletaram genes de *L. mexicana* através da tecnologia CRISPR-Cas9 para identificar peptidases com potencial como alvo terapêutico. A calpaína *PNT1* demonstrou ser essencial para a sobrevivência do parasito, uma vez que parasitos mutantes com deleção do gene que expressa essa proteína tiveram um comprometimento severo em seu desenvolvimento celular.

As funções do cromossomo 23 estão relacionadas ao funcionamento e manutenção celular como nutrição, locomoção e divisão. Alguns dos genes superexpressos nesse cromossomo estão relacionados ao controle do fluxo de nutrientes e íons através da membrana celular do parasito, como transportadores de cátions e atividade de ATPases que regulam o movimento de substâncias transmembrana. Além disso, uma das funções moleculares enriquecidas é a atividade do acetato-CoA ligase ou *acetyl-CoA synthetase* (AceCS), uma enzima de síntese envolvida no ciclo do metabolismo do acetato. Apesar de sua função ainda não ser muito elucidada em *Leishmania*, análises funcionais com mutantes de *L. donovani* com gene *knockout* da AceCS, demonstraram que essa enzima é essencial para a biossíntese total de lipídios e ergosterol do parasito como fonte de energia, além de constituir um fator de virulência, uma vez que na ausência dessa enzima a infectividade *in vitro* de macrófagos foi menor (SOUMYA *et al.*, 2017).

Contudo esse cromossomo possui também genes relacionados à virulência do parasito que desempenham funções vitais para sua sobrevivência no hospedeiro como atividades relacionadas ao bioprocessamento do grupo Heme O para obtenção final de ferro. Esse metal é essencial para o crescimento intracelular das amastigotas dentro das células do sistema monocítico fagocitário. Estudos *in vitro* já demonstraram que *L. major*, na ausência do gene *lmfech* (*L. major* ferrochelataze) possuem uma deficiência na proliferação dentro de macrófagos e essa capacidade é restabelecida quando os genes são restaurados (ORREGO *et al.*, 2019). Sabe-se que *Leishmania* não consegue produzir precursores iniciais das vias de biossíntese, então contam com um mecanismo de obtenção e regulação bastante especializado que pode ocorrer de duas maneiras, dentro do vacúolo parasitóforo, na forma de ferro inorgânico, ou ferro contendo porfirinas, como o heme. Além disso o parasito é capaz de ajustar e regular a quantidade de ferro que é obtida, uma vez que em grandes quantidades o metal possui grande potencial de toxicidade celular (FLANNERY; RENBERG; ANDREWS, 2013).

A polissomia do cromossomo 31 é conhecida para várias espécies de *Leishmania* e bastante descrita (AKOPYANTS *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2020; DOWNING *et al.*, 2011; FIGUEIREDO DE SÁ *et al.*, 2019; ROGERS *et al.*, 2011; SALLOUM *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2017; VALDIVIA *et al.*, 2015, 2017; ZACKAY *et al.*, 2018). Os achados desse trabalho corroboraram a presença de cópias extranumerárias no cromossomo 31 em todos os isolados e profundidades de cobertura que variaram entre trissomia e hexassomia.

Alguns estudos já correlacionaram a polissomia do cromossomo 31 a funções relacionadas ao transporte e aquisição de ferro e replicação de amastigotas dentro dos macrófagos (HUYNH; ANDREWS, 2007; HUYNH; SACKS; ANDREWS, 2006; VALDIVIA *et al.*, 2015), de maneira semelhante aos genes anotados do cromossomo 23 como demonstrado pelas análises do GO. Genes relacionados à atividade de endopeptidases, assim como no cromossomo 8, sobretudo daquelas formadas por cisteína, também estão enriquecidos no cromossomo 31.

Além disso muitas das anotações de função molecular relacionadas aos genes do cromossomo 31 estão envolvidas em processos metabólicos, transferência de elétrons, transporte de membrana e na interação parasito-hospedeiro. Nesses dois últimos destaca-se o transportador de arginina de alta afinidade que está envolvido no mecanismo de controle do aporte desse aminoácido para o interior da célula hospedeira. A arginina é um aminoácido sintetizado pelos mamíferos, mas não por tripanosomatídeos, além disso, parasitos do gênero

Leishmania a utilizam na biossíntese de poliaminas necessárias ao seu crescimento e sobrevivência (CASTILHO-MARTINS *et al.*, 2011; HIBBS; REED; EVANS, 1996; SHAKED-MISHAN *et al.*, 2006). Estudos com *L. amazonensis* e *L. donovani* demonstraram que os parasitos, através de transportadores de alta afinidade, são capazes de controlar o influxo de arginina quando na carência de aminoácidos e de acordo com o estresse ambiental através do controle de expressão gênica ao nível de RNA mensageiro (mRNA) (CASTILHO-MARTINS *et al.*, 2011; DARLYUK *et al.*, 2009).

Sabe-se que a arginina é considerada uma precursora do óxido nítrico, envolvido na resposta de defesa dos macrófagos aos patógenos. Através dos transportadores de arginina os parasitos, possivelmente regulam o fluxo e sequestram a arginina intracelular perpetuando-se no interior dos macrófagos e polarizando a resposta imune do hospedeiro (CASTILHO-MARTINS *et al.*, 2011). Além dos transportadores de arginina, no cromossomo 31, estão enriquecidos muitos genes relacionados ao transporte de íons e metais como o ferro.

Os ligantes do sistema ferro-enxofre (*iron-sulfur*) orquestram uma gama de processos metabólicos essenciais para *Leishmania* spp. como geração energética e biogênese ribossomal, além disso foi demonstrado que isolados de *L. donovani* resistentes a anfotericina B possuíam maior conteúdo de ferro intracelular e uma regulação positiva do sistema ferro-enxofre, provavelmente influenciada pela presença de espécies reativas de oxigênio (PRATAP SINGH *et al.*, 2014).

Dessa forma, existe grande relevância no estudo aprofundado dos genes que desempenham papel fundamental na sobrevivência do parasito, interação parasito-hospedeiro, assim como fatores de virulência, uma vez que constituem potentes alvos para desenvolvimento de drogas anti-*Leishmania*.

As mutações pontuais em nucleotídeos do genoma podem ser consideradas como estratégias adaptativas do parasito, assim como as variações no número de cópias cromossômicas. Nesse sentido, pela análise de PCA, corroborado pela análise filogenética, observou-se que perfis únicos de variantes dividiram os isolados em sete populações distintas de acordo com a região geográfica, sendo que em GV e Januária foram encontrados ainda dois subgrupos. Os isolados tenderam a se agrupar de acordo com a região geográfica de origem. Além disso, variação intrapopulacional foi bem observada para as amostras de GV que se agruparam, inclusive, de acordo com o ano de coleta, e as de Januária que se agruparam pela área de coleta, urbana ou rural e/ou ano de coleta 2017 e 2019, respectivamente (Figuras 14-15).

Teixeira *et al.* (2017) não observaram em seus estudos um agrupamento dos isolados por cidade ou ano de coleta, porém houve agrupamento de quatro isolados provenientes de pacientes assintomáticos, sendo o grupo com menor variabilidade entre si na análise nucleotídica. Ao comparar 19 sequências genômicas de *L. tropica* isolados de lesões de pacientes com LT Salloum *et al.* (2020) observaram correlação dos isolados com a região geográfica para apenas uma população dentre cinco agrupamentos formados no PCA, diferente dos dados observados para a filogenia, tendo sido essa realizada por análise de microssatélites.

Uma menor divergência genotípica entre os isolados pode ser corroborada pela menor diferença de SNPs e *indels* entre isolados provenientes da mesma origem (Tabela 4). Da mesma forma, em isolados provenientes da mesma região geográfica apresentam uma proporção bastante semelhante entre alelos homo ou heterozigóticos. Contudo, não é possível afirmar que se trata de uma população clonal, uma vez que os isolados foram coletados a campo de hospedeiros distintos ou mesmo em diferentes anos de coleta. O estudo populacional de amostras de campo, não clonadas, permite avaliar os isolados quanto ao seu comportamento em condições naturais, não controladas.

Ao longo dos anos subpopulações de parasitos interagem de maneira imprevisível e a coexistência de indivíduos geneticamente distintos favorece a variabilidade genética dentro de uma determinada região (DE MEEÛS *et al.*, 2007; ROUGERON; DE MEEÛS; BAÑULS, 2015). Esse comportamento é explicado pelo *Wahlund effect* que descreve a perpetuação de populações de indivíduos homozigóticos ao longo de milhões de anos após a introdução inicial de populações ancestrais geneticamente distintas após eventos de replicação ou até reprodução sexuada (GARNIER-GÉRÉ; CHIKHI, 2013). Esses fenômenos podem também ser explicados pela ocorrência de barreiras geográficas e fatores temporais que dificultam o encontro de populações diferentes de parasitos impedindo a troca de material genético.

Os eventos de recombinação ocorrem de maneira mais lenta e gradual, fazendo com que variações no número de cópias cromossômicas e variações nucleotídicas pontuais no genoma sejam mecanismos chave que conferem a plasticidade genômica elevada bastante pronunciada em parasitos do gênero *Leishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; MACIVER, 2019; MANNAERT *et al.*, 2012; PATINO *et al.*, 2020; STERKERS *et al.*, 2011, 2014). A variação no número de cópias cromossômicas (CCNV) é uma estratégia rápida do parasito em resposta a mudanças e *stress* ambientais (BUSSOTTI *et al.*, 2018; DUMETZ *et al.*, 2017; ROGERS *et al.*, 2011). KUMAR *et al.* (2013) realizaram um estudo empregando parasitos sensíveis e

resistentes ao Nelfinavir, droga a ser empregada como tratamento em pacientes coinfetados por *Leishmania* spp. e HIV. Nos parasitos resistentes, os cromossomos 6 e 11 eram supranumerários, estando associados a uma regulação positiva da classe de transportadores ABC associados a resistência a drogas e seu sequestro em compartimentos vesiculares citoplasmáticos. O estudo também demonstrou que nesses cromossomos o número de cópias dos genes que codificam para proteínas relacionadas aos transportadores ABC em *Leishmania* também estavam aumentados. Esses dados reforçam a importância da aneuploidia como fator relacionado a adaptação e sobrevivência em *Leishmania*.

De maneira similar, os SNVs podem se acumular no genoma no decorrer de várias gerações estando relacionados a processos adaptativos de longa duração (BOITE *et al.*, 2014; LAFFITTE *et al.*, 2016). Os sítios polimórficos também podem estar ligados a resistência a drogas anti-*Leishmania* como demonstrado por SHAW *et al.* (2019). Nesse trabalho foi avaliada a resistência a paromomicina em isolados de *L. donovani* provenientes do Nepal. Indivíduos mutantes sensíveis a antimônios pentavalentes, mas resistentes a paromomicina (Sb^s PMM^r) possuíam uma única deleção e um SNP heterozigótico em uma região contendo um gene da família epimerase/dehidratase NAD-dependente.

Essas variantes também são úteis na análise de variabilidade inter e intraespecífica como um estudo que avaliou a diversidade existente entre cepas mais ou menos virulentas de *L. panamensis* com passagem em camundongos BALB/c e entre *L. panamensis* e *L. braziliensis* (URREA *et al.*, 2018). Das 656.782 variantes encontradas nos genomas, 88,6% dos SNPs e 79,4% dos *indels* correspondiam às diferenças interespecíficas entre *L. braziliensis* e *L. panamensis*. Ao remover *L. braziliensis* da análise comparativa mantendo apenas as cepas de *L. panamensis* permaneceram um total de 68.992 variantes sendo 74,31% de SNPs, 7,77% de *indels* bialélicos e 17,92% de variantes multialélicas.

ORTUÑO *et al.* (2019) também utilizaram a análise de SNPs para realizar inferências quanto a diversidade genética e relações filogenéticas entre isolados de *L. infantum* provenientes de amostras de cães, humanos e animais selvagens no sudoeste da Espanha. As análises de sequências de kDNA demonstraram que 44 isolados foram agrupados em 11 genótipos baseados em SNPs com uma variação nucleotídica de até 4,3%. Além disso a frequência genotípica foi significativamente maior em amostras provenientes de indivíduos sintomáticos do que em assintomáticos.

Dessa forma, observa-se que dentro de uma mesma região populações de parasitos interagem entre si e perpetuam características genotípicas e fenotípicas no ambiente em que

estão inseridos. A predominância de indivíduos homozigóticos foi evidenciada nos isolados da Bahia, Januária e RN o que pode ser um indício da ocorrência de populações potencialmente mais estruturadas e em equilíbrio. De maneira contrária, os isolados de GV e SC apresentam uma maior frequência de alelos heterozigóticos. Vale ressaltar que GV é a região com mais isolados inclusos no trabalho, o que eleva a probabilidade de encontrar variabilidade dentre as amostras, mas além disso quando se analisa o histórico da ocorrência de leishmaniose nessas regiões percebe-se que na primeira, ao longo dos anos, houve grande interferência antroponótica com a introdução e descontinuações recorrentes de diversas medidas de controle do parasito e do cão enquanto reservatório e tratamento de humanos doentes (BARATA *et al.*, 2013; COELHO; FALCÃO, 1966; MAGALHAES *et al.*, 1980), o que propicia a seleção de parasitos resistentes, além da constante inserção de novas subpopulações explicada pelos fenômenos migratórios (SHAW, 1997).

Em SC os primeiros casos de LVC e LVH foram reportados recentemente (PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS, 2017; STEINDEL *et al.*, 2013), sendo possível especular que menos populações distintas de parasitos circulem na região quando comparados as demais áreas estudadas. O predomínio da frequência de variantes heterozigóticas pode ser explicado por uma incidência menor do *Wahlund effect* nesses indivíduos e uma maior pressão seletiva para sobrevivência nos hospedeiros e *habitat* disponíveis, em decorrência da introdução e/ou dispersão recente de populações distintas de *Leishmania* nessa área geográfica (AGRAWAL; LIVELY, 2002).

Os isolados de SC e GV também apresentam um maior número de variações nucleotídicas como SNPs e *indels* (essa último apenas em GV). Dessa forma, considerando que as mutações influem diretamente na frequência alélica (DE MEEÛS *et al.*, 2007) é esperado uma maior taxa de heterozigose nos indivíduos provenientes dessas regiões geográficas.

Em nosso estudo houve o agrupamento de populações e subpopulações de acordo com a região geográfica sendo que a análise de PCA corroborou com a análise filogenética tendo sido as duas realizadas com a utilização de sequências de variantes. Franssen *et al.* (2020) encontraram dados semelhantes ao analisar isolados do complexo *L. donovani* através de filogenia. O *variant calling* nitidamente separou as amostras de *L. infantum* e *L. donovani*, sendo que esse se agrupou em cinco grupos distintos que coincidiram com o país de origem. Outro estudo comparou 204 isolados de pacientes com LV confirmada provenientes do Nepal, Bangladesh e Índia e encontrou três linhagens geneticamente divergentes na região: 191

isolados provenientes de regiões endêmicas dos três países, 12 isolados nepaleses encontrados frequentemente nas *highlands* e um único isolado nepalês formando a terceira população (IMAMURA *et al.*, 2016).

Com esses estudos é possível inferir que populações oriundas de uma mesma região geográfica, de maneira geral, apresentam menores divergências genéticas entre si. Tal fato sugere a possível ocorrência de populações distintas de *Leishmania* spp. de acordo com sua origem, pressões ambientais a que são submetidos ao longo do tempo e hospedeiros vertebrados e vetores envolvidos nessas localidades específicas. Os métodos de controle empregados para a doença e susceptibilidade dos hospedeiros podem variar de acordo com a população de parasitos envolvida refletido pela resposta adaptativa frente às condições ambientais a que são submetidos. Além disso, polimorfismos acumulados no genoma podem, a longo prazo, determinar a diferenciação em subpopulações de parasitos em função da pressão ambiental a que são submetidos. Como demonstrado no estudo de Brotherton *et al.* (2013), cepas mutantes de *L. infantum* selecionadas *in vitro* que possuíam uma adenina na posição 1885 no genoma, ao invés de uma guanina, como encontrado na cepa referência, apresentavam uma substituição de um aminoácido, relacionada a resistência ao antimônio.

A partir desses dados infere-se a importância em aprofundar e realizar estudos recorrentes no que diz respeito à dinâmica de populações dos parasitos e sua adaptabilidade ao ambiente em que estão inseridos.

Nesse contexto, os estudos de recombinação genética são de grande relevância por permitir acessar o conteúdo genômico dos parasitos em relação à população ancestral presentes em uma mesma localidade. A dinâmica de intercâmbio de populações em *Leishmania* spp. pode ser um reflexo da migração, processo de desmatamento e urbanização que culmina com introdução de populações distintas de parasitos em locais diferentes dos de origem e permite a interação de subpopulações modificando a distribuição da variação genética segundo o *efeito de Wahlund* (ROUGERON; DE MEEÛS; BAÑULS, 2015). Através das análises de *admixture* foi possível demonstrar que eventos de recombinação genômica estão presentes nos 85 isolados incluídos nesse trabalho com a presença de quatro populações ancestrais distintas de *L. infantum*.

O estudo dos eventos de recombinação em populações do gênero *Leishmania* tem se tornado mais frequente (CARVALHO *et al.*, 2020; COTTON *et al.*, 2020; DOWNING *et al.*, 2011; IMAMURA *et al.*, 2016). A análise da estrutura populacional de 30 isolados provenientes de amostras de medula óssea de pacientes sintomáticos com LV de Teresina,

Piauí demonstrou a prevalência de duas populações ancestrais de *L. infantum* (K=2), sendo que uma das populações está concentrada dentro de um raio de 200km ao redor da capital Teresina (CARVALHO *et al.*, 2020). Em nosso trabalho foi realizado uma análise de recombinação adicional apenas com os isolados de GV na qual foi demonstrada a presença de duas populações ancestrais distintas (K=2) separadas por uma distribuição temporal de coleta. Estudos como esses auxiliam na elucidação de aspectos epidemiológicos e relacionados à dispersão dos parasitos em áreas endêmicas para a doença (CARVALHO *et al.*, 2020).

Franssen *et al.* (2020) realizou um estudo genômico comparativo com isolados brasileiros depositados nos bancos de dados com amostras do RN de cães e humanos (TEIXEIRA *et al.*, 2017), e de humanos em tratamento para LV com miltefosina de Minas Gerais e do Piauí (CARNIELLI *et al.*, 2018). Os 46 isolados foram analisados em conjunto com amostras asiáticas e africanas (*L. donovani*) e europeias e da América Central (*L. infantum*) e foram obtidas de duas a três populações ancestrais distintas sendo que as brasileiras ficaram contidas em dois grupos que incluíam também, amostras do Mediterrâneo e da América Central. Outro estudo realizou a análise de *admixture* em isolados provenientes de pacientes de regiões geográficas distantes como Nepal, Índia, Etiópia e Sri Lanka obtendo nove populações ancestrais distintas (K=9) (IMAMURA *et al.*, 2016). A inclusão de isolados apenas de *L. infantum* em nosso estudo possibilitou a visualização de subpopulações para essa espécie evidenciando maior diversidade das amostras incluídas.

De maneira diferenciada, esse estudo realizou também a análise de recombinação dos isolados para os 36 cromossomos de *L. infantum* numa abordagem mais aprofundada. Quando cada cromossomo é analisado, percebe-se que alguns isolados podem ser originados de uma ou mais populações ancestrais não evidenciadas na análise de indivíduo. Ou ainda, indivíduos derivados de duas populações como aqueles da Bahia podem possuir cromossomos sem indícios de recombinação (cromossomos 1, 3, 16 e 22) ou serem derivados de outras populações ancestrais não evidenciadas na análise de indivíduo (2, 4, 11, 12, 13, 15, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 29, 31, 33, 34 e 36) e dados semelhantes foram encontrados para isolados das outras regiões.

A presença de uma população ancestral em um cromossomo e não em outro, ou a ocorrência de mais de uma delas em um mesmo cromossomo poderia ser explicado como mais um mecanismo adaptativo e evolutivo dos tripanosomatídeos de forma a conferir maior variabilidade fenotípica e capacidade de adaptação frente a condições adversas reunindo em um mesmo indivíduo as características mais favoráveis de cada população ancestral.

Com as análises realizadas não é possível explicar as hipóteses acima, nem inferir a ocorrência de transferência de material genético ou mesmo a ocorrência de algum nível de reprodução entre esses parasitos. Contudo, alguns grupos de pesquisa têm aventado algumas alternativas genéticas para melhor elucidar os eventos relacionados à plasticidade genômica e variabilidade fenotípica que possibilitam um grande potencial de adaptabilidade desses parasitos no ambiente e em seus hospedeiros assim como os surpreendentes mecanismos evolutivos envolvidos (MACIVER, 2019; ROUGERON; DE MEEÛS; BAÑULS, 2015; STERKERS *et al.*, 2014).

No presente trabalho foi demonstrada a grande variabilidade genética que existe em isolados de *L. infantum* provenientes de espaços geográficos e temporais distintos. Esses dados podem reforçar a ideia de que outros mecanismos evolutivos, além do CCNV e acumulações de mutações no genoma estejam envolvidos. Essa hipótese é corroborada pelos resultados obtidos nas análises de recombinação genômica e cromossomal (Figuras 18-20). A intensificação dos estudos acerca dos mecanismos evolutivos que *Leishmania* spp. utilizam para sua sobrevivência e perpetuação em seus hospedeiros tem tornado a probabilidade de ocorrência de reprodução sexuada nesses parasitos cada vez mais tangível (AKOPYANTS *et al.*, 2009; KELLY *et al.*, 1991; SHAIK *et al.*, 2021).

O isolamento de indivíduos híbridos em amostras de campo tem sido realizado desde o início da década de 1990 quando foi descrita a ocorrência de parasitos com genótipo recombinante de *L. major/L. arabica* cultivados a partir de lesões cutâneas de animais selvagens da Arábia Saudita (KELLY *et al.*, 1991). As análises demonstraram um perfil de heterozigosidade para as isoenzimas avaliadas e as bandas obtidas nos estudos de impressão genética (*DNA fingerprint*) eram condizentes com padrões encontrados nas duas espécies de *Leishmania* sp..

Desde então dados semelhantes têm sido publicados como por RAVEL *et al.* (2006) que identificaram, pela primeira vez, a ocorrência de indivíduos híbridos de *L. infantum* e *L. major* isolados em Portugal a partir de amostras de pacientes imunocomprometidos. Os dados chamam atenção, uma vez que as espécies envolvidas apresentam perfis filogenéticos bastante divergentes.

Em 153 amostras de pacientes com LC provenientes da Guiana Francesa foram isolados *L. (V.) guyanensis* e empregados em um estudo genético populacional. Os resultados demonstraram índices significativos de homozigose e pequenas taxas de *linkage disequilibrium* o que é considerado incompatível com uma reprodução clonal estrita em que

usualmente existe uma tendência a acumulação de heterozigose no genoma ao longo do tempo (ROUGERON *et al.*, 2010, 2011).

Tais análises não foram realizadas nesse trabalho, mas com base na contagem de variantes é possível especular a possível ocorrência de processos reprodutivos sexuados em parasitos como aqueles isolados no RN e Januária, por exemplo, onde foram contabilizadas as maiores taxas de homozigose nas análises (Tabela 4).

A hipótese de que *Leishmania* spp. alterna eventos de replicação clonal com reprodução sexuada também foi aventada sugerindo que esses parasitos possuem um modelo misto de reprodução (ROUGERON *et al.*, 2011). Contudo, alguns autores postulam que a taxa de ocorrência de reprodução sexuada não é frequente o suficiente para abandonar o conceito de replicação clonal (*preponderant clonal evolution* - PCE) (TIBAYRENC; AYALA, 2013). Dessa forma a alternância de processos replicativos seria mais uma estratégia adaptativa desses parasitos, variável com a fase do ciclo biológico ou resposta frente a pressões ambientais sendo que no hospedeiro invertebrado ocorreria tanto a replicação clonal como a endogamia, enquanto que no hospedeiro mamífero ocorreria apenas divisões binárias (ROUGERON *et al.*, 2011; ROUGERON; DE MEEÛS; BAÑULS, 2017).

De fato, eventos de recombinação genética e indícios de reprodução sexuada consistentes com meiose em *L. major* já foram demonstrados no inseto vetor, *Phlebotomus duboscqi* por Akopyants *et al.* (2009). Duas linhagens parentais, cada uma com um gene específico de resistência a drogas foram capazes de gerar indivíduos híbridos resistentes a ambas as drogas. Além disso, o estudo mostrou que os parasitos híbridos foram transmitidos ao hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos (AKOPYANTS *et al.*, 2009).

Os indícios de recombinação genômica em dois isolados de um mesmo paciente do RN (RN2 e RN5) poderia ser decorrente da seleção de populações no hospedeiro mamífero ou a infecção por parasitos resultantes de recombinação sexuada provenientes do inseto vetor.

Corroborando com a análise de *admixture* individual dos isolados e os demais parâmetros de divergência abordados nesse trabalho, os isolados de GV e Januária foram os que apresentaram maiores indícios de recombinação e presença de mais de uma população ancestral reforçada pela avaliação a nível cromossômico. Esse dado fica ainda mais em evidência quando se observa os isolados de SC, pois se num primeiro momento, na análise de genoma total está presente apenas uma população ancestral P3 (Figura 14), nas análises de cromossomo observa-se a ocorrência de mais de uma população sobretudo para os

cromossomos 1, 3 e 6. Isso reitera a ideia da ocorrência de uma população heterogênea ou indícios de reprodução sexuada quando se consideram os aspectos geográficos de Florianópolis.

Tanto GV como Januária são regiões endêmicas tanto para LT em humanos e LV em humanos e cães com condições climáticas e sociais que contribuem para a expansão da doença e perpetuação do parasito.

Em GV foram registrados casos de LVH nos anos de 1960 (Coelho e Falcão, 1966) quando foram adotadas medidas de controle para a doença como tratamento dos doentes com Glucantime, eliminação dos cães soropositivos e aplicação de inseticida e alcançou o nível de “área endêmica controlada” com remissão progressiva dos casos (Magalhães *et al.*, 1980). Com isso, no início dos anos de 1990 o programa foi descontinuado sem a notificação oficial de casos até 2007 (BARATA *et al.*, 2013). Nesse período Malaquias *et al.* (2007) realizaram um estudo com 175 cães da região selecionados randomicamente e desses, 13,70% da área urbana e 12,40% da área rural apresentaram títulos elevados de IgG anti-*Leishmania* pela técnica de ELISA e oito animais foram positivos na cultura de promastigotas isoladas de medula óssea.

Os dados acima demonstraram que, com a interrupção das medidas de controle, houve novamente o aumento de casos em humanos e cães com a reemergência da doença na região, intensificada também, pela urbanização (MALAQUIAS *et al.*, 2007). Pelo histórico de emergência e reemergência e localização geográfica de GV, vários estudos epidemiológicos, ensaios vacinais e para validação de métodos diagnósticos foram conduzidos na região ao longo dos anos (BARATA *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2019; COELHO; FALCÃO, 1966; LEAL *et al.*, 2018; MAGALHAES *et al.*, 1980; MALAQUIAS *et al.*, 2007; MAYRINK *et al.*, 1979; O *et al.*, 1997; VALDIVIA *et al.*, 2017).

Dessa forma, as medidas de intervenção na região como a eutanásia dos animais soropositivos, tratamento dos doentes muitas vezes refratário, fluxo migratório de indivíduos da área urbana para a rural, medidas de intervenção e a suspensão das mesmas nos anos 1990 podem ter possibilitado, ao longo do tempo, a seleção de populações de *Leishmania* que até então não ocorriam na região influenciada pela grande plasticidade genômica desses parasitos corroborados pelas análises realizadas nesse trabalho.

As análises de divergência genômica para Januária evidenciaram variedade intrapopulacional quando comparados os isolados provenientes das regiões rural e urbana e ou ano de coleta. A cidade possui um Centro Avançado de Pesquisa e Tratamento em

Leishmanioses e juntamente com a Universidade Federal de Minas Gerais realizam trabalhos especializados no intuito de prevenir e controlar a doença (PREFEITURA DE JANUÁRIA, 2017). Nesse sentido, um estudo prévio realizado no departamento de Parasitologia/ICB/UFMG por nossos colaboradores avaliou 108 cães do município de Januária sendo 57 deles sabidamente soropositivos, provenientes de área urbana e 51 não testados, provenientes da área rural com 99% de sororreatividade em pelo menos um dos testes sorológicos empregados – DPP, ELISA e RIFI (NUNES, 2020). Nesse estudo também foi realizada uma análise genômica comparativa dos 20 isolados selecionados dentre os cães incluídos no estudo sendo observada a presença de dois *clusters* no PCA e filogenia, sugerindo a ocorrência de duas subpopulações de *L. infantum*.

Esses dados podem ser explicados pela maior disponibilidade de cães como reservatório na área urbana, o maior número de animais errantes e sem cuidado ficando mais expostos ao parasito, pelo trânsito mais intenso de pessoas e pela introdução de cães e imigração de homens infectados provenientes de outras regiões. Todos esses fatores contribuem para a ocorrência de populações variadas de parasitos e a sua necessidade crescente de adaptação. A realização frequente de estudos conduzidos pela UFMG na região e de outros grupos em outras áreas, como do grupo do Dr. Alexandre Reis da UFOP em GV, fornece um painel epidemiológico da leishmaniose mais fidedigno e possibilita a caracterização correta das populações de parasitos que circulam na região.

As análises dos isolados de Florianópolis, SC, resultaram em dados homogêneos tanto para o número de aneuploidias como as análises de variabilidade genética e recombinação que evidenciaram a ocorrência de apenas uma população ancestral a nível genômico. Os primeiros casos de LTA foram descritos em 1987 em um surto ocorrido nos municípios de Coronel Freitas e Quilombo, áreas rurais a cerca de 400km da capital, Florianópolis (THIAGO; GUIDA, 1990). Os primeiros casos autóctones de LVC foram reportados no ano de 2010 e um levantamento sorológico de 2124 animais revelou 29 cães sororreagentes para anticorpos anti-*Leishmania*. A caracterização dos parasitos confirmou a presença de *L. infantum* circulando na região (STEINDEL *et al.*, 2013). Em humanos, o primeiro caso autóctone foi reportado em 2017 e o estado é considerado emergente e controlado para leishmaniose (PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS, 2017).

Através de um estudo empregando microssatélites Pasquali *et al.* (2019) propuseram possíveis rotas de dispersão para *L. infantum* na região Centro-Sul do Brasil sendo que uma delas representa a dispersão do parasito do Paraguai para as cidades do sul do Brasil próximas

às fronteiras triplas entre Argentina-Brasil-Paraguai. Outra hipótese sugere a ocorrência de uma nova rota de dispersão a partir do sudoeste de Santa Catarina suportada pela formação de um *cluster* nas análises de microssatélite (PASQUALI *et al.*, 2019). Em nosso trabalho as análises sugeriram a presença de uma única população ancestral de *L. infantum* originando os oito isolados incluídos, mas a adição de novas amostras, inclusive de outras cidades de SC podem revelar a presença de maior diversidade e complexidade genética nos parasitos que circulam na região do que foi visualizado.

Além disso, apesar da amostragem pouco expressiva dois isolados – SC1008 (cão) e SC1009 (humano) – apresentam demarcada variação intrapopulacional (Figura 13). A cidade constitui uma região endêmica, com clima subtropical influenciado pelos processos de globalização e com elevação crescente nos números de casos de leishmaniose nos últimos anos. A ocorrência de variabilidade nessa região é digna de nota, uma vez que se trata de uma região insular de clima bastante diferente das demais regiões estudadas e em que não ocorre *Lutzomyia longipalpis* como vetor de *Leishmania* spp. Esses aspectos dificultam a inserção de novas populações de parasitos na cidade e a possibilidade de perpetuação de parasitos mais adaptados, coexistência de populações variadas ou mesmo a ocorrência de eventos de recombinação e reprodução sexuada devem ser levadas em consideração.

De maneira geral, as análises de SNPs, *admixture*, CCNV convergiram para uma estreita similaridade das populações de parasitos pertencentes a uma mesma região geográfica, com exceção dos isolados de Januária, nos quais pôde ser observada maior divergência intrapopulacional quando comparadas amostras de área urbana ou rural. É importante destacar que para nenhuma das análises foram encontradas divergências ou similaridades significativas quando correlacionados os sinais clínicos de pacientes ou cães disponíveis ou quando comparados cães e humanos. A ausência de variabilidade genética em parasitos isolados entre esses dois hospedeiros sugere a circulação da mesma população de *L. infantum* entre eles, o que é esperado, uma vez que existe uma relação de proximidade entre humanos e cães e esses são considerados os reservatórios urbanos do parasito (BANETH *et al.*, 2008; DANTAS-TORRES, 2007; DEN BOER *et al.*, 2011).

Também é importante levar em consideração que isolados provenientes de regiões geográficas distintas estão submetidos a condições ambientais diferentes, como medidas de combate ao vetor, tratamento dos doentes e manejo de reservatórios. Além disso, os estudos de genômica comparativa encontrados na literatura analisam amostras de humanos. Esse

estudo realizou uma abordagem inovadora ao analisar 69 isolados de *L. infantum* oriundos de cães naturalmente infectados.

Ainda, para além disso, com a execução das análises referentes ao segundo capítulo desse trabalho foi possível demonstrar a ocorrência de quadros de infecção atípica por *Leishmania* spp. em cães naturalmente infectados provenientes de regiões endêmicas para LVC. Esses resultados demonstram a plasticidade genômica que esses parasitos possuem ao se adaptar a diferentes hospedeiros e circunstâncias ambientais. Através de técnicas moleculares e o uso de biomarcadores subespécie-específicos, o presente trabalho detectou gDNA de parasitos do subgênero *Viannia* em medula óssea de um cão assintomático que foi confirmado através de sequenciamento pela técnica de Sanger. Esse resultado demonstra a ocorrência de espécies dermatotrópicas com o potencial de visceralização em áreas endêmicas para LVC.

Da mesma forma resultados semelhantes foram encontrados por Marquez *et al.* (2017) utilizando o mesmo par de iniciadores para subgênero *Viannia* em medula óssea de 7/8 cães testados provenientes do Paraná. Esse mesmo estudo evidenciou o encontro desse subgênero em amostras de baço, pele íntegra, sangue periférico, fígado, linfonodo e pele com lesões ativas (MARQUEZ *et al.*, 2017). Carvalho *et al.* (2015) detectaram 54,72% (226/413) de positividade para o subgênero *Viannia* em cães da Bahia, porém utilizando amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Além de *L. braziliensis*, outras espécies já foram detectadas em sítios de infecção atípicos, como *L. amazonensis* em diferentes tecidos (DIAS *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2015; TOLEZANO *et al.*, 2007; VALDIVIA *et al.*, 2017). Esse parasito não foi detectado nesse estudo, mas já foram encontrados dois cães positivos em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa em Governador Valadares, região mineira endêmica para LVC (VALDIVIA *et al.*, 2017). Os parasitos foram isolados a partir de amostras de linfonodo de animais com sinais clínicos de LVC, caracterizados como pertencentes ao complexo *L. mexicana* e a presença de *L. amazonensis* confirmada por sequenciando do genoma total (*next generation sequencing*).

A caracterização das amostras de São Joaquim de Bicas e de Betim, também demonstrou a ocorrência de coinfeção por mais de uma espécie de *Leishmania* em quatro dos animais estudados. Em todos eles foram analisadas amostras de medula óssea e detectados *amplicons* com pares de bases equivalentes aos dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, simultaneamente, no mesmo tecido. O sequenciamento desses *amplicons* pela técnica de

Sanger em três dos animais, demonstrou 100% de identidade com *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente. Sanches *et al.* (2016) também encontraram duas espécies de parasito, *L. amazonensis* e *L. infantum*, concomitantemente, em amostras de sangue periférico de 9/154 cães avaliados, oriundos de Bauru, São Paulo, através de PCR-RFLP.

Além da ocorrência de coinfeção já foram identificados casos de infecção mista em que, em um mesmo indivíduo pode ocorrer LT e LV simultaneamente. Pires *et al.* (2014) detectaram através de PCR-RFLP, *L. braziliensis* em biopsia de peles lesionadas e *L. infantum* em fragmentos de baço de dois dos cães incluídos no estudo conduzido no Rio de Janeiro. Resultado semelhante foi publicado por Madeira *et al.* (2005) ao também encontrar um cão com padrão de infecção mista na mesma cidade. Através de PCR e hibridização molecular foi possível identificar *L. braziliensis* em fragmento de lesão cutânea e *L. infantum* em PBMC e linfonodo caracterizando um caso autóctone de LT e LV em um mesmo animal.

De acordo com os resultados encontrados nesse estudo e com os trabalhos científicos da literatura é possível observar que casos de infecção atípica têm ocorrido de maneira mais frequente e com padrões de infecção variados demonstrando a necessidade da realização de um diagnóstico espécie-específico, além de estudos adicionais que elucidem de maneira mais exata o comportamento desses parasitos quando presentes em sítios de infecção atípicos no organismo do hospedeiro, assim como as interações entre parasito e sistema imune do indivíduo infectado.

Também é necessário compreender o papel real dos cães como reservatório de outras espécies que não *L. infantum* para direcionar mais adequadamente o diagnóstico, tratamento e, sobretudo o controle, elucidando a real importância e eficácia de medidas como a eutanásia.

11. CONCLUSÃO

Através das análises realizadas no primeiro capítulo pôde-se observar que isolados de *L. infantum* derivados de diferentes áreas geográficas possuem grande variação intraespecífica, apresentando um padrão de agrupamento por área endêmica. Esses dados estão bem demarcados para isolados provenientes de Januária e GV. Ainda, como observado em um estudo prévio do nosso grupo (Valdivia *et al.*, em preparação), detectou-se uma mudança temporal dos genótipos de *L. infantum* em Governador Valadares. As outras regiões estudadas, Bahia, RN e SC, apresentam menor variabilidade intrapopulacional, com exceção de dois isolados de SC.

Para as amostras estudadas existe um padrão de aneuploidia evidente, sobretudo para os isolados de GV e aqueles da área urbana de Januária. A análise de ontologia gênica dos cromossomos predominantemente poliploides demonstra que os genes presentes nestes cromossomos estão relacionados a funções de sobrevivência e manutenção do parasito na célula hospedeira e fatores de patogenia e virulência.

As análises de estimativa de ancestralidade apontam para a ocorrência de uma ou mais populações ancestrais influenciando a variabilidade genômica dos isolados estudados. Esse evento aponta ainda, para a coexistência de várias populações de parasitos em uma mesma região que podem estar relacionadas à influência antroponótica no *habitat* natural dos parasitos e seus hospedeiros e a consequente adaptação frente a condições de estresse ambiental e ao processo de urbanização que propiciam um aumento do fluxo migratório de homens e animais de uma região a outra. Além disso, a divergência marcante que existe entre parasitos, sobretudo de uma mesma região geográfica evidenciados principalmente pelas análises de recombinação podem sugerir a ocorrência, também, de replicação não clonal entre esses parasitos.

Dessa forma, conclui-se que fatores geográficos e temporais podem influenciar em eventos correlacionados à variabilidade genômica de *L. infantum* e a grande plasticidade genômica desses parasitos possibilita a emergência de novas populações mais adaptadas e resistentes ao longo do tempo.

Os dados aqui apresentados podem ser futuramente empregados no desenvolvimento de novos marcadores moleculares a serem utilizados na caracterização de subpopulações de

Leishmania que circulam em condições naturais. Ainda, a detecção de genes sob pressão seletiva positiva pode propiciar o desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos.

O segundo capítulo apresentou resultados obtidos durante atividades a campo na região metropolitana de Belo Horizonte sendo possível demonstrar a presença de animais com sinais clínicos de LV coinfectados com mais de uma espécie de *Leishmania* spp., assim como a ocorrência de *L. braziliensis*, uma espécie dermatotrópica em medula óssea de um cão assintomático. Esses dados indicam a ocorrência de casos atípicos de infecção em regiões endêmicas para LVC.

Dessa forma, torna-se necessário a intensificação dos estudos nesse sentido que podem contribuir para uma melhor compreensão do comportamento adaptativo e biológico desses parasitos, no correto levantamento de dados epidemiológicos referentes às espécies de *Leishmania* que ocorrem em uma determinada região e, principalmente para o desenvolvimento de um diagnóstico espécie-específico que pode influenciar diretamente e implicar em alterações nas medidas de controle, tratamento e diagnóstico, até então preconizados e praticados.

12. PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram a existência de variabilidade genômica entre isolados de regiões geográficas distintas, assim como a ocorrência de uma variação temporal. Além disso, a ocorrência de infecções atípicas em cães naturalmente infectados foi detectada.

Dessa forma, a intensificação dos estudos pode contribuir para uma melhor compreensão do comportamento adaptativo e biológico desses parasitos.

Nas próximas etapas desse trabalho pretende-se:

- Sequenciar isolados previamente obtidos de SJB e de animais atendidos em um hospital veterinário de Belo Horizonte e inclui-las na análise genômica comparativa;
- Incluir novos isolados do Brasil e de outros países da América Latina;
- Incluir isolados obtidos de lesões de pacientes humanos com leishmaniose tegumentar provenientes de Roraima e acessar possíveis influências que a imigração de cidadãos venezuelanos para o estado pode desencadear (introdução de novas populações de *Leishmania* spp. no Brasil);
- Investigar a ocorrência de infecções atípicas em cães naturalmente infectados provenientes de regiões endêmicas para a LV;
- Padronizar e validar um painel de biomarcadores espécie-específicos em uma plataforma *multiplex* de PCR convencional a ser empregado em amostras de campo de cães e clínicas de pacientes com LV e LTA (painel já validado *in vitro*);
- Padronizar e validar um painel de potenciais marcadores para caracterização de subpopulações de *Leishmania* em amostras de campo e amostras clínicas;

- Selecionar potenciais alvos gênicos em seleção positiva na população analisada como potenciais alvos terapêuticos;

- Analisar a variabilidade dos antígenos usado nos testes diagnósticos atualmente utilizados na rotina clínica veterinária e testa-los contra as sequencias de aminoácidos dos isolados estudados.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A.; LIVELY, C. M. Infection genetics: Gene-for-gene versus matching-alleles models and all points in between. **Evolutionary Ecology Research**, v. 4, n. 1, p. 79–90, 2002.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies (A.-L. Bañuls, Ed.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 3 mar. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004349>>
- AKOPYANTS, N. S. *et al.* Demonstration of Genetic Exchange During Cyclical Development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 265–268, 10 abr. 2009.
- ALEXANDER, D. H.; NOVEMBRE, J.; LANGE, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1655–1664, 2009.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, jul. 2008.
- BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: Comparative findings and serology. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017.
- BARATA, R. A. *et al.* Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in a Reemerging Focus of Intense Transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–6, 2013.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* [Immunology of cutaneous leishmaniasis]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 3, p. 173–91, 1986.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, ago. 2007.
- BATESON, P. Adaptability and evolution. **Interface Focus**, v. 7, n. 5, p. 20160126, 6 out. 2017.

- BOITE, M. C. *et al.* Polymorphisms and ambiguous sites present in DNA sequences of *Leishmania* clones: Looking closer. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 110–116, jul. 2014.
- BOITÉ, M. C. *et al.* New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (*Viannia*) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.
- BORGES, L. F. N. M. *et al.* Prevalência e distribuição espacial da leishmaniose visceral em cães do município de Juatuba, Minas Gerais, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 44, p. 352–357, 2014.
- BRITTO, C. *et al.* Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v. 222, n. 1, p. 107–117, 5 nov. 1998.
- BROTHERTON, M.-C. *et al.* Proteomic and Genomic Analyses of Antimony Resistant *Leishmania infantum* Mutant. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e81899, 27 nov. 2013.
- BRUHN, F. R. P. *et al.* Spatial and temporal relationships between human and canine visceral leishmaniases in Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006–2013. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 372, 28 dez. 2018.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018.
- BUSSOTTI, G. *et al.* *Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification. **mBio**, v. 9, n. 6, 6 nov. 2018.
- CAMARGO-NEVES, V. L. F. DE *et al.* Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1263–1267, 2001.
- CARDOSO, M. S. *et al.* Detection of multiple circulating *Leishmania* species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0211831, 5 fev. 2019.

- CARNIELLI, J. B. T. *et al.* A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBioMedicine**, v. 36, p. 83–91, out. 2018.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the Bone Marrow in a Case of American Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 4, p. 732–734, 1 jul. 1986.
- CARVALHO, F. S. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* in dogs in Brazil: Epidemiology, co-infection, and clinical aspects. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 12062–12073, 2015.
- CARVALHO, K. S. S. *et al.* Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of *Leishmania infantum* isolates in Middle-North Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12321, 23 dez. 2020.
- CASTILHO-MARTINS, E. A. *et al.* Axenic *Leishmania amazonensis* Promastigotes Sense both the External and Internal Arginine Pool Distinctly Regulating the Two Transporter-Coding Genes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27818, 16 nov. 2011.
- CHAUHAN, I. S. *et al.* Evolutionary comparison of prenylation pathway in kinetoplastid *Leishmania* and its sister *Leptomonas*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, p. 261, 21 dez. 2015.
- CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 8 abr. 2010.
- COELHO, M.; FALCÃO, A. Aspectos epidemiológicos do calazar em Minas Gerais. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 10(1), p. 259–262, 1966.
- COSTA-VAL, A. P. DA *et al.* Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 2, 2020.
- COTTON, J. A. *et al.* Genomic analysis of natural intra-specific hybrids among Ethiopian isolates of *Leishmania donovani*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007143, 20 abr. 2020.
- DANECEK, P. *et al.* The variant call format and VCFtools. **Bioinformatics**, v. 27, n. 15, p. 2156–2158, 1 ago. 2011.

- DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117–118, fev. 2006.
- DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 139–146, nov. 2007.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 313–317, jun. 2010.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531–538, 2012.
- DANTAS-TORRES, F. *et al.* Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 195, 21 dez. 2020.
- DARLYUK, I. *et al.* Arginine Homeostasis and Transport in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 30, p. 19800–19807, 24 jul. 2009.
- DE MEEÛS, T. *et al.* Population genetics and molecular epidemiology or how to “débusquer la bête”. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 308–332, mar. 2007.
- DEN BOER, M. *et al.* Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1471–1477, 2011.
- DESJEUX, P. Focus: Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 692–692, 1 set. 2004.
- DESSIMOZ, C.; WALKER, J. M. **The Gene Ontology Handbook IN Series Editor**. [s.l: s.n.].
- DHOM-LEMOS, L. *et al.* *Leishmania infantum* recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR): A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0211719, 31 jan. 2019.
- DIAS, E. S. *et al.* Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2–3, p. 101–111, 2011.

- DINIZ, S. A. *et al.* Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 01, p. 24–33, 1 fev. 2008.
- DOWNING, T. *et al.* Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2143–2156, 1 dez. 2011.
- DUMETZ, F. *et al.* Modulation of Aneuploidy in *Leishmania donovani* during Adaptation to Different *In Vitro* and *In Vivo* Environments and Its Impact on Gene Expression. **mBio**, v. 8, n. 3, p. 1–14, 5 jul. 2017.
- FALQUETO, A. *et al.* Cross-sectional and longitudinal epidemiologic surveys of human and canine *Leishmania infantum* visceral infections in an endemic rural area of southeast Brazil (Pancas, Espírito Santo). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 4, p. 559–65, abr. 2009.
- FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A. *et al.* The *Leishmania donovani* species complex: A new insight into taxonomy. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 13, p. 1079–1088, nov. 2020.
- FERREIRA, E. DE C. *et al.* Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 71, 20 dez. 2015.
- FIGUEIREDO DE SÁ, B. S. L. *et al.* Identification of divergent *Leishmania (Viannia) braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through whole genome analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007382, 6 jun. 2019.
- FIGUEREDO, L. A. *et al.* Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 21, n. 4, p. 418–20, 2012.
- FLANNERY, A. R.; RENBERG, R. L.; ANDREWS, N. W. Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 716–721, dez. 2013.
- FRAGA, J. *et al.* Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 238–245, mar. 2010.

- FRAGA, J. *et al.* Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 229–237, ago. 2013.
- FRANSSEN, S. U. *et al.* Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. **eLife**, v. 9, 25 mar. 2020.
- GAGE, K. L. *et al.* Climate and Vectorborne Diseases. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 35, n. 5, p. 436–450, nov. 2008.
- GARNIER-GÉRÉ, P.; CHIKHI, L. Population Subdivision, Hardy-Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. In: **eLS**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
- GARRISON, E.; MARTH, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. p. 1–9, 17 jul. 2012.
- GOSCH, C. S. *et al.* Case Report: Atypical Cutaneous Leishmaniasis in a Patient with Mixed *Leishmania guyanensis* and *Leishmania amazonensis* Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 5, p. 1165–1169, 7 nov. 2018.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, 2005.
- GREWAL, J. S. *et al.* Evaluation of clan CD C11 peptidase PNT1 and other *Leishmania mexicana* cysteine peptidases as potential drug targets. **Biochimie**, v. 166, p. 150–160, nov. 2019.
- GUINDON, S. *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, 29 mar. 2010.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696–704, 2003.
- GULDEMIR, D.; USLUCA, S.; NALBANTOGLU, A. S. Genome Sequencing of *Leishmania infantum* Causing Cutaneous Leishmaniasis from a Turkish Isolate with Next-Generation Sequencing Technology. **Acta Parasitologica**, n. 0123456789, 2020.
- GUTIÉRREZ, V. *et al.* New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. **Chem. Soc. Rev.**, p. 152–168, 2015.

- HENDRY, A. P.; GOTANDA, K. M.; SVENSSON, E. I. Human influences on evolution, and the ecological and societal consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1712, p. 20160028, 19 jan. 2017.
- HERNÁNDEZ, D. *et al.* *Leishmania braziliensis* causing visceral leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus infection, identified with the aid of the polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 627–628, 1993.
- HIBBS, J. B.; REED, S. S.; EVANS, T. G. Nitric Oxide Production in Murine Leishmaniasis: Correlation of Progressive Infection with Increasing Systemic Synthesis of Nitric Oxide. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 5, p. 486–489, 1 maio 1996.
- HUYNH, C.; ANDREWS, N. W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 293–300, 9 dez. 2007.
- HUYNH, C.; SACKS, D. L.; ANDREWS, N. W. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2363–2375, 2 out. 2006.
- IBRAHIM, M. E.; BARKER, D. C. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 61–68, jul. 2001.
- IMAMURA, H. *et al.* Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **eLife**, v. 5, 22 mar. 2016.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 19 jul. 2019.
- KAYE, P. M.; BEATTIE, L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 249–260, 2016.
- KELLY, J. M. *et al.* Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 253–263, jun. 1991.
- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.

- KUHLS, K. *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, n. 3, p. 334–343, mar. 2007.
- KUMAR, P. *et al.* Gene expression modulation and the molecular mechanisms involved in Nelfinavir resistance in *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Molecular Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 565–582, ago. 2013.
- LACHAUD, L. *et al.* Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 1, p. 61–66, 2014.
- LAFFITTE, M.-C. N. *et al.* Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**, v. 5, p. 2350, 20 set. 2016.
- LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421–4, 1987.
- LEAL, G. G. DE A. *et al.* Risk profile for *Leishmania* infection in dogs coming from an area of visceral leishmaniasis reemergence. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 150, n. November 2017, p. 1–7, 2018.
- LI, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 26, n. 5, p. 589–595, 1 mar. 2010.
- LOPEZ, M. *et al.* Diagnosis of *Leishmania* Using the Polymerase Chain Reaction: a Simplified Procedure for Field Work. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 3, p. 348–356, 1 set. 1993.
- LUKEŠ, J. *et al.* Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115–122, jul. 2014.
- LYRA, M. R. *et al.* First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 451–4, 2015.
- MACIVER, S. K. Ancestral Eukaryotes Reproduced Asexually, Facilitated by Polyploidy: A Hypothesis. **BioEssays**, v. 41, n. 12, p. 1900152, 31 dez. 2019.

- MADEIRA, M. F. *et al.* Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442–445, 2006.
- MAGALHAES, P. *et al.* Calazar na Zona do Rio Doce – Minas Gerais: resultados de medidas profiláticas. **Rev Inst Med Trop**, v. 22(4), p. 197–202, 1980.
- MAJUMDER, S. *et al.* *Leishmania*-Induced Biphasic Ceramide Generation in Macrophages Is Crucial for Uptake and Survival of the Parasite. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 10, p. 1607–1616, 15 maio 2012.
- MALAQUIAS, L. C. C. *et al.* Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 233–239, 29 jan. 2007.
- MANNAERT, A. *et al.* Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 370–376, set. 2012.
- MARQUEZ, E. DE S. *et al.* Cutaneous leishmaniosis in naturally infected dogs in Paraná, Brazil, and the epidemiological implications of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detection in internal organs and intact skin. **Veterinary Parasitology**, v. 243, n. June, p. 219–225, ago. 2017.
- MAURÍCIO, I. L. *Leishmania* Taxonomy. In: **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 15–30.
- MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188–189, maio 2000.
- MAYRINK, W. *et al.* Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 73, n. 2, p. 123–137, 24 abr. 1979.
- MCKENNA, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1297–1303, 1 set. 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. [s.l: s.n.].

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde - volume 3**. [s.l.: s.n.]. v. 3
- MOMEN, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 583–588, ago. 2000.
- NOYES, H. Implications of a Neotropical Origin of the Genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 657–662, set. 1998.
- NUNES, R. V. **Diversidade genômica de *Leishmania infantum* isolados de cães naturalmente infectados no município de Januária, Minas Gerais, Brasil**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.
- O, G. *et al.* Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. **Acta Parasitol Turcica**, v. 21(I), p. 93, 1997.
- OLIVEIRA NETO, M. P. *et al.* Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 303–309, 1986a.
- OLIVEIRA NETO, M. P. *et al.* Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 80, n. 6, p. 587–92, dez. 1986b.
- ORREGO, L. M. *et al.* Heme synthesis through the life cycle of the heme auxotrophic parasite *Leishmania major*. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 13367–13385, dez. 2019.
- ORTUÑO, M. *et al.* Genetic diversity and phylogenetic relationships between *Leishmania infantum* from dogs, humans and wildlife in south-east Spain. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 8, p. 961–973, 11 dez. 2019.
- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339–345, jul. 2013.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10–S18, nov. 2014.
- PAHO/WHO. **LEISHMANIASIS: Epidemiological Report of the Americas**. [s.l.: s.n.].
- PASQUALI, A. K. S. *et al.* Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1–20, 2019.

- PATINO, L. H. *et al.* Genomic analyses reveal moderate levels of ploidy, high heterozygosity and structural variations in a Colombian isolate of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 203, p. 105296, mar. 2020.
- PERROTEY, S. *et al.* Postglacial dispersal of *Phlebotomus perniciosus* into France. **Parasite**, v. 12, n. 4, p. 283–291, 15 dez. 2005.
- PIRES, M. Q. *et al.* Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: Evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 243–246, 2014.
- POMBI, M. *et al.* Molecular detection of *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* in human blood and *Leishmania (Leishmania) infantum* in *Sergentomyia minuta*: unexpected host-parasite contacts. **Medical and Veterinary Entomology**, 24 jul. 2020.
- POPLIN, R. *et al.* Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. **bioRxiv**, p. 1–22, 2017.
- PRATAP SINGH, K. *et al.* Reactive oxygen species regulates expression of iron–sulfur cluster assembly protein IscS of *Leishmania donovani*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, p. 195–209, out. 2014.
- PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS. **Capital registra primeiro caso de leishmaniose visceral humana.**
- PREFEITURA DE JANUÁRIA. **Pesquisa em Leishmaniose.** Disponível em: <<https://januaria.mg.gov.br/site/tag/pesquisa-em-leishmaniose/>>.
- PRIETO BARJA, P. *et al.* Haplotype selection as an adaptive mechanism in the protozoan pathogen *Leishmania donovani*. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 12, p. 1961–1969, 6 dez. 2017.
- PUCADYIL, T. J. *et al.* Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 145–152, fev. 2004.
- PURCELL, S. *et al.* PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, set. 2007.

- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, 2009.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **Foundation for Statistical Computing**, v. 10, n. 1, p. 1–16, jan. 2019.
- RAMEZANKHANI, R. *et al.* Climate and environmental factors affecting the incidence of cutaneous leishmaniasis in Isfahan, Iran. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–11, 2018.
- RASTROJO, A. *et al.* Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 246–264, ago. 2018.
- RAVEL, C. *et al.* First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 13, p. 1383–1388, nov. 2006.
- REIS-CUNHA, J. L. *et al.* Whole genome sequencing of *Trypanosoma cruzi* field isolates reveals extensive genomic variability and complex aneuploidy patterns within TcII DTU. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 816, 13 dez. 2018.
- REITHINGER, R. *et al.* Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 2, p. 748–51, fev. 2000.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, set. 2007.
- RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral canina: aspectos de tratamento e controle. **Clínica Veterinária**, p. 66–76, 2007.
- ROGERS, M. B. *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 1 dez. 2011.
- ROUGERON, V. *et al.* A battery of 12 microsatellite markers for genetic analysis of the *Leishmania (Viannia) guyanensis* complex. **Parasitology**, v. 137, n. 13, p. 1879–1884, 7 nov. 2010.

- ROUGERON, V. *et al.* Reproductive strategies and population structure in *Leishmania*: substantial amount of sex in *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 15, p. 3116–3127, ago. 2011.
- ROUGERON, V.; DE MEEÛS, T.; BAÑULS, A.-L. A primer for *Leishmania* population genetic studies. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 52–59, fev. 2015.
- ROUGERON, V.; DE MEEÛS, T.; BAÑULS, A.-L. Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic exchange. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 50, p. 128–132, jun. 2017.
- SALLOUM, T. *et al.* Expanded genome-wide comparisons give novel insights into population structure and genetic heterogeneity of *Leishmania tropica* complex. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008684, 18 set. 2020.
- SANCHES, L. C. *et al.* Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 25, n. 4, p. 465–469, 2016.
- SANTOS, F. J. A. *et al.* First Report of Canine Infection by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 22, p. 8488, 16 nov. 2020.
- SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 466–469, out. 2010.
- SCHWABL, P. *et al.* Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 139, 29 dez. 2021.
- SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 80–81, jan. 2020.
- SHAIK, J. S. *et al.* *Leishmania* Sexual Reproductive Strategies as Resolved through Computational Methods Designed for Aneuploid Genomes. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 167, 26 jan. 2021.
- SHAKED-MISHAN, P. *et al.* A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 30–38, abr. 2006.

- SHAW, C. D. *et al.* Genomic and Metabolomic Polymorphism among Experimentally Selected Paromomycin-Resistant *Leishmania donovani* Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 1, 28 out. 2019.
- SHAW, J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 1, p. 123–128, mar. 1997.
- SINHA, R. *et al.* Genome Plasticity in Cultured *Leishmania donovani*: Comparison of Early and Late Passages. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 3 jul. 2018.
- SOUMYA, N. *et al.* Functional analysis of an AMP forming acetyl CoA synthetase from *Leishmania donovani* by gene overexpression and targeted gene disruption approaches. **Parasitology International**, v. 66, n. 1, p. 992–1002, fev. 2017.
- STEINDEL, M. *et al.* Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 490–496, abr. 2013.
- STERKERS, Y. *et al.* FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 274–283, fev. 2011.
- STERKERS, Y. *et al.* Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 15–23, out. 2012.
- STERKERS, Y. *et al.* Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 429–435, set. 2014.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 dez. 2017.
- TEIXEIRA, D. G. *et al.* Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 10–11, p. 655–665, set. 2017.
- TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis : is it time to change strategies ? v. 52, n. 3, p. 287–292, 1995.
- THIAGO, P. DE T. S.; GUIDA, U. Leishmaniose tegumentar no Oeste do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 4, p. 201–203, dez. 1990.

- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 264–269, jun. 2013.
- TIMENETSKY, J. *et al.* Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 907–914, jul. 2006.
- TOLEZANO, J. E. *et al.* The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 280–284, 2007.
- TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 750, 2017.
- TRÜEB, I. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in Northeast Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 1, p. 76–84, jan. 2018.
- TUON, F. F.; AMATO NETO, V.; SABBAGA AMATO, V. *Leishmania* : origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 158–166, nov. 2008.
- UBEDA, J.-M. *et al.* Genome-Wide Stochastic Adaptive DNA Amplification at Direct and Inverted DNA Repeats in the Parasite *Leishmania*. **PLoS Biology**, v. 12, n. 5, p. e1001868, 20 maio 2014.
- URREA, D. A. *et al.* Genomic Analysis of Colombian *Leishmania panamensis* strains with different level of virulence. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17336, 26 dez. 2018.
- VALDERRAMA, A.; TAVARES, M. G.; ANDRADE-FILHO, J. D. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sand fly species (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vectors of Cutaneous Leishmaniasis in Panama. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 1024–1031, 2011.
- VALDIVIA, H. O. *et al.* Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 715, 18 dez. 2015.
- VALDIVIA, H. O. *et al.* Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–11, 2017.

- VEASEY, J. V. *et al.* Identification of *Leishmania* species by high-resolution DNA dissociation in cases of American cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 95, n. 4, p. 459–468, jul. 2020.
- VOLF, P.; PECKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 91–92, 2010.
- WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 1 maio 2009.
- WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **Who Report on Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 191, 2015.
- WILLIAMS, R. A. M.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. Distinct Roles in Autophagy and Importance in Infectivity of the Two ATG4 Cysteine Peptidases of *Leishmania major*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 5, p. 3678–3690, fev. 2013.
- WINCKER, P. *et al.* The *Leishmania* Genome Comprises 36 Chromosomes Conserved Across Widely Divergent Human Pathogenic Species. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 9, p. 1688–1694, 1 maio 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **The weekly epidemiological record**, v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017.
- ZACKAY, A. *et al.* Genome wide comparison of Ethiopian *Leishmania donovani* strains reveals differences potentially related to parasite survival. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 1, p. e1007133, 9 jan. 2018.
- ZHANG, O. *et al.* Degradation of Host Sphingomyelin Is Essential for *Leishmania* Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 12, p. e1000692, 11 dez. 2009.
- ZHANG, W. W. *et al.* Genetic Analysis of *Leishmania donovani* Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004244, 3 jul. 2014.
- ZHARKIKH, A. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 315–329, 1994.

14. ANEXOS

ANEXO 1. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 8 quanto ao BP

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adjustedfisherElim
GO:0019538	protein metabolic process	750	18	10.75	0.30
GO:0072593	reactive oxygen species metabolic process	12	2	0.17	0.03
GO:0001816	cytokine production	1	1	0.01	0.03
GO:0001817	regulation of cytokine production	1	1	0.01	0.03
GO:0006684	sphingomyelin metabolic process	1	1	0.01	0.03
GO:0006685	sphingomyelin catabolic process	1	1	0.01	0.03
GO:0006809	nitric oxide biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:0009268	response to pH	1	1	0.01	0.03
GO:0010447	response to acidic pH	1	1	0.01	0.03
GO:0030149	sphingolipid catabolic process	1	1	0.01	0.03
GO:0032640	tumor necrosis factor production	1	1	0.01	0.03
GO:0032680	regulation of tumor necrosis factor production	1	1	0.01	0.03
GO:0042035	regulation of cytokine biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:0042089	cytokine biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:0042107	cytokine metabolic process	1	1	0.01	0.03
GO:0042533	tumor necrosis factor biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:0042534	regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:0045428	regulation of nitric oxide biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:0046209	nitric oxide metabolic process	1	1	0.01	0.03
GO:0046466	membrane lipid catabolic process	1	1	0.01	0.03
GO:0071467	cellular response to pH	1	1	0.01	0.03
GO:0071468	cellular response to acidic pH	1	1	0.01	0.03
GO:0071706	tumor necrosis factor superfamily cytokine production	1	1	0.01	0.03
GO:1903409	reactive oxygen species biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:1903426	regulation of reactive oxygen species biosynthetic process	1	1	0.01	0.03
GO:1903555	regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	1	1	0.01	0.03
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	900	19	12.9	0.41
GO:0001775	cell activation	2	1	0.03	0.03
GO:0002274	myeloid leukocyte activation	2	1	0.03	0.03
GO:0002376	immune system process	2	1	0.03	0.03
GO:0006665	sphingolipid metabolic process	2	1	0.03	0.03
GO:0006672	ceramide metabolic process	2	1	0.03	0.03
GO:0009395	phospholipid catabolic process	2	1	0.03	0.03
GO:0030148	sphingolipid biosynthetic process	2	1	0.03	0.03
GO:0032501	multicellular organismal process	2	1	0.03	0.03
GO:0042116	macrophage activation	2	1	0.03	0.03
GO:0045321	leukocyte activation	2	1	0.03	0.03
GO:0046513	ceramide biosynthetic process	2	1	0.03	0.03
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	2	1	0.03	0.03
GO:2001057	reactive nitrogen species metabolic process	2	1	0.03	0.03
GO:0006465	signal peptide processing	3	1	0.04	0.04
GO:0042136	neurotransmitter biosynthetic process	3	1	0.04	0.04
GO:0044242	cellular lipid catabolic process	3	1	0.04	0.04
GO:0071214	cellular response to abiotic stimulus	3	1	0.04	0.04
GO:0104004	cellular response to environmental stimulus	3	1	0.04	0.04
GO:1900864	mitochondrial RNA modification	3	1	0.04	0.04

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 2. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 8 quanto ao CC

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adjustedfisherElim
GO:0005850	eukaryotic translation initiation factor 2 complex	2	1	0.02	<i>0.03</i>
GO:0030123	AP-3 adaptor complex	2	1	0.02	<i>0.03</i>
GO:0000145	exocyst	4	1	0.04	<i>0.04</i>

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 3. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 8 quanto a MF

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adjustedfisherElim
GO:0070011	peptidase activity, acting on L-amino activity	144	9	1.97	0.49
GO:0004175	endopeptidase activity	92	7	1.26	1.00
GO:0140096	catalytic activity, acting on a protein	440	15	6.02	0.15
GO:0004749	ribose phosphate diphosphokinase activity	4	2	0.05	<i>0.01</i>
GO:0016778	diphosphotransferase activity	5	2	0.07	1.00
GO:0004767	sphingomyelin phosphodiesterase activity	1	1	0.01	<i>0.04</i>
GO:0003887	DNA-directed DNA polymerase activity	16	2	0.22	<i>0.04</i>
GO:0034061	DNA polymerase activity	17	2	0.23	<i>0.04</i>

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 4. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 23 quanto ao BP

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adustfisherElim
GO:0006083	acetate metabolic process	2	2	0.04	1.0
GO:0006085	acetyl-CoA biosynthetic process	2	2	0.04	1.0
GO:0019427	acetyl-CoA biosynthetic process from acetate	2	2	0.04	0.01
GO:0035384	thioester biosynthetic process	2	2	0.04	1.0
GO:0071616	acyl-CoA biosynthetic process	2	2	0.04	1.0
GO:0006084	acetyl-CoA metabolic process	4	2	0.08	1.0
GO:0006637	acyl-CoA metabolic process	4	2	0.08	1.0
GO:0035383	thioester metabolic process	4	2	0.08	1.0
GO:0016999	antibiotic metabolic process	15	3	0.31	0.37
GO:0033866	nucleoside bisphosphate biosynthetic process	6	2	0.12	1.0
GO:0034030	ribonucleoside bisphosphate biosynthetic process	6	2	0.12	1.0
GO:0034033	purine nucleoside bisphosphate biosynthetic process	6	2	0.12	1.0
GO:0006812	cation transport	67	5	1.37	0.08
GO:0033865	nucleoside bisphosphate metabolic process	9	2	0.18	1.0
GO:0033875	ribonucleoside bisphosphate metabolic process	9	2	0.18	1.0
GO:0034032	purine nucleoside bisphosphate metabolic process	9	2	0.18	1.0
GO:0038203	TORC2 signaling	1	1	0.02	0.08
GO:0048033	heme o metabolic process	1	1	0.02	0.08
GO:0048034	heme O biosynthetic process	1	1	0.02	0.08
GO:1902600	proton transmembrane transport	30	3	0.61	0.08
GO:0015672	monovalent inorganic cation transport	34	3	0.69	0.08
GO:0098660	inorganic ion transmembrane transport	34	3	0.69	0.08
GO:0098662	inorganic cation transmembrane transport	34	3	0.69	0.08
GO:0055085	transmembrane transport	153	7	3.12	0.08
GO:0018193	peptidyl-amino acid modification	35	3	0.71	0.08
GO:0098655	cation transmembrane transport	37	3	0.76	0.08
GO:0000460	maturation of 5.8S rRNA	2	1	0.04	0.08
GO:0043007	maintenance of rDNA	2	1	0.04	0.08
GO:0043570	maintenance of DNA repeat elements	2	1	0.04	0.08
GO:0006810	transport	347	12	7.08	0.08
GO:0051234	establishment of localization	348	12	7.11	0.08
GO:0000413	protein peptidyl-prolyl isomerization	17	2	0.35	0.08
GO:0018208	peptidyl-proline modification	17	2	0.35	0.08
GO:0006811	ion transport	98	5	2	0.08

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em **itálico** representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 5. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 23 quanto ao CC

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adustfisherElim
GO:0033176	proton-transporting V-type ATPase complex	14	3	0.24	0.11
GO:0044437	vacuolar part	5	2	0.09	<i>0.04</i>
GO:0033179	proton-transporting V-type ATPase, V0 domain	8	2	0.14	<i>0.04</i>
GO:0016469	proton-transporting two-sector ATPase complex	27	3	0.47	0.29
GO:0005730	nucleolus	11	2	0.19	<i>0.04</i>
GO:0000177	cytoplasmic exosome (RNase complex)	1	1	0.02	<i>0.04</i>
GO:0005871	kinesin complex	1	1	0.02	<i>0.04</i>
GO:0046540	U4/U6 x U5 tri-snRNP complex	1	1	0.02	<i>0.04</i>
GO:0097526	spliceosomal tri-snRNP complex	1	1	0.02	<i>0.04</i>
GO:0033177	proton-transporting two-sector ATPase complex	13	2	0.23	1.00
GO:0005938	cell cortex	17	2	0.3	<i>0.04</i>
GO:0000220	vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex	2	1	0.03	<i>0.04</i>
GO:0000794	condensed nuclear chromosome	2	1	0.03	<i>0.04</i>
GO:0005758	mitochondrial intermembrane space	2	1	0.03	<i>0.04</i>
GO:0016471	vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex	2	1	0.03	<i>0.04</i>
GO:0030896	checkpoint clamp complex	2	1	0.03	<i>0.04</i>
GO:0031970	organelle envelope lumen	2	1	0.03	<i>0.04</i>
GO:0020016	ciliary pocket	47	3	0.82	0.06

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 6. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 23 quanto a MF

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adjustedfisherElim
GO:0003987	acetate-CoA ligase activity	2	2	0.05	0.01
GO:0016208	AMP binding	2	2	0.05	0.01
GO:0016405	CoA-ligase activity	2	2	0.05	1.00
GO:0016878	acid-thiol ligase activity	2	2	0.05	1.00
GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	10	3	0.23	0.02
GO:0016877	ligase activity, forming carbon-sulphur bonds	12	3	0.28	0.29
GO:0022804	active transmembrane transporter activity	63	6	1.46	0.39
GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	14	3	0.32	1.00
GO:0042626	ATPase activity, coupled to transmembrane transporter activity	48	5	1.11	0.04
GO:0015399	primary active transmembrane transporter activity	50	5	1.16	1.00
GO:0015405	P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	50	5	1.16	1.00
GO:0043492	ATPase activity, coupled to movement of substances	53	5	1.23	1.00
GO:0016874	ligase activity	64	5	1.48	0.24
GO:0016887	ATPase activity	115	7	2.67	0.54
GO:0022857	transmembrane transporter activity	146	8	3.39	0.48
GO:0003988	acetyl-CoA C-acyltransferase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0004311	farnesyltranstransferase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0004475	mannose-1-phosphate guanylyltransferase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0008495	protoheme IX farnesyltransferase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0008784	alanine racemase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0008905	mannose-phosphate guanylyltransferase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0008928	mannose-1-phosphate guanylyltransferase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0016408	C-acyltransferase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0016855	racemase and epimerase activity, acting on amino acids and derivatives	1	1	0.02	0.05
GO:0019894	kinesin binding	1	1	0.02	0.05
GO:0036361	racemase activity, acting on amino acids and derivatives	1	1	0.02	0.05
GO:0047040	pteridine reductase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0047661	amino-acid racemase activity	1	1	0.02	0.05
GO:0005215	transporter activity	153	8	3.55	0.52
GO:0042623	ATPase activity, coupled	77	5	1.79	1.00
GO:0016491	oxidoreductase activity	228	10	5.29	0.07
GO:0015078	proton transmembrane transporter activity	34	3	0.79	0.07
GO:0004055	argininosuccinate synthase activity	2	1	0.05	0.07
GO:0004564	beta-fructofuranosidase activity	2	1	0.05	0.07
GO:0015299	solute:proton antiporter activity	2	1	0.05	0.07
GO:0016531	copper chaperone activity	2	1	0.05	0.07
GO:0015077	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	36	3	0.83	0.08

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 7. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 31 quanto ao BP

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adjustedfisherElim
GO:0055085	transmembrane transport	153	12	5.72	<i>0.04</i>
GO:0006308	DNA catabolic process	6	2	0.22	<i>0.04</i>
GO:0006195	purine nucleotide catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0006196	AMP catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0006359	regulation of transcription by RNA polymerase II promoter	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0006874	cellular calcium ion homeostasis	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0006885	regulation of pH	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0009125	nucleoside monophosphate catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0009128	purine nucleoside monophosphate catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0009154	purine ribonucleotide catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0009158	ribonucleoside monophosphate catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0009169	purine ribonucleoside monophosphate catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0009261	ribonucleotide catabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0009582	detection of abiotic stimulus	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0015793	glycerol transport	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0015809	arginine transport	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0016480	negative regulation of transcription by RNA polymerase II	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0016572	histone phosphorylation	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0018105	peptidyl-serine phosphorylation	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0018209	peptidyl-serine modification	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0030004	cellular monovalent inorganic cation homeostasis	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0030641	regulation of cellular pH	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0035404	histone-serine phosphorylation	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0043575	detection of osmotic stimulus	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0043987	histone H3-S10 phosphorylation	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0045851	pH reduction	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0046033	AMP metabolic process	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0051452	intracellular pH reduction	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0051453	regulation of intracellular pH	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0055067	monovalent inorganic cation homeostasis	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0055074	calcium ion homeostasis	1	1	0.04	<i>0.04</i>
GO:0006629	lipid metabolic process	143	10	5.34	<i>0.04</i>

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 8. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 31 quanto ao CC

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adustfisherElim
GO:0016021	integral component of membrane	231	13	5.47	<i>0.02</i>
GO:0031224	intrinsic component of membrane	233	13	5.52	1.00
GO:0044425	membrane part	334	15	7.91	0.73
GO:0016020	membrane	488	19	11.55	0.60
GO:0009317	acetyl-CoA carboxylase complex	1	1	0.02	<i>0.04</i>
GO:0009343	biotin carboxylase complex	1	1	0.02	<i>0.04</i>
GO:0020038	subpellicular network	1	1	0.02	<i>0.04</i>
GO:0061576	acyl-CoA ceramide synthase complex	1	1	0.02	<i>0.04</i>

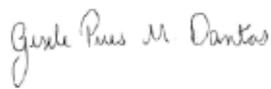
A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

ANEXO 9. GO dos principais genes enriquecidos no cromossomo 31 quanto a MF

GO ID	Term	Annotated	Significant	Expected	adustfisherElim
GO:0004198	calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity	25	6	0.83	0.01
GO:0009055	electron transfer activity	30	6	1	0.01
GO:0004197	cysteine-type endopeptidase activity	35	6	1.17	1.00
GO:0005287	high-affinity basic amino acid transmembrane transporter activity	2	2	0.07	1.00
GO:0005289	high-affinity arginine transmembrane transporter activity	2	2	0.07	0.02
GO:0015181	arginine transmembrane transporter activity	2	2	0.07	1.00
GO:0008234	cysteine-type peptidase activity	57	7	1.9	0.81
GO:0022857	transmembrane transporter activity	146	12	4.86	0.49
GO:0015174	basic amino acid transmembrane transporter activity	3	2	0.1	1.00
GO:0003824	catalytic activity	1732	72	57.66	0.06
GO:0005215	transporter activity	153	12	5.09	0.55
GO:0015399	primary active transmembrane transporter activity	50	6	1.66	1.00
GO:0015405	P-P-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity	50	6	1.66	0.06
GO:0005342	organic acid transmembrane transporter activity	5	2	0.17	1.00
GO:0008514	organic anion transmembrane transporter activity	5	2	0.17	1.00
GO:0015171	amino acid transmembrane transporter activity	5	2	0.17	1.00
GO:0046943	carboxylic acid transmembrane transporter activity	5	2	0.17	1.00
GO:0004175	endopeptidase activity	92	8	3.06	0.81
GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	15	3	0.5	0.06
GO:0008324	cation transmembrane transporter activity	60	6	2	0.19
GO:0051536	iron-sulfur cluster binding	29	4	0.97	0.06
GO:0051540	metal cluster binding	29	4	0.97	0.06
GO:0008168	methyltransferase activity	63	6	2.1	0.06
GO:0022804	active transmembrane transporter activity	63	6	2.1	1.00
GO:0070011	peptidase activity, acting on L-amino activity	144	10	4.79	0.72
GO:0042626	ATPase activity, coupled to transmembrane transporter activity	48	5	1.6	0.06
GO:0016787	hydrolase activity	683	32	22.74	0.20
GO:0016741	transferase activity, transferring one-carbon groups	67	6	2.23	0.06
GO:0008233	peptidase activity	149	10	4.96	0.74
GO:0043492	ATPase activity, coupled to movement of substances	53	5	1.76	0.06
GO:0008757	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity	21	3	0.7	0.06
GO:0015075	ion transmembrane transporter activity	73	6	2.43	0.30
GO:0003871	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0003989	acetyl-CoA carboxylase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0004075	biotin carboxylase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0004077	biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] ligase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0004164	diphthine synthase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0004496	mevalonate kinase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0008252	nucleotidase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0008254	3'-nucleotidase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0009678	hydrogen-translocating pyrophosphatase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0015168	glycerol transmembrane transporter activity	1	1	0.03	0.06
GO:0015254	glycerol channel activity	1	1	0.03	0.06
GO:0016421	CoA carboxylase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0016885	ligase activity, forming carbon-carbon bonds	1	1	0.03	0.06
GO:0018271	biotin-protein ligase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0042085	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-dependent methyltransferase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0050291	sphingosine N-acyltransferase activity	1	1	0.03	0.06
GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups	42	4	1.4	0.08

A coluna *adjustedfisherElim* compreende valores estatísticos $p < 0,05$ referentes aos *GO terms* identificados com maior significância dentro da hierarquia de relação das funções dos genes. Para essa coluna, valores destacados em itálico representam os termos com valor estatístico significativo. A coluna *Significant* compreende os *GO terms* relacionadas aos genes encontrados nos cromossomos e o número de vezes que estavam presentes. Valores maior que 2 representam genes enriquecidos no cromossomo avaliado.

Anexo 10. Protocolo do Comitê de Ética utilizado no estudo

 <p>Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais Pró-reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA PUC Minas</p>
<p>PARECER DA CEUA PUC MINAS</p>
<p>Protocolo no. 015/2016</p>
<p>Título: "Cuidados médicos com cães e gatos como promoção de saúde humana em coletividade – ações de controle de doenças e medidas preventivas de zoonoses"</p>
<p>Responsável: Prof. Vitor Márcio Ribeiro</p>
<p>Curso de Origem: Medicina Veterinária – Unidade Betim</p>
<p>Parecer da CEUA PUC MINAS: Aprovado</p>
<p>Data da Reunião: 01.12.2017</p>
<p>Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2017.</p>
<p> Profa. Gisele Pires de Mendonça Dantas Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA PUC Minas</p>
<p>Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, 2º. andar - sala 228 - Fone: 3319-4517 CEP 30535-610 - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil ceua@pucminas.br</p>