

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

LUANA APARECIDA ROGERIO

**Caracterização Fenotípica, Genômica e Transcriptômica de Parasitos  
*Crithidia sp.* LVH60a Obtidos de Pacientes Diagnosticados com  
Leishmaniose Visceral**

SÃO CARLOS - SP  
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

LUANA APARECIDA ROGERIO

**Caracterização Fenotípica, Genômica e Transcriptômica de Parasitos  
*Crithidia sp.* LVH60a Obtidos de Pacientes Diagnosticados com  
Leishmaniose Visceral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de  
Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal  
de São Carlos, para obtenção do título de Doutora em  
Ciências

Área de concentração: Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

Subárea: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama

São Carlos-SP

2023



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

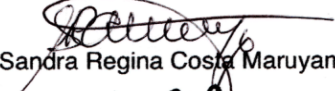
---


### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Luana Aparecida Rogerio, realizada em 09/11/2023.

#### Comissão Julgadora:

  
Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama (UFSCar)

  
Profa. Dra. Flávia Cristina de Paula Freitas (UFSCar)

  
Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti (UFSCar)

  
Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann (USP)

  
Profa. Dra. Carolina Moura Costa Catta Preta (NIH)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria, em primeiro lugar, expressar minha profunda gratidão aos meus pais, Kelly e Leonildo, não apenas por estarem sempre ao meu lado, me incentivando a cada etapa da minha vida, mas por terem ensinado os valores de empatia, liberdade e perseverança, os quais foram essenciais para eu me tornar a pessoa que sou hoje.

Agradeço de coração à minha madrinha e minha avó, Patrícia e Ana Maria, por serem as minhas maiores torcedoras, sempre me encorajando a perseguir meus sonhos. Também quero estender meus agradecimentos aos meus primos, João, Ana Júlia e Carla, pela cumplicidade e por se tornarem meus irmãos.

Ao meu companheiro de vida, Gustavo, agradeço a constante companhia, carinho e compreensão. Sua presença tem me ajudado a passar por todos os momentos da minha vida com plena certeza de que sempre terei alguém em quem posso confiar.

Agradeço à Nayore e Talita, que por muito tempo foram minhas companheiras de experimentos e os primeiros laços de amizade que criei em São Carlos. Obrigada por terem contribuído para a realização deste trabalho e oferecer ajuda de forma incondicional.

À Patrícia, pelo carinho e amizade, que junto com a Nayore, me ajudaram quando eu mais precisei, tanto profissionalmente quanto emocionalmente. Vocês sempre estarão entre as pessoas mais importantes da minha vida.

À Camila, Caroline e Ellen, por sempre estarem dispostas a me ouvir e não medirem esforços para me ajudar. Não poderia ser mais grata pela amizade de vocês durante esta jornada.

Aos meus colegas de laboratório - Giovanna, Wesley e Joselma – agradeço a convivência diária e por fazerem os meus dias mais leves e felizes.

Quero expressar minha sincera gratidão à minha orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama, por confiar em mim para a realização deste trabalho e por me proporcionar oportunidades que contribuíram significativamente para meu crescimento profissional. Sua paixão pela pesquisa é uma fonte de inspiração constante.

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Roque Pacheco de Almeida do Hospital Universitário de Sergipe por disponibilizar os isolados clínicos que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Genética e Evolução – Dr. Marcos Roberto Chiaratti, Dr. Iran Malavazi, Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Dr. Flávio Henrique da Silva, Dr. Ricardo Carneiro Borra, Dra. Lisandra Marques Gava Borges e Dr. Marcelo de Bello Cioffi – sou imensamente grata por cederem os equipamentos necessários para a condução dos experimentos deste trabalho.

Gostaria de estender um agradecimento especial ao Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, por abrir as portas de seu laboratório e permitir a realização dos experimentos deste trabalho.

Aos professores Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Dr. Sílvio Roberto Consonni do Instituto de Biologia da Unicamp, assim como às alunas Elizabeth e Bianca, agradeço por fornecerem os materiais necessário e por dedicarem seu tempo para viabilizar experimentos deste trabalho.

Meus agradecimentos aos pesquisadores do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos – Dr. Jesus G. Valenzuela, Dr. José Marcos Ribeiro e Dr. Pedro Amado Cecílio – por terem me aceitado a cumprir meu estágio de pesquisa no exterior e por todo o conhecimento que me proporcionaram durante o período.

À Jeniffer, minha profunda gratidão por ter sido intermediadora do meu ingresso à iniciação científica. Eu nunca poderia ser tão grata por ter me apresentado a uma profissão no qual me sinto totalmente idealizada. Obrigada pelo companheirismo durante a graduação e iniciação científica.

Às minhas amigas da graduação – Thainá, Micaela, Gabriela e Jeniffer – agradeço pelas risadas e pelo apoio mútuo durante essa fase memorável da minha vida.

Expresso minha admiração e agradecimento à Dra. Valdenice Novelli por ter me acolhido como aluna de iniciação científica durante minha trajetória no Centro de Citricultura Sylvio Moreira e por proporcionar a oportunidade de publicar meu primeiro artigo como autora principal. Sua dedicação à pesquisa é inspiradora.

À Bianca, minha eterna gratidão por estar presente em todos os momentos importantes da minha vida e por continuar me proporcionando muitos momentos felizes e memoráveis.

À todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido à Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama pelo Programa Jovens Pesquisadores (JP) em Centros Emergentes (Processo 2016/20258-0) e aos auxílios vinculados ao JP, fornecidos durante o Mestrado, Doutorado Direto e Estágio de Pesquisa no Exterior (Processos nº 2018/26799-9, 2020/14011-8 e 2021/12715-0), em forma de bolsa e reserva técnica para que eu pudesse participar de Congressos e Encontros, e compras de materiais necessários para a realização deste projeto. É importante ressaltar que as hipóteses ou conclusões neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.”

Aristóteles

## RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças negligenciadas, que podem ser causadas por mais de 20 espécies de protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. Desde 1980, tripanossomatídeos monoxênicos têm sido reportados em casos de leishmaniose cutânea e visceral principalmente em indivíduos imunocomprometidos. No Brasil, em 2019, foi relatado pela primeira vez parasitas do gênero *Crithidia*, denominados de *Crithidia* sp. LVH60A, em um caso fatal de Leishmaniose Visceral (LV) humana em Sergipe-SE. A fim de avaliar isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A obtidos a partir de um paciente recidivante da mesma região, este trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e realizar análises de genômica e transcriptômica desses isolados clínicos. Para isso, culturas de parasitas foram analisadas para parâmetros de crescimento, morfológicos e infectividade *in vitro*, bem como a identificação *in silico* de proteínas relacionadas à virulência de parasitos no genoma de *Crithidia* sp. LVH60A. O DNA genômico foi sequenciado, montado e comparado às outras espécies de tripanossomatídeos. Além disso, avaliamos a diferença na expressão gênica de parasitos e macrófagos humanos infectados com diferentes espécies e cepas de *Leishmania* e *Crithidia* por meio de sequenciamento de RNA mensageiro (mRNA-seq), empregando a abordagem de *dual* RNA-seq. As análises de curva de crescimento mostraram a aptidão de parasitos *Crithidia* sp. LVH60A de se replicarem em temperaturas de 25 °C e 35 °C, bem como a capacidade de sobreviverem e se multiplicarem em diferentes linhagens de macrófagos. As análises morfológicas mostraram que o corpo celular do protozoário *Crithidia* sp. LVH60A é mais arredondado e possui flagelo mais curto quando comparado a *L. infantum*, apresentando também algumas diferenças em relação à cepa TCC039E de *Crithidia fasciculata*. As análises genômicas demonstraram que os isolados clínicos obtidos do paciente em sua segunda e terceira recidiva em 2017, exibem uma identidade de nucleotídeo superior a 98% com a cepa LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A). O alinhamento dos genomas de *Crithidia* sp. LVH60A e *C. fasciculata* exibiram uma identidade média de nucleotídeo que variou de 92,7% a 94,8% a depender do programa utilizado. Também foram observados e validados rearranjos cromossômicos de LVH60A quando comparados ao genoma de *C. fasciculata* CfCl. Resultados de mRNA-seq mostraram que a infecção com diferentes cepas de parasitas não alterou significativamente a expressão transcricional dos macrófagos, todavia, pequenas alterações foram observadas principalmente após quatro horas de infecção. Por outro lado, houve uma clara diferença na expressão de transcritos de tripanossomatídeos. Foram identificados transcritos diferencialmente expressos compartilhados entre as cepas de *Leishmania* spp. e *Crithidia* sp. LVH60A, os quais codificam proteínas mediadores de resposta ao estresse, nutrição e evasão do sistema imune do hospedeiro. Nossos resultados indicam que *Crithidia* sp. LVH60A pode representar uma nova

espécie do gênero *Crithidia*, porém, mais isolados precisam ser analisados com foco na genômica populacional para consolidar essa evidência.

**Palavras-chave:** *Crithidia* sp., *Leishmania infantum*, Leishmaniose Visceral, Genômica Comparativa, *Dual* Transcriptômica, Análises fenotípicas.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of neglected diseases that can be caused by over 20 species of protozoa from genus *Leishmania*. Since 1980, monoxenous trypanosomatids have been found in cutaneous and visceral leishmaniasis cases in both immunocompetent and immunocompromised patients. In Brazil, parasites of *Crithidia* genus were first reported in 2019 in a fatal case of human visceral leishmaniasis in Sergipe (SE), referred to as *Crithidia* sp. LVH60A. To characterize clinical isolates of *Crithidia* sp. LVH60A parasites obtained from a relapsing patient from the same region, this study aimed to characterize phenotypically and perform genomic and transcriptomic analyzes of these clinical isolates. In this regard, parasite cultures were analyzed for growth curves, morphological features, *in vitro* infectivity and *in silico* identification of virulence-related proteins in *Crithidia* sp. LVH60A genome. Genomic DNA was sequenced, assembled, and compared to other trypanosomatid species. Additionally, we assessed the difference in gene expression of parasites and human macrophages infected with different species of *Leishmania* and *Crithidia* using messenger RNA sequencing (mRNA-seq), employing a dual RNA-seq approach. Phenotypic analyses demonstrated that the *Crithidia* sp. LVH60A parasites were capable of replicate at temperatures of 25 °C and 35 °C, surviving and multiplying within different macrophage lineages. Morphological analyses revealed that the cellular body of *Crithidia* sp. LVH60A is rounded, possesses shorter flagella than *L. infantum*, and presents some differences when compared to the *Crithidia fasciculata* TCC039E strain. Genomic analyses showed that the clinical isolates from 2017 had over 98% nucleotide identity with the LVH60a C1 strain (*Crithidia* sp. LVH60A). Genome alignments of *Crithidia* sp. LVH60A and *C. fasciculata* strains showed an average nucleotide identity ranging from 92.7% to 94.8%, depending on the software used. Chromosomal rearrangements of *Crithidia* sp. LVH60A was also observed and validated when compared to *C. fasciculata* CfCl reference genome. The mRNA-seq results showed that infection with different parasite strains did not significantly alter the transcriptional expression of macrophages; however, slight changes were observed shortly after the infection. However, there was a clear difference in the expression of the trypanosomatid transcripts. Some differentially expressed transcripts are shared by strains of *Leishmania* spp. and *Crithidia* sp. LVH60A. These transcripts encode proteins that mediate responses to stress, nutrition, and host immune response evasion. Our results suggest that the *Crithidia* sp. LVH60A may be a new species within the *Crithidia* genus; however, more isolates of *Crithidia* sp. LVH60A need to be analyzed with a focus on population genomics to confirm this evidence.

**Keyword:** *Crithidia* sp., *Leishmania infantum*, Visceral Leishmaniasis, Comparative Genomics, Dual Transcriptome, Phenotypic analysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação taxonômica e filogenética de protozoários parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae. ....	21
<b>Figura 2.</b> Representação do ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i> . ....	24
<b>Figura 3.</b> Apresentação clínica do paciente BASF durante sua quarta internação no ano de 2017. ....	31
<b>Figura 4.</b> Apresentação clínica do paciente BASF em sua quinta internação no ano de 2020. ....	32
<b>Figura 5.</b> Linha do tempo de um paciente infantil do sexo masculino com leishmaniose visceral refratária e recidivante no Brasil. ....	33
<b>Figura 6.</b> Transcrição e processamento de mRNA em tripanossomatídeos ....	34
<b>Figura 7.</b> Fluxograma dos experimentos e análises executadas durante o desenvolvimento deste trabalho. ....	39
<b>Figura 8.</b> <i>Layout</i> experimental do experimento de <i>dual</i> mRNA-seq ....	58
<b>Figura 9.</b> Curvas de crescimento celular de parasitos <i>in vitro</i> . ....	67
<b>Figura 10.</b> Imagens das culturas de tripanossomatídeos por microscopia de luz. ....	70
<b>Figura 11.</b> Microscopia eletrônica de varredura de parasitos em cultura <i>in vitro</i> . ....	71
<b>Figura 12.</b> Medidas em micrometros ( $\mu\text{M}$ ) de estruturas celulares de promastigotas de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>C. fasciculata</i> e <i>L. infantum</i> . ....	73
<b>Figura 13.</b> Microscopia eletrônica de transmissão de ultraestruturas de parasitos em cultura (fase mid-log). ....	75
<b>Figura 14.</b> Porcentagem de infecção de macrófagos infectados com cepas de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>L. infantum</i> e <i>C. fasciculata</i> . ....	78
<b>Figura 15.</b> Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongo infectados com diferentes cepas de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>L. infantum</i> e <i>C. fasciculata</i> . ....	82
<b>Figura 16.</b> Imagens de microscopia de luz de macrófagos provenientes de medula óssea de camundongos Balb/C, infectados com diferentes cepas de tripanossomatídeos no tempo de 24, 48 e 72 horas após a infecção. ....	83
<b>Figura 17.</b> Porcentagem de infecção em PBMC e número médio de parasitas por macrófago infectado com <i>Crithidia</i> sp. LVH60A e <i>L. infantum</i> . ....	85
<b>Figura 18.</b> Análise filogenética de sequências de SSU (18S rRNA). ....	86
<b>Figura 19.</b> Detecção e quantificação de parasitas baseada na reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em culturas de parasitas e amostras de tecidos do paciente BASF. ....	88
<b>Figura 20.</b> Análise filogenômica de proteínas ortólogas de Trypanosomatidae realizadas com o método Total Ortholog Median Matrix (TOMM). ....	91

<b>Figura 21.</b> <i>Heatmap</i> mostrando a análise de mapeamento e identidade média de nucleotídeos. ....	94
<b>Figura 22.</b> Estimativa do número de cópias cromossômicas (somia) dos isolados clínicos obtidos do paciente BASF. ....	98
<b>Figura 23.</b> Sintenia entre os genomas de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A e <i>Crithidia fasciculata</i> . ....	99
<b>Figura 24.</b> Número de variantes por tipo nos genomas de isolados clínicos de <i>Crithidia</i> sp LVH60A e <i>L. infantum</i> . ....	101
<b>Figura 25.</b> Análise da Distribuição de Variantes Genômicas nos genomas de isolados clínicos de <i>Crithidia</i> sp LVH60A e <i>L. infantum</i> por Impacto e Região. ....	102
<b>Figura 26.</b> Alinhamento entre cromossomos das duas espécies de <i>Crithidia</i> mostra a sintenia dos cromossomos 4 e 12 de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A ao cromossomo 8 de <i>C. fasciculata</i> CfCl. ....	104
<b>Figura 27.</b> Alinhamento entre cromossomos de duas espécies de <i>Crithidia</i> mostra a sintenia dos cromossomos 7 e 28 de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A ao cromossomo 22 de <i>C. fasciculata</i> CfCl. ....	106
<b>Figura 28.</b> Alinhamento entre cromossomos de duas espécies de <i>Crithidia</i> mostra a sintenia do cromossomo 25 de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A ao cromossomo 2 e parte do cromossomo 29 de <i>C. fasciculata</i> CfCl. ....	108
<b>Figura 29.</b> Confirmação do amplicon referente a região do rearranjo do cromossomo 25 (junção de dois cromossomos) de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A. ....	109
<b>Figura 30.</b> Porcentagem de infecção de macrófagos U937 infectados com espécies de <i>Leishmania</i> e <i>Crithidia</i> . ....	110
<b>Figura 31.</b> Razão Amastigota: macrófagos U937 infectados com espécies de <i>Leishmania</i> e <i>Crithidia</i> . ....	111
<b>Figura 32.</b> Índice de infecção de diferentes cepas de macrófagos infectados com cepas <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> e <i>C. fasciculata</i> . ....	112
<b>Figura 33.</b> Perfil transcricional de macrófagos infectados com diferentes cepas de parasitos durante a infecção <i>in vitro</i> . ....	115
<b>Figura 34.</b> Perfil transcricional de tripanossomatídeos durante a infecção <i>in vitro</i> de macrófagos infectados com diferentes cepas de parasitos. ....	116
<b>Figura 35.</b> Diagrama de Venn evidenciando o número de transcritos humanos diferencialmente expressos de macrófagos infectados com diferentes parasitos compartilhados entre comparações ou exclusivos de cada comparação. ....	118
<b>Figura 36.</b> Volcano plot dos transcritos diferencialmente expressos de tripanossomatídeos em comparação com <i>C. fasciculata</i> . ....	120

<b>Figura 37.</b> Diagrama de Venn dos transcritos diferencialmente expressos de tripanossomatídeos <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i> e <i>Crithidia</i> sp. LVH60A em comparação com <i>C. fasciculata</i> .....	121
<b>Figura 38.</b> <i>Heatmap</i> dos diferentes transcritos de tripanossomatídeos diferencialmente expressos em relação a <i>C. fasciculata</i> .....	122

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características do genoma de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A e sintonia com <i>C. fasciculata</i> cepa CfCl. ....	27
<b>Tabela 2.</b> Nome dos genes, sequência e informações dos <i>primers</i> utilizados. ....	46
<b>Tabela 3.</b> Número de acesso das sequências de SSU rRNA dos tripanossomatídeos utilizadas na análise filogenética. ....	47
<b>Tabela 4.</b> Genes associados a fatores de virulência e sobrevivência em tripanossomatídeos. ....	49
<b>Tabela 5.</b> Sequência e informações dos <i>primers</i> utilizados para validação das variações estruturais do genoma de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A. ....	55
<b>Tabela 6.</b> Código de acesso NCBI dos genomas e número total de proteínas de espécies de Tripanossomatídeos utilizados. ....	56
<b>Tabela 7.</b> Tempo de duplicação das cepas <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>L. infantum</i> e <i>C. fasciculata</i> em cultura a 25 °C. ....	68
<b>Tabela 8.</b> Medidas de estruturas celulares de promastigotas através da análise de fotografias obtidas por MEV. ....	72
<b>Tabela 9.</b> Porcentagem de infecção, relação amastigota/macrófago e índice de infecção das diferentes linhagens de macrófagos infectados com cepas de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>Leishmania infantum</i> e <i>Crithidia fasciculata</i> . ....	79
<b>Tabela 10.</b> Profundidade média de cobertura das reads por cromossomo dos isolados clínicos do paciente BASF. ....	89
<b>Tabela 11.</b> Características gerais dos genomas dos isolados clínicos sequenciados contendo scaffolds maiores que 300 pares de base. ....	90
<b>Tabela 12.</b> Genes relacionados à sobrevivência e virulência identificados na montagem do genoma de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A. ....	92
<b>Tabela 13.</b> Comparação da identidade média de nucleotídeos (ANI) entre genomas de espécies de Leishmaniinae. ....	95
<b>Tabela 14.</b> Características gerais dos genomas de cepas de <i>Crithidia</i> . ....	100
<b>Tabela 15.</b> Número de variantes por tipo dos isolados clínicos <i>Crithidia</i> sp. LVH60A e <i>Leishmania infantum</i> . ....	100
<b>Tabela 16.</b> Porcentagem de infecção, razão amastigota: macrófagos e índice de infecção de macrófagos U937 infectados com cepas de parasitas <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>Leishmania infantum</i> , <i>L. major</i> e <i>C. fasciculata</i> . ....	113
<b>Tabela 17.</b> Quantidade de contigs obtidos de cada montagem utilizando diversos comprimentos <i>k-mer</i> . ....	114

<b>Tabela 18.</b> Transcritos humanos diferencialmente expressos compartilhados entre os grupos de macrófagos infectados com as espécies <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> e <i>Crithidia</i> sp. LVH60A.	119
<b>Tabela 19.</b> Transcritos regulados positivamente durante a infecção de macrófagos U397 infectados com <i>Crithidia</i> sp. LVH60A, <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> .	123

## LISTA DE SIGLAS

18S rRNA ou SSU 18S – Subunidade menor do RNA ribossomal de 18S

ACT - Artemis Comparison Tool

ANI - Identidade média de nucleotídeos

BED - *Browser Extendable Data*

BMDM - Macrófagos derivados de medula óssea (*Bone marrow-derived macrophage*)

BMVL – *Bone marrow visceral leishmaniasis*

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CNV – Variação no número de cópias (*Copy number variation*)

dNTP - desoxinucleotídeos trifosfatos

FDR - Taxa de descoberta falsa (*False Discovery Rate*)

FPKM - Fragmentos por quilo base por milhão de fragmentos mapeados

Gb – Gigabytes

gGAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal

GP63 – glicoproteína 63

HMDS – Hexametildissilazano (*Hexamethyldisilazane*)

HPC - *High Performance Computing*

HPI – Horas após infecção

HSP – *Heat shock protein*

IL – Interleucina

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

ITS – Espaçadores de transcritos internos

ITS- 1 - *Internal Transcribed Spacer 1*

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LNNano - Laboratório Nacional de Nanotecnologia

LPG – Lipofosfoglicanos

LPG – Lipophosphoglycan

LV – Leishmaniose visceral

Mb – Mega base

MDS – Gráfico de escala multidimensional

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mM – Milimolar

MOI - Multiplicidade de infecção

Pb – Pares de base

PBMC - Células mononucleares de sangue periférico

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCA – Análise do componente principal

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Pol II - RNA Polimerase II

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RDS - *Reciprocal Smallest Distance*

RNA-seq - Sequenciamento de RNA

RNAm - RNA mensageiro

SBF - Soro Bovino Fetal

SL – Sequência líder (*Spliced leader*)

SNV - Variação de nucleotídeo único

Th – Linfócitos *T-helper*

TOMM - *Total Ortholog Median Matrix*

TPM - Transcritos por milhão

VCF - *Variant calling file*



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1	Família Trypanosomatidae	20
1.2	<u>Leishmania</u> e leishmanioses	22
1.3	Leishmaniose visceral	22
1.4	Coinfecção por tripanossomatídeos monoxênicos e <u>Leishmania</u>	26
1.5	Apresentação do Caso Clínico	30
1.6	Genômica e transcriptômica de Leishmaniinae	33
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
3.1	Obtenção das amostras e isolados clínicos	40
3.2	Cultivo de promastigota de <i>Leishmania</i> e coanomastigota de <i>Crithidia</i>	40
3.3	Obtenção de clones a partir das culturas promastigotas	40
3.4	<b>Caracterização fenotípica</b>	<b>41</b>
3.4.1	Proliferação celular	41
3.4.2	Microscopia de luz	41
3.4.3	Microscopia eletrônica de varredura	42
3.4.4	Microscopia eletrônica de transmissão	42
3.4.5	Avaliação da infectividade <i>in vitro</i>	43
3.5	<b>Caracterização molecular</b>	<b>45</b>
3.5.1	Extração de DNA	45
3.5.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR) de marcadores moleculares, sequenciamento e análise filogenética de <i>amplicons</i>	45
3.5.3	PCR quantitativa em tempo real para quantificação da carga parasitária	48
3.5.4	Identificação <i>in silico</i> de genes ortólogos	48
3.5.5	Sequenciamento do genoma completo por tecnologia Illumina	50
3.5.6	Pré-processamento das sequências Illumina <i>short reads</i>	50
3.5.7	Mapeamento das <i>reads</i> em genomas de referência	51
3.5.8	Identificação de aneuploidias por estimativa de somia cromossômica	53
3.5.9	Anotação dos genomas, detecção e anotação de variantes	53
3.5.10	Avaliação das variações estruturais dos genomas de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A e <i>C. fasciculata</i>	54
3.5.11	Montagem <i>de novo</i> e análise filogenômica de isolados clínicos	56
3.5.12	Dual Transcriptômica por mRNA-seq	57
3.5.13	Isolamento de RNA e sequenciamento de mRNA	59
3.5.14	Análises de Bioinformática	59
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>66</b>
4.1	<b>Caracterização fenotípica</b>	<b>66</b>
4.1.1	Proliferação celular de culturas axênicas	66
4.1.2	Análises morfológicas	69
4.1.3	Avaliação da infectividade <i>in vitro</i>	77
4.1.4	Infecção <i>in vitro</i> com linhagens celulares imortalizadas	77
4.1.5	Infecção <i>in vitro</i> com cultura celular primária	81
4.2	<b>Caracterização molecular</b>	<b>85</b>
4.2.1	Análise filogenética do marcador taxonômico SSU rRNA	85
4.2.2	Quantificação da carga parasitária	87

4.2.3	Sequenciamento completo de DNA genômico e montagem <i>de novo</i> .....	88
4.2.4	Análise filogenômica .....	90
4.2.5	Identificação <i>in silico</i> de genes ortólogos relacionados à virulência e à interação parasita-hospedeiro .....	92
4.2.6	Mapeamento no genoma e Análise da Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) entre genomas .....	93
4.2.7	Identificação de aneuploidias por meio de determinação de somia cromossômica .....	97
4.2.8	Anotação dos genomas, detecção e anotação de variantes .....	100
4.2.9	Validação da montagem de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A .....	103
4.2.10	<i>Dual</i> RNA-seq .....	109
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>148</b>

# ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

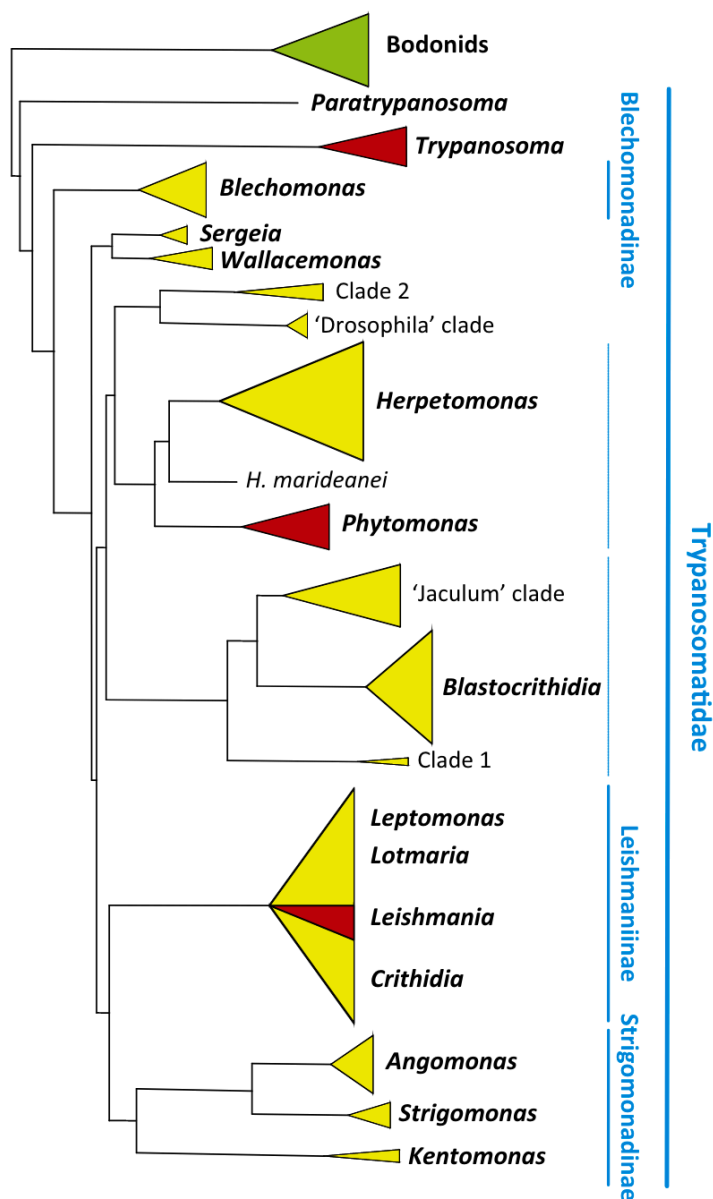
### 1.1 Família Trypanosomatidae

Os protozoários da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, são parasitas obrigatórios de invertebrados, vertebrados e plantas e podem ser classificados de acordo com a quantidade de hospedeiros que parasitam durante seu ciclo de vida (LUKEŠ *et al.*, 2014; MASLOV *et al.*, 2018). Tripanossomatídeos monoxênicos completam seu ciclo de vida em um único hospedeiro artrópode, geralmente insetos, enquanto as espécies dixênicas precisam de dois hospedeiros para completarem o ciclo de vida, sendo um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado ou uma planta hospedeira (FROLOV; KOSTYGOV; YURCHENKO, 2021).

A taxonomia de tripanossomatídeos inicialmente era baseada somente nas análises morfológicas, como posição do cinetoplasto, núcleo, bolsa flagelar, além do tamanho e presença de mais de um flagelo e nas características do ciclo de vida. Posteriormente, técnicas que avaliam diferenças bioquímicas e moleculares, começaram a ser empregadas para classificar estes parasitas. Subsequentemente, análise de sequências moleculares passaram a ser utilizadas para a construção de árvores filogenéticas, permitindo inferir relações evolutivas, conforme ilustrado na Figura 1 (MASLOV *et al.*, 2018; VOTÝPKA *et al.*, 2015).

Os genes frequentemente usados em análises filogenéticas incluem os genes, *spliced leader* (SL), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH), subunidade menor do RNA ribossomal de 18S (SSU) e espaçadores de transcritos internos (ITS) (VOTÝPKA *et al.*, 2015). No entanto, as filogenias baseadas em um único gene podem ser enviesadas ou podem possuir baixo suporte, já que a análise de gene único está propensa a erros de sequenciamento e metodologia (VOTÝPKA *et al.*, 2015). Com o advento do sequenciamento de nova geração, construções filogenéticas utilizando sequências de diversos genes se mostram mais robustas, permitindo uma abordagem mais abrangente, reduzindo os possíveis vieses e aumentando a confiabilidade das relações filogenéticas inferidas. Esta metodologia, no entanto, demanda tempo, alto custo e recursos computacionais (DUCHÊNE, 2021; MARUYAMA *et al.*, 2021). Ademais, é importante ressaltar que a inclusão de todos os genes ou proteínas pode introduzir ruídos e erros no resultado devido à eventos de deleções ou paralogia de genes ao longo da evolução (DUCHÊNE, 2021; PISANI *et al.*, 2022).

**Figura 1.** Representação taxonômica e filogenética de protozoários parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae.



Os gêneros que apresentam um único hospedeiro (monoxênicos) são identificados nos clados pela cor amarela, enquanto os gêneros que requerem dois hospedeiros em seu ciclo de vida (dixênicos) estão identificados nos clados em vermelho. Adicionalmente, o grupo irmão de vida livre é visualizado no clado em verde (Bodonídeos). Fonte: VOTÝPKA *et al.*, 2015.

As inferências filogenéticas até o momento têm demonstrado de forma convincente três adaptações independentes para o ciclo de vida dixênico em Trypanosomatidae, conforme representado na Figura 1 (VOTÝPKA *et al.*, 2015). Os parasitas dixênicos possuem uma relevância incontestável, evidenciada pelos danos significativos que causam em diferentes sistemas, afetando tanto a saúde humana e animal, quanto a produção agrícola. Em seres humanos e animais domésticos, espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* são responsáveis por ocasionar doenças negligenciadas denominadas leishmanioses e tripanossomíases. Já

em plantas, *Phytomonas* sp. pode causar uma vasta gama de doenças e já foram identificadas em 24 famílias distintas de plantas (JASKOWSKA *et al.*, 2015; MASLOV *et al.*, 2018).

## 1.2 ***Leishmania* e leishmanioses**

Parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanomatidae) são agentes etiológicos das leishmanioses, grupo de doenças infecciosas negligenciadas transmitidas através da picada de insetos flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no “Velho Mundo” - África, Ásia e Europa e *Lutzomya* no “Novo Mundo” – Américas. Os protozoários deste gênero são dimórficos, ou seja, possuem duas morfologias em seu ciclo de vida, sendo elas a forma promastigota e amastigota, encontradas no intestino de seu vetor flebotomíneo e de forma intracelular em fagócitos de hospedeiros mamíferos, respectivamente (STEVERDING, 2017). Esta doença representa um grave problema de saúde pública devido a expansão geográfica e tendência a urbanização (BORGES *et al.*, 2022).

O termo Leishmaniose abrange uma ampla gama de manifestações clínicas e podem ser causadas por 20 espécies distintas de *Leishmania*. Embora as diferentes espécies do gênero sejam morfológicamente semelhantes, elas causam três formas clínicas principais: a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV). Na LC, os parasitas infectam macrófagos residentes na pele, enquanto que na LV infectam células do sistema mononuclear fagocitário do fígado, baço, medula óssea, linfonodos e do intestino (STEVERDING, 2017; WHO, 2023). O tropismo da doença para os diferentes tecidos está intimamente relacionado com as espécies de *Leishmania*, seus vetores e o estado imunológico do hospedeiro (AIT MAATALLAH; AKARID; LEMRANI, 2022).

Segundo o relatório mais recente da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* - WHO) de 2021, as leishmanioses estão presentes em 60 países da Europa, África, Ásia e América. No entanto, mais de 90% dos novos casos de LC, ocorrem na Síria, Afeganistão, Paquistão, Brasil, Irã, Iraque, Argélia, Colômbia, Peru, Iêmen e Marrocos. Por outro lado, 90% dos casos de LV reportados em 2021 ocorrem em Sudão, Quênia, Brasil, Índia, Somália, Etiópia, Sudão do Sul, Iêmen e Eritreia (WHO, 2023). Estas condições estão associadas a fatores como desnutrição, moradia precária, sistema imunológico debilitado e falta de recursos financeiros (WHO, 2023). Ainda, segundo a Organização Mundial de Saúde, a LV é uma das sete doenças tropicais mais importantes e representa um grave problema de saúde mundial, pois quando não tratada ou diagnosticada corretamente pode ser fatal.

## 1.3 ***Leishmaniose visceral***

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma infecção protozoária disseminada causada pelo complexo *Leishmania donovani*. Nos países pertencentes ao "Velho Mundo", a LV é causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*, enquanto nas Américas, a espécie responsável pela

LV é *L. infantum* (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012; GÁLVEZ et al., 2020;). Excepcionalmente, em pacientes imunossuprimidos, pode-se observar a visceralização de algumas espécies tipicamente associadas a outras formas de leishmaniose, como por exemplo, cepas de *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. martiniquensis* e *L. amazonensis* (revisado por AIT MAATALLAH; AKARID; LEMRANI, 2022).

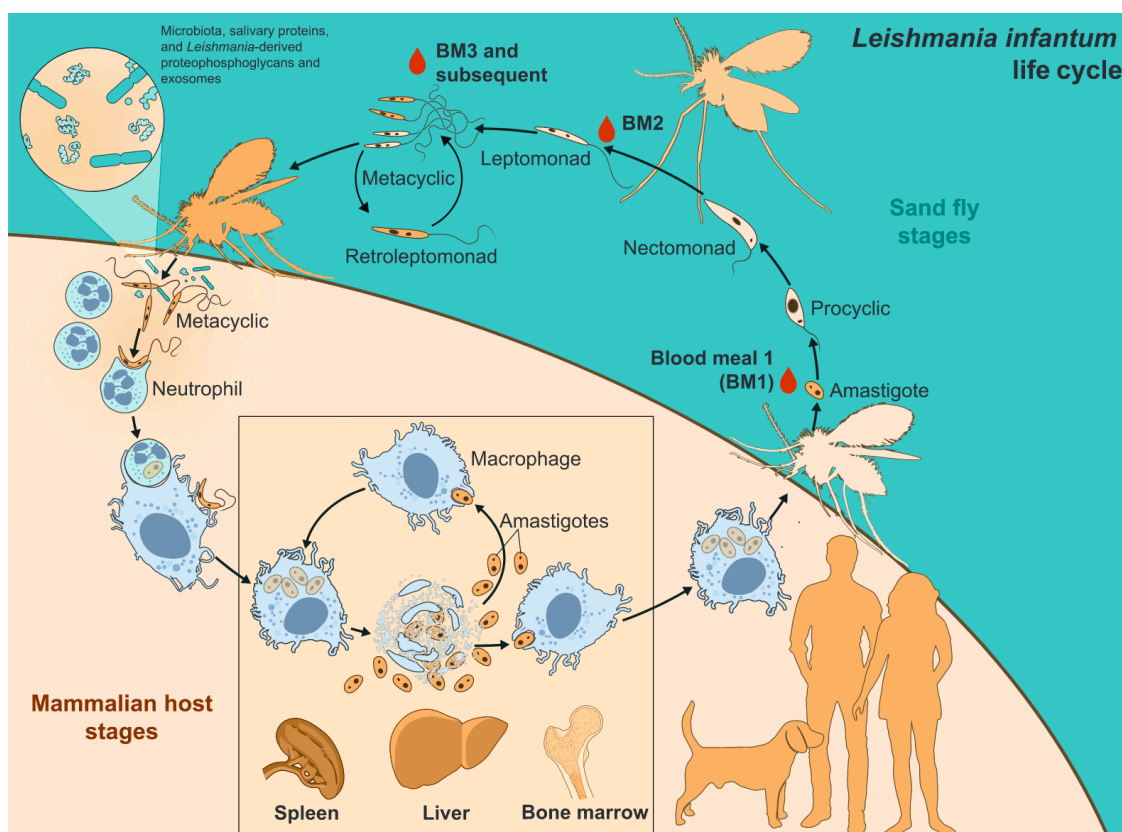
A transmissão da LV pode ocorrer de duas formas: zoonótica e antroponótica. Na forma zoonótica, o cão é o principal reservatório, e esse tipo de transmissão é observada mais frequentemente em regiões como a bacia do Mediterrâneo, Espanha, Península Ibérica, China, Oriente Médio e América do Sul. Nessa forma, a infecção é causada principalmente pela espécie *L. infantum* e tende a afetar principalmente cachorros, crianças e indivíduos imunocomprometidos (GÁLVEZ et al., 2020; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Por outro lado, a forma antroponótica é caracterizada pela transmissão de humano para humano, sem a presença de um reservatório animal intermediário. Essa forma é causada principalmente por *L. donovani* e é prevalente na África Oriental, Bangladesh, Índia e Nepal, podendo afetar pessoas de todas as faixas etárias (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

O Brasil é o país com o maior número de casos de LV nas Américas, sendo a região Nordeste considerada uma área endêmica para a doença, uma vez que é responsável pelo maior índice de morbidade e mortalidade do país (RIBEIRO et al., 2021). Todavia, nos últimos anos, as áreas de transmissão têm se expandido devido à migração do vetor do seu habitat natural para áreas urbanas. Esse fenômeno resulta em um aumento significativo da incidência da doença e na presença da LV humana em 23 das 27 unidades federais (compostas por 26 Estados e o Distrito Federal) no ano de 2021 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). A crescente expansão de casos de leishmaniose no Brasil pode ser atribuída a vários fatores, incluindo a migração de pessoas, aumento de animais domésticos positivos em regiões endêmicas, condições socioeconômicas precárias, urbanização, mudanças climáticas e outros fatores ambientais como o desmatamento (BORGES et al., 2022).

O mecanismo de transmissão ocorre quando o flebotomíneo realiza a hematofagia no hospedeiro vertebrado, ingerindo a forma amastigota que se encontra parasitando os fagócitos. No intestino do flebotomíneo, as formas amastigotas se desenvolvem em promastigotas, passando por uma série de alterações morfológicas denominadas nectomonas, haptomonas, leptomonas, retroleptomonas e por fim, metacíclicas - sendo esta última a forma infectiva do parasito. Promastigotas metacíclicas, por sua vez, irão infectar o hospedeiro durante o repasto sanguíneo, quando o flebotomíneo regurgita as formas infectantes no sítio de picada juntamente com a injeção de saliva. Promastigotas invadem as células do sistema fagocítico de humanos, permanecendo alojados em vacúolos que irão se fundir com lisossomos e estes parasitas se diferenciam em amastigotas (Figura 2). Na LV, os parasitos são capazes de sobreviver e se multiplicar dentro dos fagolisossomos dos

macrófagos e de se disseminar pelo sistema linfático, alcançado assim o sistema retículo endotelial, infectando principalmente células do baço, fígado, linfonodos e medula óssea (SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012) .

**Figura 2.** Representação do ciclo de vida de *Leishmania infantum*.



Esquema representando a morfologia e o ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fonte: SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA, 2020.

A infecção por *Leishmania* sp. requer a invasão dos macrófagos, sendo esse processo essencial para o estabelecimento da infecção. Macrófagos residentes na pele e neutrófilos são as primeiras células a serem infectadas por *Leishmania* sp. Os neutrófilos possuem um papel importante no estabelecimento inicial da infecção, pois quando infectados com promastigotas metacíclicas sofrem apoptose e são fagocitados por macrófagos através de vias mediadas por receptores, sem acionar respostas defensivas, atuando como “cavalos de Tróia”, entregando promastigotas vivos nos fagossomos dos macrófagos, onde os parasitas podem se diferenciar e multiplicar (KAYE; SCOTT, 2011; RODRIGUEZ *et al.*, 2018).

Durante a infecção por *Leishmania*, diversas respostas imunes são desencadeadas. Enquanto a imunidade protetora está associada principalmente a uma resposta *T-helper-1* (Th1), a suscetibilidade à infecção está relacionada a uma resposta *T-helper-2* (Th2) (RODRIGUEZ, *et al.*, 2018). A resposta imune Th1 é caracterizada pela produção inicial de Interleucina-12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos, que induzem os linfócitos



Th1 a secretarem Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Esses linfócitos Th1, por sua vez, promovem a ativação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, especialmente induzindo a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são altamente eficazes na eliminação de amastigotas intracelulares (RODRIGUES et al., 2016).

Por outro lado, a resposta imune mediada por linfócitos Th2 resulta na produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-13 e IL-10, as quais favorecem a sobrevivência do parasita dentro dos macrófagos, culminando em um fenótipo sem cura (BHOR; RAFATI; PAI, 2021). As respostas do tipo Th1 e Th2 podem ser encontradas em proporções variadas em infecções sintomáticas. No entanto, nas infecções crônicas, como é o caso da LV, observa-se uma predominância da resposta do tipo Th2 (COSTA-DA-SILVA et al., 2022).

Os dois principais fatores de virulência expressos pelo parasita durante a infecção e amplamente relatados na literatura são os lipofosfoglicanos (LPG) e a GP63 (leishmanolisina). Os LPGs desempenham um papel protetor ao parasita por destruírem as armadilhas extracelulares de neutrófilos, compostas por DNA filamentososo revestido com peptídeos antimicrobianos. Já a GP63 possui uma ação relevante ao clivar proteínas da célula hospedeira como fatores de transcrição, reguladores de tradução, proteínas envolvidas no processamento de micro-RNA e enzimas relacionadas ao controle apoptótico (DESCOTEAUX; PODINOVSKAIA, 2015; KAYE; SCOTT, 2011; RODRIGUEZ et al., 2018).

O quadro clínico de LV pode variar amplamente, desde pacientes assintomáticos até aqueles que enfrentam risco de óbito. Geralmente, esta doença apresenta sintomas iniciais inespecíficos, como febre, anemia e leucopenia, o que dificulta o diagnóstico preciso. Os parasitos que habitam a medula óssea, o fígado e o baço podem gradualmente causar hepatomegalia, esplenomegalia, febre e pancitopenia, disfunção hepática, icterícia, ascite e complicações hemorrágicas (DAGA; ROHATGI; MISHRA, 2021; RODRIGUEZ, et al., 2018). Em fases mais avançadas, os protozoários podem invadir o intestino, causando diarreia e má absorção (SCARPINI et al., 2022). Devido a variedade de sintomas e as complicações ocasionadas, o diagnóstico precoce e preciso de LV é fundamental para o tratamento adequado e a redução da mortalidade (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

O diagnóstico da LV é realizado por meio da integração de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Os métodos laboratoriais compreendem a demonstração direta de *Leishmania* em espécimes de tecido (amastigota intracelular) ou em cultura (promastigota), ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR), imunofluorescência, *western blot*, teste rápido para antígeno rK39, entre outros. As técnicas moleculares, como PCR e PCR quantitativa (qPCR), têm ganhado crescente destaque na pesquisa devido à sua alta sensibilidade e especificidade. São ferramentas valiosas para acompanhar a eficácia do tratamento, estimar a carga parasitária e determinar a espécie de *Leishmania* em diversas amostras (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; SCARPINI et al., 2022; TAKAMIYA et al.,

2023; THAKUR; JOSHI; KAUR, 2020). Contudo, a implementação desses ensaios nos serviços de saúde pública ainda representa um desafio, devido a questões como a falta de padronização, ausência de infraestrutura e a necessidade de pessoal especializado (DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015).

A escolha do tratamento pode variar de acordo com a imunidade, localização geográfica do paciente e a cepa do parasita (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Atualmente, os medicamentos existentes para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e sua formulação lipossomal, miltefosina, paromomicina e a pentamidina (PRADHAN *et al.*, 2022; SCARPINI *et al.*, 2022). No entanto, estes medicamentos exibem efeitos colaterais diversos, alta toxicidade, alto custo e baixa eficácia. Além disso, a resistência parasitária à fármacos está se tornando um problema crescente (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; PRADHAN *et al.*, 2022). Com o propósito de prevenir a resistência a medicamentos, aprimorar a adesão, encurtar a duração do tratamento e reduzir os efeitos colaterais, a imunoterapia, tanto individual quanto em combinação com fármacos, tem se tornado objeto de investigação e exibe resultados promissores (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; SCARPINI *et al.*, 2022). Além disso, as vacinas na terceira fase de teste estão atualmente sendo investigadas (PRADHAN *et al.*, 2022).

#### **1.4 Coinfecção por tripanossomatídeos monoxênicos e Leishmania**

Até pouco tempo, acreditava-se que somente tripanossomatídeos dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, e *Endotrypanum* fossem capazes de sobreviver em hospedeiros vertebrados. No entanto, a partir da década de 80, relatos cada vez mais frequentes indicam que tripanossomatídeos monoxênicos podem sobreviver em hospedeiros vertebrados, em especial indivíduos imunocomprometidos, porém também sendo detectados em pacientes imunocompetentes (BOUCINHA *et al.*, 2022; KAUFER *et al.*, 2017). As infecções por espécies monoxênicas em casos de leishmaniose mais relatados compreendem espécies dos gêneros *Crithidia* e *Leptomonas* (BOUCINHA *et al.*, 2022; KAUFER *et al.*, 2017).

Na Índia, nos anos de 2010 e 2012, pesquisadores reportaram infecções mistas de *Leptomonas* spp. e *L. donovani* em pelo menos 7,5% dos isolados clínicos de pacientes residentes em zonas de resistência a medicamentos antimoniais. Estes resultados foram obtidos através de PCR e sequenciamento dos genes 18S e ITS-1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) (GHOSH *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2010). Em 2013, Singh e colaboradores, através do sequenciamento de genoma completo de aspirados esplênicos, identificaram DNA de *Leptomonas seymouri* em coinfecção com *L. donovani* em amostra de dois pacientes.

Em 2019, Ghobakhloo e colaboradores, realizaram a coleta de amostras diretamente de lesões e verificaram os agentes causadores de LC na Índia, através de microscopia e sequenciamento do gene gGAPDH. Em nove de 167 amostras testadas, foram co-detectados

*Leishmania major* e *Crithidia* spp., e em três amostras apenas o gene gGAPDH correspondente a *Crithidia* spp. foi determinado (GHOBAKHLOO *et al.*, 2019). No mesmo ano, no estado de Sergipe, Brasil, parasitas relacionados ao gênero *Crithidia* (denominados de *Crithidia* sp. LVH60A) foram relatados pela primeira vez em um paciente HIV-negativo, que veio a óbito devido a complicações de LV (MARUYAMA *et al.*, 2019). Através de análises genômicas, os autores apontaram que os isolados obtidos do paciente com LV não correspondiam à espécie *C. fasciculata* e poderiam indicar uma nova espécie deste gênero (MARUYAMA *et al.*, 2019).

Em maio de 2023, análises genômicas confirmaram a presença de parasitas *Crithidia* sp. LVH60A em culturas isoladas de medula óssea e baço de um paciente com leishmaniose visceral refratária e recidivante (ROGERIO *et al.*, 2023). Os pesquisadores identificaram tanto a espécie *Crithidia* sp. LVH60A quanto *Leishmania infantum* em culturas de baixa passagem, evidenciando a coinfeção do paciente com ambos os parasitas em 2017 (ROGERIO *et al.*, 2023). Recentemente, *Crithidia* sp. LVH60A foi identificada em culturas de quarenta e oito isolados clínicos de pacientes com LV e em três amostras de medula óssea em coinfeção com *L. infantum* (TAKAMIYA *et al.*, 2023).

Em 2020, Takahashi conduziu o sequenciamento do genoma do isolado clínico LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) utilizando as tecnologias de Illumina e Oxford nanopore. Como resultado, o genoma deste organismo foi organizado em 38 cromossomos, com um tamanho final de 34,4 Mb. As análises genômicas realizadas por Takahashi (2020), revelaram uma notável sintenia entre o genoma do *Crithidia* sp. LVH60A e o de *C. fasciculata*. Entretanto, alguns rearranjos genéticos foram identificados e estão detalhados na tabela 1.

**Tabela 1.** Características do genoma de *Crithidia* sp. LVH60A e sintenia com *C. fasciculata* cepa CfCl.

<i>Crithidia</i> sp. LVH60A		<i>C. fasciculata</i>	
Cromossomo	Comprimento (pb)	Sintenia com cromossomo de <i>C. fasciculata</i> (em kb)	Porcentagem de cobertura no cromossomo de <i>C. fasciculata</i>
1	12018	-	-
2	19095	-	-
3	179582	Chr 12 (142)	Chr 12 - 20 %
4	212911	Chr 8 (216)	Chr 8 - 33%
5	307358	Chr 29 (291)	Chr 29 - 13%
6	318858	Chr 15 (223) + Chr 28 (66)	Chr 15 - 27%; Chr 28 – 3%
7	320550	Chr 22 (313)	Chr 22 – 2%

8	333127	Chr 6 (290)	Chr 6 – 46%
9	397493	Chr 16 (355)	Chr 16 – 43%
10	424022	Chr 16 (414)	Chr 16 – 50%
11	454187	Chr 6 (321)	Chr 6 – 51%
12	479386	Chr 8 (635)	Chr 8 – 98%
13	522973	Chr 1 (509)	Chr 1 – 98%
14	609261	Chr 3 (564)	Chr 3 – 97%
15	623946	Chr 4 (584)	Chr 4 – 99%
16	624211	Chr 5 (611)	Chr 5 – 99%
17	642655	Chr 12 (653)	Chr 12 – 88%
18	654970	Chr 7 (632)	Chr 7 – 99%
19	658402	Chr 15 (645)	Chr 15 – 79%
20	710710	Chr 9 (661)	Chr 9 – 99%
21	751230	Chr 11 (715)	Chr 11 – 98%
22	826861	Chr 13 (761)	Chr 13 – 99%
23	829291	Chr 17 (822)	Chr 17 – 99%
24	834559	Chr 14 (785)	Chr 14 – 99%
25	904112	Chr 2 (523) + Chr 29 (301)	Chr 2 – 98%; Chr 29 – 13%
26	918833	Chr 10 (667)	Chr 10 – 99%
27	971786	Chr 18 (917)	Chr 18 – 99%
28	1000058	Chr 22 (991)	Chr 22 – 75%
29	1194408	Chr 20 (1118)	Chr 20 – 98%
30	1292868	Chr 21 (1288)	Chr 21 - 98%
31	1440346	Chr 23 (1309)	Chr 23 – 92%
32	1457499	Chr 25 (1300)	Chr 25 – 89%
33	1613826	Chr 24 (1443)	Chr 24 – 99%
34	1645447	Chr 26 (1446)	Chr 26 – 88%
35	2180050	Chr 27 (1564)	Chr 27 – 78%
36	2239518	Chr 28 (1978)	Chr 28 – 90%
37	2798163	Chr 19 (1089) + Chr 29 (1575)	Chr 19 – 99%; Chr 29 – 71%
38	2988870	Chr 30 (2960)	Chr 30 – 99%

\*Porcentagem aproximada de cobertura no cromossomo de *C. fasciculata*; Chr: cromossomo;

Fonte: Adaptado de TAKAHASHI, 2020.

Estudos que identificam parasitas monoxênicos em casos de leishmaniose resistentes ao tratamento e recidivante levantam a possibilidade que a ausência de resposta terapêutica e a gravidade da doença possam estar associados à coinfeção de *Leishmania* sp. e espécies monoxênicas (GHOSH *et al.*, 2012; ROGERIO *et al.*, 2023). No entanto, nenhum dos estudos descreve o papel desses organismos na patologia da doença. Além disso, possíveis formas de contágio ainda são desconhecidas, mas uma possibilidade seria através do inseto vetor da leishmaniose, uma vez que tripanossomatídeos monoxênicos foram identificados em diversas espécies de flebotomíneos (TANURE *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022) e em mosquitos do gênero *Cuiloidea*, em conjunto com *L. martiniquensis* e *L. orientalis* (SONGUMPAI *et al.*, 2022). Um estudo aprofundado sobre a biologia destes isolados clínicos aparentemente monoxênicos pode proporcionar um aumento significativo no conhecimento sobre o possível papel destes organismos no processo patogênico.

O ciclo de vida da espécie *Crithidia fasciculata* se inicia quando culicídeos ingerem amastigotas eliminadas com as fezes de outros hospedeiros. Em seguida, as amastigotas se diferenciam em coanomastigotas e se multiplicam, colonizando o intestino destes insetos. Posteriormente, as coanomastigotas se diferenciam novamente em amastigotas, e se fixam ao epitélio intestinal. Os mosquitos adultos infectados contaminam ambientes aquáticos com amastigotas, bem como flores quando se alimentam de néctar. As amastigotas são liberadas nas fezes ou em todo o corpo do inseto morto. Eventualmente, as larvas e pupas dos mosquitos se infectam no ambiente aquático e, finalmente, as amastigotas serão transmitidas ao mosquito adulto durante a metamorfose, completando assim o ciclo de vida (ALCOLEA *et al.*, 2014). Embora esses parasitas sejam polimórficos, dois estágios são claramente distinguidos. A forma celular coanomastigotas é representada por células arredondadas e truncadas no polo apical pela bolsa flagelar em forma de funil. Já a forma celular amastigota, são células extracelulares, redondas e imóveis com um flagelo não emergente do corpo celular (ALCOLEA *et al.*, 2014).

As espécies pertencentes ao gênero *Crithidia* exibem uma notável amplitude de especificidade de hospedeiro, sendo capazes de parasitar uma variedade de espécies pertencentes às ordens Diptera, Hemiptera e Hymenoptera. É importante ressaltar que essa especificidade pode variar substancialmente dependendo da espécie de parasita. Por exemplo, *C. fasciculata* é conhecido por ter como hospedeiro natural algumas espécies de mosquitos, tais como *Culex pipens*, *Mansonia africanus* e *Aedes aegypti* (VOTÝPKA; RAY; LUKES, 2001; WALLACE, 1966).

Um estudo que envolveu infecções experimentais revelou a impressionante capacidade de *C. fasciculata* de infectar as espécies *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti*, atingindo uma taxa de infecção de 100%. Embora tenha sido observada uma quantidade limitada de parasitas no intestino posterior (crop) e no intestino

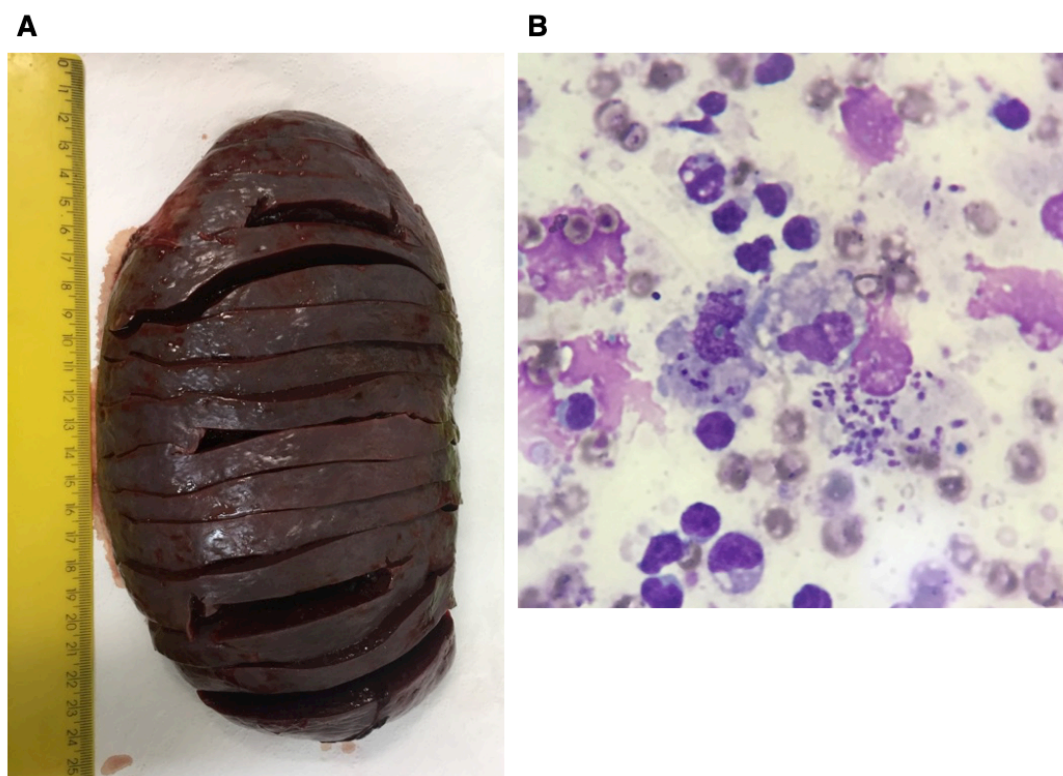
médio, a grande maioria das células de *C. fasciculata* aderiu ao revestimento do intestino posterior e às papilas retais. Essa descoberta sugere que mesmo um número reduzido de parasitas que alcança o intestino posterior do mosquito é capaz de colonizá-lo e replicar-se (FILOSA et al., 2019).

### **1.5 Apresentação do Caso Clínico**

O paciente BASF, do sexo masculino, residente de Aracaju-SE, com 9 anos quando foi admitido pela primeira vez em 2016 no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, apresentou um quadro grave de LV. O paciente foi submetido ao tratamento conforme recomendações do Ministério da Saúde e atingiu critérios para alta hospitalar. Após seis meses, o paciente apresentou recidiva e necessitou de segunda internação devido a sintomas graves de LV, e posteriormente ao novo tratamento, preencheu os critérios de alta médica.

Entretanto em março de 2017 o paciente deu entrada no hospital apresentando baixo peso, palidez cutaneomucosa e hepatoesplenomegalia. Durante esta terceira internação, a cepa do parasita denominada LVH117 foi isolada de sua medula óssea e o paciente completou o tratamento e foi considerado apto para receber alta médica. Todavia, em maio de 2017, o paciente foi internado pela quarta vez, apresentando sintomas graves de LV, incluindo esplenomegalia. O tratamento foi realizado por administração de Anfotericina B lipossomal, associada à Acetilcisteína e em junho de 2017 o paciente foi submetido a esplenectomia, na qual foi confirmada a presença de múltiplas amastigotas no espécime esplênico (Figura 3). Neste ponto, a cepa do parasita LVH120 foi isolada do baço do paciente, que recebeu alta hospitalar após a cirurgia para remoção do baço.

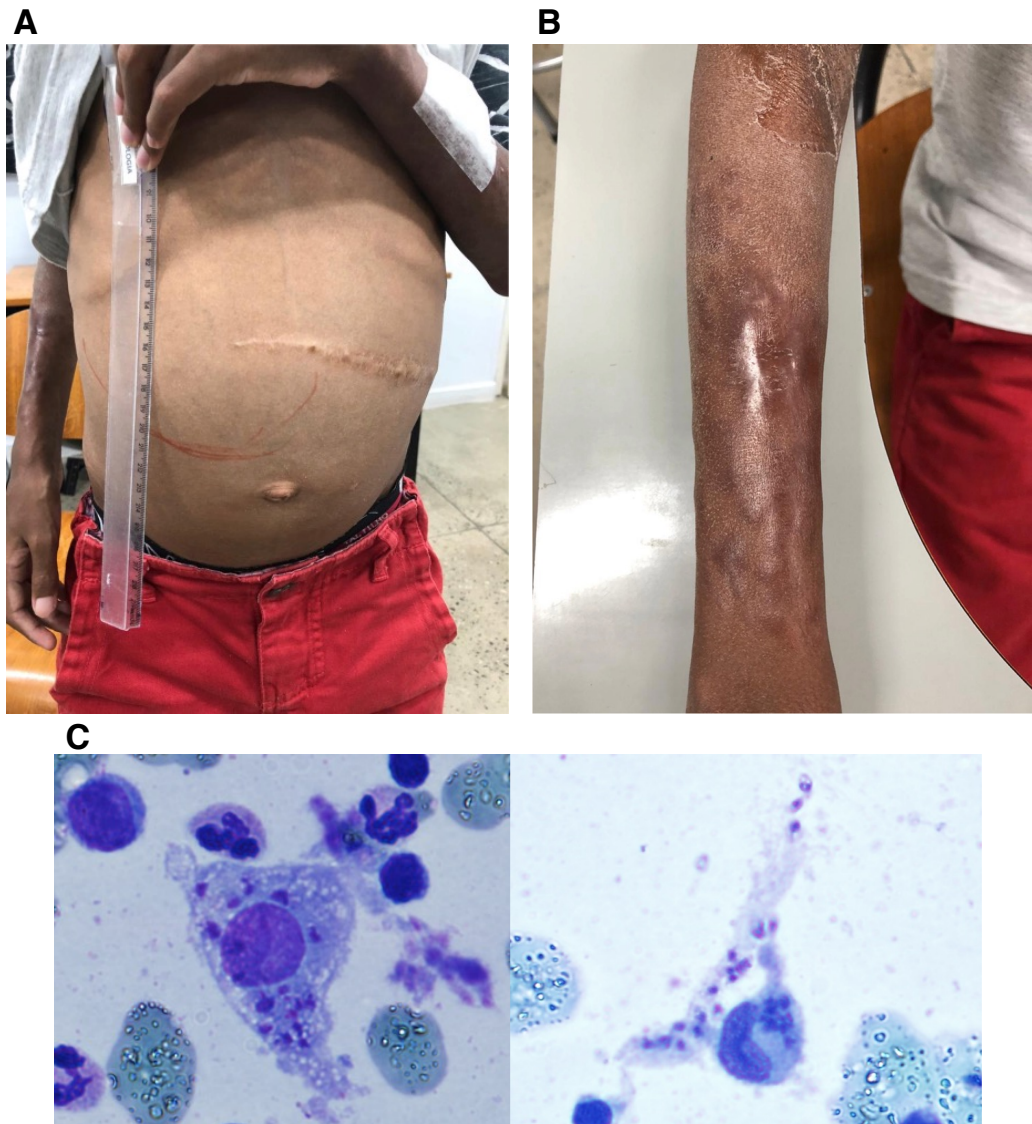
**Figura 3.** Apresentação clínica do paciente BASF durante sua quarta internação no ano de 2017.



**(A)** Esplenomegalia demonstrando um caso grave e recidivante de Leishmaniose Visceral; **(B)** Macrófagos infectados com múltiplas amastigotas a partir de um espécime esplênico. Fonte: ROGERIO *et al.*, 2023.

Em janeiro de 2020, três anos após última recidiva, o paciente foi readmitido e internado pela quinta vez apresentando distensão abdominal e lesões cutâneas papulosas não ulcerativas disseminadas nos membros superiores (Figura 4A e 4B). Neste momento, as cepas de parasitas LVH161 e LVH161a foram obtidas de sua medula óssea e biópsia de pele, respectivamente. A LV foi confirmada através da visualização de estruturas amastigotas por exame microscópico de aspirado de medula óssea (Figura 4C). O tratamento foi realizado e o paciente atingiu os critérios de alta hospitalar.

**Figura 4.** Apresentação clínica do paciente BASF em sua quinta internação no ano de 2020.

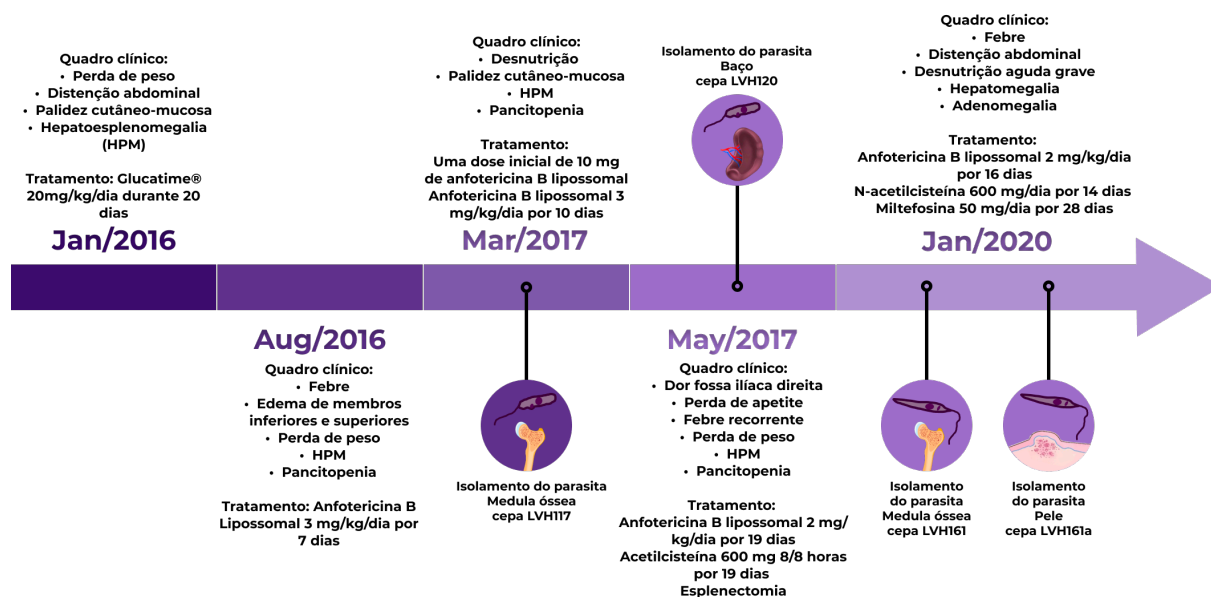


**(A)** Desnutrição Grave e Hepatomegalia; **(B)** lesões nodulares nos membros superiores; **(C)** Macrófagos infectados com amastigotas a partir do aspirado de medula óssea. Fonte: ROGERIO *et al.*, 2023.

Em todas as internações hospitalares do paciente, a LV foi confirmada por meio de teste positivo para o antígeno RK-39. Os principais aspectos do caso de LV foram diagramados na Figura 5 para uma visão abrangente da evolução do caso clínico, permitindo uma melhor compreensão da trajetória do tratamento e da persistência da doença.



**Figura 5.** Linha do tempo de um paciente infantil do sexo masculino com leishmaniose visceral refratária e recidivante no Brasil.



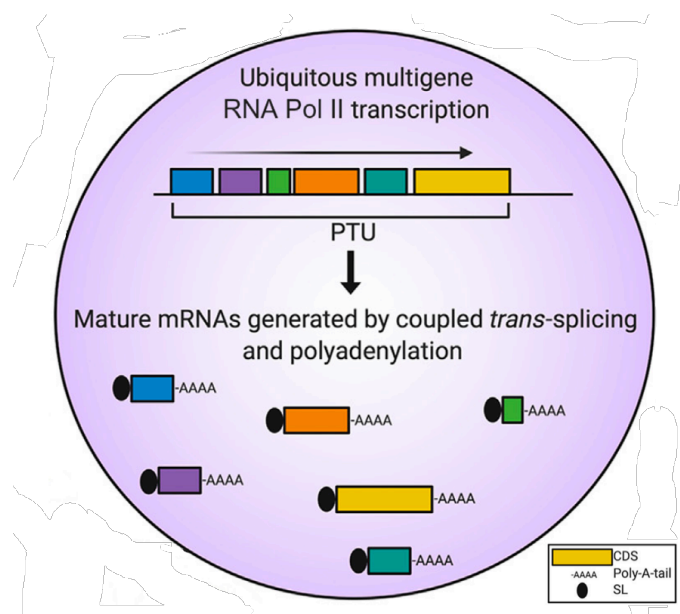
A imagem mostra as diferentes internações hospitalares do paciente ao longo dos anos, juntamente com os principais sintomas observados durante cada período e o tratamento recebido para a leishmaniose visceral desde 2016. Fonte: Adaptado de ROGERIO *et al.*, 2023.

### 1.6 Genômica e transcriptômica de *Leishmaniinae*

Os genomas das espécies de *Leishmania* variam de 29 Mb (Mega base) - *L. amazonensis* a 33 Mb - *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, distribuídos em um número variável de cromossomos (34 a 36 cromossomos), enquanto parasitas monoxênicos da mesma subfamília variam de 27 Mb (*Leptomonas seymouri*) a 41 Mb (*Crithidia fasciculata*). Os genomas destes protozoários se caracterizam por uma alta densidade gênica, no qual os genes codificadores de proteínas não possuem íntrons e as regiões intergênicas são extremamente curtas. Os genes se arranjam *in tandem* organizando-se em *clusters* gênicos, os quais não necessariamente estão funcionalmente relacionados, como observado nos operons bacterianos (MASLOV *et al.*, 2018).

A transcrição dos genes em tripanossomatídeos é realizada pela RNA Polimerase II (Pol II) de forma policistrônica e bidirecional a partir das regiões *strand switch* (DAMASCENO *et al.*, 2021; MASLOV *et al.*, 2018). Os locais de início de transcrição não possuem sequências promotoras claras e são marcados pelo acúmulo de variação nas histonas, nucleossomos ordenados e moléculas híbridas de RNA-DNA, chamadas de R-loops (DAMASCENO *et al.*, 2021). Por causa de sua falta de controle transcricional, os tripanossomatídeos utilizam mecanismos adaptativos para regular a expressão gênica, onde RNAs mensageiros (RNAm) precursores são processados através de mecanismos de *trans-splicing* no qual é adicionado uma sequência de *spliced leader* (SL) de 39 nucleotídeos na extremidade 5' seguida de poliadenilação, onde vários resíduos de adenina são adicionados na extremidade 3' (Figura 6) (DAMASCENO *et al.*, 2021; DAS; BANDAY; BELLOFATTO, 2008).

**Figura 6.** Transcrição e processamento de mRNA em tripanossomatídeos



Transcrição de unidades policistrônicas por RNA Pol II e as reações subsequentes para gerar RNAm maduros. Fonte: Adaptado de DAMASCENO *et al.*, 2021.

As tecnologias “-ômicas” estão sendo cada vez mais aplicadas em estudos que investigam determinantes dos diferentes tipos de manifestações clínicas e da biologia de parasitas, tornando-se uma importante ferramenta para compreender a biologia das diferentes espécies de *Leishmania* e suas complexas interações parasita-hospedeiro-vetor através de análises genômicas e transcriptômicas (CANTACESSI *et al.*, 2015; CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019).

Inicialmente, a análise genômica comparativa de diferentes espécies de *Leishmania* revelou uma notável conservação nos genomas e sintonia gênica, bem como a presença de um número limitado de genes específicos para cada espécie (CANTACESSI *et al.*, 2015; PEACOCK *et al.*, 2007). A maioria destes genes codifica proteínas cujas funções ainda são desconhecidas, mas que se acredita terem um papel no tropismo e na patologia relacionados às diversas formas de leishmaniose (ROGERS *et al.*, 2011).

O sequenciamento do genoma seguido por análises comparativas tem sido usado para detectar variantes de nucleotídeo único (SNVs), variação do número de cópias de genes (CNV) e aneuploidia (CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019; ROGERS *et al.*, 2011). Estas abordagens permitiram a identificação de variações genéticas associadas à virulência do protozoário e à resistência a drogas, bem como marcadores moleculares que podem servir como prognóstico no tratamento com determinados fármacos (CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019; LYPACZEWSKI *et al.*, 2018). Adicionalmente, segundo Lypaczewski e colaboradores (2018) a montagem completa de diversos genomas e a comparação de diversos isolados clínicos resultará em novas informações sobre fatores de virulência, as quais contribuirão para

a identificação de novos alvos de drogas mais eficazes para cada espécie ou isolado deste protozoário.

O sequenciamento de RNA (RNA-seq) tem se destacado como uma ferramenta de grande potencial para entender a biologia molecular das espécies de *Leishmania* ao estudar as mudanças significativas na expressão gênica dos diversos estágios do ciclo celular, tanto em culturas quanto no inseto vetor, assim como a resposta imune do hospedeiro durante a infecção por *Leishmania*. Além disso, o transcriptoma desempenha um papel fundamental no aprimoramento da anotação genômica e na compreensão da estrutura gênica (CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019; SALLOUM; TOKAJIAN; HIRT, 2021).

Caracterizar os perfis globais de expressão gênica e os eventos de reprogramação transcriptômica em patógenos intracelulares e células hospedeiras ao mesmo tempo representa um passo fundamental para a compreensão mais aprofundada das complexidades das interações hospedeiro-patógeno, ao mesmo tempo que possibilita a identificação de redes de coexpressão específicas, as quais podem ser valiosas para análises comparativas entre diferentes espécies do mesmo gênero (CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019). A análise simultânea dos perfis de expressão gênica de parasitas e hospedeiros é uma etapa fundamental para o entendimento da doença. No entanto, há poucos estudos que utilizaram esta abordagem (DILLON *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2016; FORRESTER *et al.*, 2022).

Considerando a elevada incidência de tripanossomatídeos monoxênicos em casos de leishmaniose visceral, este trabalho visa caracterizar isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A provenientes de um caso atípico de leishmaniose visceral utilizando abordagens moleculares, fenotípicas, genômicas e transcriptômicas que possam fornecer *insights* sobre a permanência e o isolamento deste parasito em hospedeiro vertebrado, assim como obter mais informações sobre o fenótipo deste parasita recém-descrito. O estudo deste parasita proporcionou um aumento significativo no conhecimento acerca do possível papel de tripanossomatídeos monoxênicos em processos patogênicos e abrirá uma nova rota de pesquisa a cerca do tema.

## ***OBJETIVOS***

## 2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal caracterizar o fenótipo e o genoma de isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A obtidos de um caso de leishmaniose visceral recidivante, assim como investigar a expressão gênica diferencial de parasitas *Crithidia* sp. LVH60A e macrófagos U937, a partir do dual mRNA-seq de infecções *in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

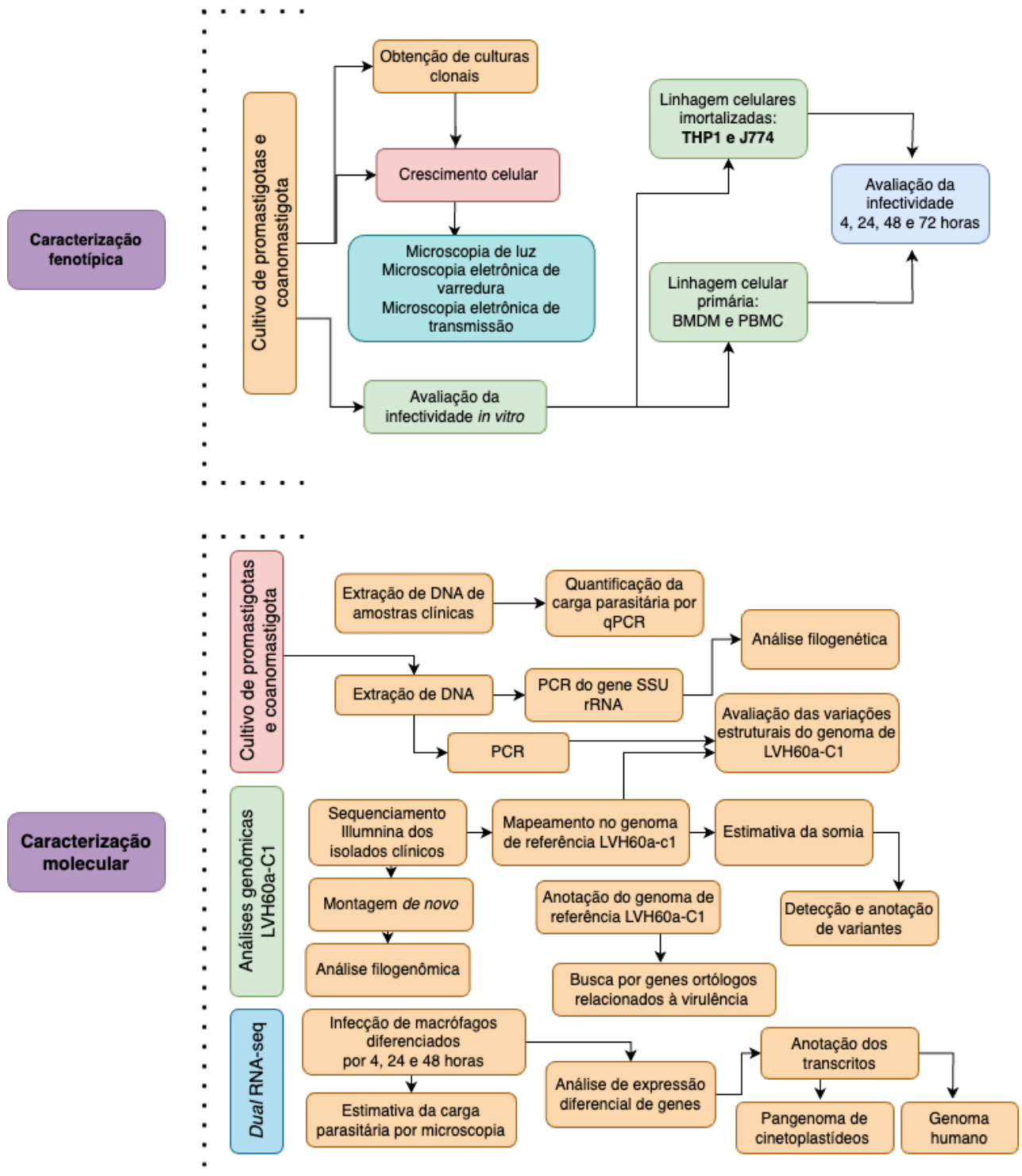
- 1) Avaliar o efeito da temperatura na cinética de proliferação *in vitro* dos isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A;
- 2) Avaliar a morfologia de parasitos *Crithidia* sp. LVH60A em comparação a *C. fasciculata* e *L. infantum*;
- 3) Avaliar a infectividade de isolados *Crithidia* sp. LVH60A;
- 4) Identificar *in silico*, genes que codificam proteínas homólogas relevantes para a sobrevivência e virulência do parasito no genoma referência de *Crithidia* sp. LVH60A;
- 5) Realizar análises de Genômica Comparativa de isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A;
- 6) Realizar análise de *Dual* Transcriptômica para i) avaliar as modificações na expressão transcricional de macrófagos humanos em resposta à infecção por diferentes cepas de *Crithidia* e *Leishmania*; e ii) investigar a expressão de transcritos diferencialmente expressos compartilhados entre *Leishmania* spp. e *Crithidia* sp. LVH60A, em comparação com *C. fasciculata*.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 7 exibe um fluxograma que resume as etapas e atividades realizadas durante a execução deste trabalho.

**Figura 7.** Fluxograma dos experimentos e análises executadas durante o desenvolvimento deste trabalho.



BMDM: Macrófagos derivados de medula óssea; PBMC: Células mononucleares do sangue periférico; SSU rRNA: Subunidade menor do RNA ribossomal de 18S; PCR: Reação da cadeia em polimerase.

### **3.1 Obtenção das amostras e isolados clínicos**

O manejo clínico do paciente BASF foi realizado de acordo com as diretrizes nacionais do Ministério da Saúde do Brasil e as coletas de amostras foram realizadas conforme regulamentado pelo Sistema Brasileiro de Avaliação de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/CONEP) sob aprovação do comitê de ética local (Universidade Federal de Sergipe, protocolos #CAAE 0151.0.107.000-07 e #CAAE 04587312.2.0000.0058). O responsável legal assinou um termo de consentimento informado.

### **3.2 Cultivo de promastigota de *Leishmania* e coanomastigota de *Crithidia***

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as seguintes culturas de parasitos: i) LVH117, LVH120, LVH161 e LVH161a, isoladas do paciente BASF; ii) LVH60 e LVH60a, isolados do paciente que veio a óbito devido à complicações de LV (MARUYAMA *et al.*, 2019); iii) *C. fasciculata* cepa TCC039E da Coleção de Culturas de Tripanossomatídeos da USP (Departamento de Parasitologia, ICB), cedidas gentilmente pela professora Dra. Lucile M. F. Winter (IB-USP/SP); iv) *L. infantum* cepa HUUFS14, obtido de um paciente com leishmaniose visceral na região de Sergipe-PE; v) *L. infantum* cepa PP75, adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC), obtido de uma criança em Ituaçu-BA.; vi) *L. major* cepa IRAQ.

Criotubos contendo os isolados de tripanossomatídeos foram retirados do container criogênico e descongelados em gelo. As culturas foram mantidas em meio Schneider contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, 1% de antibiótico (Penicilina e Estreptomicina) e 2% de urina masculina filtrada. O cultivo e o crescimento foram realizados a 25 °C em estufa microbiológica e o repique foi realizado a cada 4 a 7 dias.

### **3.3 Obtenção de clones a partir das culturas promastigotas**

Foram empregadas técnicas bacteriológicas modificadas para isolar populações clonais. O meio de cultura utilizado para a seleção de clones consistiu em uma concentração de 1,25% de ágar bacteriológico autoclavado em meio Schneider completo. Uma quantidade aproximada de 15 mL desse meio foi pipetada em placas de Petri. Após a solidificação, as placas foram lacradas e incubadas a 37 °C durante a noite para confirmar a esterilidade do meio.

O plaqueamento dos isolados foi conduzido com a utilização de 40 µL da cultura, utilizando uma alça de inoculação microbiológica estéril descartável. Em seguida, a placa foi lacrada novamente e mantida em uma estufa microbiológica a 25 °C. Observações diárias foram realizadas para monitorar a formação de colônias. O isolamento dos clones foi efetuado utilizando palitos de dente esterilizados, os quais foram homogeneizados diretamente em uma garrafa de cultivo contendo 5 mL de meio Schneider completo.



As culturas de parasitos clonais obtidas e utilizadas neste trabalho foram: LVH60 C3, LVH60a C1, LVH117 C1, LVH117 C2, LVH120 C4, LVH120 C5 e LVH161 C6. Detalhes sobre o local e data de isolamento dos parasitos e seu emprego nos experimentos estão fornecidos na Tabela 1 do apêndice.

### **3.4 Caracterização fenotípica**

#### **3.4.1 Proliferação celular**

Culturas policlonais e/ou clonais dos isolados clínicos BASF (LVH117, LVH120, LVH161, LVH161a, LVH60a C1), *C. fasciculata* (TCC039E), *Crithidia* sp. LVH60A (LVH60a C1) e *L. infantum* (HUUFS14 e PP75) foram semeadas em triplicata em placas de 12 poços. Cada poço continha  $2 \times 10^5$  células por mL de meio Schneider completo. A realização das contagens dos parasitos foi realizada através da diluição 1:100 das amostras em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X + formaldeído 2%. A seguir, 10 uL dessa mistura foi inserida na câmara de Neubauer para a contagem dos cinco quadrantes da diagonal localizados no quadrante central. O número total de células foi obtido através da fórmula:  $(Q1+Q2+Q3+Q4+Q5) \times 5 \times 10^2 \times 10^4$ .

As placas foram mantidas a 25 °C (para simular a temperatura no inseto vetor) e 35 °C (para simular a temperatura no hospedeiro mamífero) e a contagem celular foi realizada durante um período consecutivo de 7 a 8 dias. O experimento foi realizado em três eventos diferentes. Os valores obtidos foram analisados através do teste estatístico two-way ANOVA pelo programa GraphPrism 9.0.

O cálculo do tempo de duplicação a 25 °C para as cepas *Crithidia* sp. LVH60a, *L. infantum* e *C. fasciculata* foi realizado com base nas contagens do primeiro até o quinto dia da curva de crescimento. O tempo de duplicação foi calculado pela fórmula apresentada abaixo, seguindo a metodologia de Roth, (2006), disponível em <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

$$\text{Tempo de duplicação} = \frac{\text{duração} * \log(2)}{\log(\text{Concentração final}) - \log(\text{Concentração inicial})}$$

#### **3.4.2 Microscopia de luz**

Esfregaços de culturas dos isolados clínicos, cultivadas 25 °C, foram preparadas em lâminas de microscópio e submetidas à coloração utilizando o kit Panótico Rápido (Laborclin). Esta coloração permitiu visualizar o flagelo, cinetoplasto, núcleo e a morfologia celular. As imagens dos parasitos foram capturadas com câmera DP72 Olympus acoplada ao microscópio de luz Olympus BX50F em objetiva de imersão (100X), no laboratório de Citogenética de Peixes do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da UFSCar.

### 3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

O protocolo utilizado para a preparação de células foi descrito por Gluenz et al., (2015) modificado. Após a etapa de desidratação, as lamínulas foram revestidas utilizando o reagente HMDS (*Hexamethyldisilazane* – Sigma) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, o excesso de reagente foi removido, e as lamínulas foram submetidas à secagem em um dessecador por 30 minutos, ou até que estivessem completamente secas.

As lamínulas foram fixadas em *stubs* utilizando cola de carbono e posteriormente revestidas com uma fina camada de partículas de ouro e/ou carbono. A captura das imagens dos parasitas foi realizada no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), no laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) através da aprovação das propostas de pesquisa SEM-C2-26215 e SEM-C2-27188, utilizando o microscópio Inspect F50 (FEI Company, Japão).

A análise morfométrica das imagens foi realizada com o *software* Digimizer. Cepas de *L. infantum* (HUUFS14 e PP75) e *C. fasciculata* (TCC039E) foram utilizadas para comparação.

### 3.4.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Visando a análise morfológica e estrutural dos isolados *Crithidia* sp. LVH60A (LVH117 C1 e LVH60a C1) em dois estágios de crescimento diferentes (mid-log e estacionária), as células foram cultivadas em frascos de 75 mL e mantidas em estufa a 25 °C. Cada frasco continha  $50 \times 10^5$  células em 50 mL de meio Schneider completo.

No 2º e 7º dia de crescimento, 20 mL de cultura celular foram sedimentados durante 5 minutos à 500 x g e fixadas com glutaraldeído 2,5% em cacodilato de sódio 0,1M e tampão  $\text{CaCl}_2$  3mM durante 5 minutos à temperatura ambiente seguido de uma incubação de 24 horas em gelo. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes em cacodilato de sódio 0,1 M e tampão  $\text{CaCl}_2$  3 mM e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em cacodilato de sódio 0,1 M,  $\text{CaCl}_2$  3 mM e ferrocianeto de potássio 0,8% por 30 minutos.

As amostras foram colocadas em blocos de 1,5% agarose e corados em acetato de urânio 2% gelado durante a noite. Os blocos foram desidratados em etanol e acetona à temperatura ambiente. As células desidratadas foram infiltradas em resina Epon. Os blocos foram colocados em um forno a vácuo a 60 °C para serem polimerizados por 72 horas. As seções ultrafinas foram cortadas com um micrótomo (Leica Ultracut), coradas com 2% de acetato de urânio e citrato de chumbo de Reynold e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss LEO 906) a uma tensão de aceleração de 60 kV.

Para confirmação da fase de crescimento, foi realizada a contagem de células conforme descrito em 3.3.1., esfregação e coloração com o kit Panótico Rápido. Cepas de *L. infantum* (PP75) e *C. fasciculata* (TCC039E) foram utilizadas para fins de comparação. O experimento de MET foi conduzido no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, em colaboração com os professores Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Dr. Sílvia Roberto Consonni.

### **3.4.5 Avaliação da infectividade *in vitro***

#### **3.4.5.1 Infecção *in vitro* com linhagens celulares imortalizadas**

A fim de avaliar a infectividade de parasitas *Crithidia* sp. LVH60A, este experimento foi conduzido utilizando as células THP-1 (linhagem celular humana derivada de leucemia monocítica aguda) e J774 (macrófago provenientes de *Mus musculus*). As células foram mantidas em frascos com meio RPMI completo (10% SBF) em estufa a 37 °C em tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas até a 10<sup>a</sup> passagem. A viabilidade das células foi determinada utilizando o corante azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer dos quatro quadrantes laterais. O número de células foi obtido através da fórmula:  $(Q1+Q2+Q3+Q4)/4 \times 10 \times 10^4 \times 2$ .

Para os experimentos utilizando a linhagem THP-1, as células foram distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 10 mm previamente colocadas, na concentração de  $5 \times 10^5$  /mL. As células foram tratadas com 0,1 uM de PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate - Sigma-Aldrich) e incubadas durante 48 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, para induzir sua diferenciação em macrófagos. Após estímulo com PMA, as células foram lavadas com meio RPMI incompleto para posterior infecção.

Já para os experimentos utilizando a linhagem J774, os macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$  /mL. As células foram mantidas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, antes da realização da infecção. Foram utilizadas para os experimentos de infecção *in vitro* cepas de *Crithidia* sp. LVH60A (LVH117 C1, e LVH60a C1), *C. fasciculata* (TCC039E) e *L. infantum* (HUUFS14) na fase estacionária, obtidas no 7<sup>o</sup> dia da passagem, com multiplicidade de infecção (MOI) 10:1. As placas contendo macrófagos e promastigotas foram incubadas por 4 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os poços foram lavados três vezes com RPMI para remoção dos parasitas livres e as células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4, 24, 48 e 72 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

### 3.4.5.2 Infecção *in vitro* com cultura celular primária

Camundongos BALB/c foram obtidos do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório), UNICAMP. Todos os procedimentos realizados com animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP número 4797-1/2018 em colaboração com o Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho.

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram obtidos de camundongos BALB/c com idades entre 4 e 6 semanas, conforme descrito anteriormente (ZAMBONI; RABINOVITCH, 2003). Após 7 dias de diferenciação, BMDM foram plaqueados na concentração de  $3 \times 10^5$  células em meio RPMI completo em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Posteriormente, as células foram mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> para subsequente infecção.

BMDM foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* (PP75, HUUFS14) e *Crithidia* sp. LVH60A (cepas LVH117 C1 e LVH60a C1) em fase estacionária de crescimento em uma proporção de MOI 10:1 por 3 horas a 34 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS aquecido e incubados com 500 µL de RPMI completo a 34°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24, 48 e 72 horas. Este experimento foi repetido mais uma vez utilizando as cepas *L. infantum* (HUUFS14), *Crithidia* sp. LVH60A (LVH117 C1 e LVH60a C1) e *C. fasciculata* (TCC039E) utilizando a mesma multiplicidade de infecção e os mesmos tempos de infecção. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Foi realizado um experimento piloto utilizando macrófagos diferenciados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). O Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCar aprovou a coleta de material biológico para fins de pesquisa (protocolo 40539520.9.0000.5504 – Plataforma Brasil). As células PBMC foram isoladas a partir de aproximadamente 15 mL sangue total obtidos de voluntários utilizando o reagente Ficoll (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. A viabilidade das células foi determinada utilizando o corante azul de Tripán e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer dos quatro quadrantes laterais como descrito no item 3.3.5.1. As células foram distribuídas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 10 mm previamente colocadas, na concentração de  $2,5 \times 10^6$  /mL, onde foram incubadas por 6 dias em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, para aderência das células e posterior infecção.

Foram utilizadas para a infecção *in vitro* células promastigotas de *Crithidia* sp. LVH60A (cepa LVH60a C1) e *L. infantum* (cepa HUUFS14) na fase estacionária, obtidas no 5º dia da passagem, na concentração de  $12,5 \times 10^6$  /mL (MOI 5:1). Estas culturas foram incubadas por 3 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os poços foram lavados três vezes com

RPMI para remoção dos parasitas livres e as células foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.4.5.3 Avaliação das infecções *in vitro*

Para confirmar a infecção, as lamínulas presentes no fundo dos poços foram coradas com panótico rápido e visualizadas em microscópio óptico sob objetiva de 100X. A porcentagem de infecção foi calculada contando o número de macrófagos infectados e não infectados, bem como o número de parasitas por 100 macrófagos e o índice de infecção.

O índice de infecção foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Índice de infecção} = \frac{(\% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{número de amastigotas})}{\text{Número total de macrófagos}}$$

Os gráficos de porcentagem de infecção e índice de infecção foi realizado utilizando o programa GraphPad Prism 9.

## 3.5 Caracterização molecular

### 3.5.1 Extração de DNA

Para o isolamento do DNA, os parasitas foram cultivados por 5 dias ou até atingirem aproximadamente 2x10<sup>7</sup> células/mL. As culturas foram lavadas com PBS 1X, centrifugadas e colhidas como pellets. A extração de DNA genômico foi realizada com o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare) ou em fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific) e quando necessário, diluídas a 30 ng/μL e armazenadas a -20°C.

### 3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) de marcadores moleculares, sequenciamento e análise filogenética de amplicons

*Primers* universais que amplificam a região variável V7V8 de SSU rRNA (TRY/SSU) foram usados para a identificação da espécie de tripanossomatídeos (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 uL, contendo: 90 ng de DNA genômico de tripanossomatídeos, tampão 1X (100 mM Tris HCl (pH 8.8), 500 mM KCl 0.8% (v/v), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP), 0,4 uM de cada *primer*, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 unidades (0,25 uL) de Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific) e água ultrapura para completar o volume final de reação.

A análise e identificação do produto das reações de amplificação foram realizados por eletroforese em gel de agarose 1% corados com SYBR Safe 0,001%, seguido da purificação do produto de PCR, realizada utilizando o kit PureLink PCR Purification Kit (Thermo Scientific) de acordo com instruções do fabricante. A quantificação do produto purificado foi realizada por espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare). As amostras foram enviadas para sequenciamento conforme o método de terminação de cadeia desenvolvido por Sanger, realizado pela equipe do IFSC-USP, São Carlos. O sequenciador utilizado foi o 3130 Genetic Analyser da Applied Biosystems.

**Tabela 2.** Nome dos genes, sequência e informações dos primers utilizados.

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Amplicon</b>	<b>Referência</b>
TRY927	F: GAAACAAGAAACACGGGAG R: CTACTGGGCAGCTTGGA	927 pb	Noyes et al., 1998
SSU561	F: TGGGATAACAAAGGAGCA R: CTGAGACTGTAACCTCAAAGC	555 pb	Noyes et al., 1998
gGAPDH	F: GGBCGCATGGTSTTCCAG R: CCCCACTCGTTRTCRTACC	~1000 pb	Borghesan et al., 2013
LinJ31_2420	F: GCAGCGATGCGACCTAGTTA R: TGTACAAGGCACTGGCGTAG	98 pb	Takamiya et al., 2023
Catalase_LVH6 0-12060_1	F: TCAGCGAGTCGGAGTCTAA R:CGAATAAGGGTGGAAACAAAG AG	107 pb	Takamiya et al., 2023

Após a obtenção dos resultados do sequenciamento, conduzimos análises de homologia de nucleotídeo por meio de pesquisas de BLASTn, utilizando a plataforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), visando identificar genes homólogos entre diversas espécies de protozoários. Posteriormente, realizamos alinhamentos de sequências de nucleotídeos e/ou aminoácidos usando a ferramenta Muscle, a qual está integrada no *software* MEGA X (KUMAR et al., 2018). Para construção das árvores filogenéticas e cálculo da distância P, adotamos o método de Maximum Likelihood, empregando o modelo de substituição Kimura 2-parameter. Além disso, empregamos a análise bootstrap, com 1000 repetições, para avaliar a robustez das reconstruções filogenéticas. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando sequências de nucleotídeos obtidos do banco de dados NCBI (Tabela 3).

**Tabela 3.** Número de acesso das sequencias de SSU rRNA dos tripanossomatídeos utilizadas na análise filogenética.

<b>Espécie</b>	<b>Número de acesso NCBI</b>
<i>Crithidia bombi</i>	KM980185.1
<i>Crithidia fasciculata</i>	Y00055.1
<i>Crithidia luciliae thermophila</i>	KY264937.1
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	X53911.1
<i>Endotrypanum colombiensis</i>	KX790768.1
<i>Leishmania infantum</i>	XR001203206.1
<i>Leishmania donovani</i>	XR002966730.1
<i>Leishmania chagasi</i>	M81430.1
<i>Leishmania amazonensis</i>	JX030083.1
<i>Leishmania braziliensis</i>	JX030135.1
<i>Leishmania tropica</i>	GQ332363.1
<i>Leishmania major</i>	XR002460813.1
<i>Leishmania mexicana</i>	GQ332360.1
<i>Leishmania aethiopica</i>	M81428.1
<i>Leishmania enriettii</i>	KX790777.1
<i>Leishmania panamensis</i>	JN003595.1
<i>Leptomonas seymouri</i>	AF153040.2
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	XR_001548753.1
<i>Trypanossoma cruzi</i>	AY785570.1
<i>Trypanossoma grayi</i>	AJ005278.1
<i>Trypanossoma rangeli</i>	AY491753.1
<b>Isolados clínicos</b>	<b>Número de acesso NCBI</b>
LVH60	OQ581228
LVH60a	OQ581229
LVH117	OQ581230
LVH117 C1	OQ581231
LVH117 C2	OQ581232
LVH120	OQ581233
LVH120 C4	OQ581234
LVH120 C5	OQ581235
LVH161	OQ581236
LVH161 C6	OQ581237
LVH161a N1	OQ581238

LVH161a N2	OQ581239
BMVL 2017	OQ581240

### 3.5.3 PCR quantitativa em tempo real para quantificação da carga parasitária

Foram sintetizados e validados por meio de qPCR, *primers* específicos para as espécies *L. infantum* e *Crithidia* sp. LVH60A (TAKAMIYA et al., 2023). O *primer* denominado Catalase\_LVH60-12060\_1, que amplifica o gene da catalase, foi empregado na quantificação dos parasitos da espécie *Crithidia* sp. LVH60A. Ademais, o *primer* denominado LinJ312420 foi utilizado para a quantificação dos parasitos da espécie *L. infantum* (Tabela 2).

A quantificação da carga parasitária de amostras clínicas e de culturas de parasitas foi realizada conforme descrito por Takamiya et al., (2023). Brevemente, as reações de qPCR foram realizadas no volume final de 10 µL, contendo 12 ng de amostra de DNA, previamente quantificado pelo reagente Qubit (Invitrogen), 100 nM de cada *primer* e 1xSYBR green master-mix (PCR Biosystems). As reações foram realizadas no aparelho AriaMx Real-time PCR System (Agilent). As condições de amplificação foram de 3 min a 95 °C seguida por 40 ciclos a 95 °C por 10 s, 30s a 55 °C e extensão de 30s a 72 °C. Para a análise da curva de melting foi adicionada a etapa ciclo de dissociação (55 °C por 10 s, e então 0.5 °C por 10 s até 95 °C).

O número equivalente de parasitas foi obtido usando uma curva padrão de *Leishmania infantum* (cepa HUUFS14) e parasitas *Crithidia* sp. LVH60A (cepa LVH60a C1). O DNA genômico foi utilizado como padrão de quantificação para o ensaio de qPCR, com base na massa do genoma e do DNA do cinetoplasto equivalente a um parasita (81,52 fg para *L. infantum* e 87,3 fg para *Crithidia* sp. LVH60A). A massa equivalente foi utilizada para a preparação das curvas padrão na faixa de 1 a 10<sup>5</sup> parasitas/reação. DNA humano não infectado foi utilizado como controle (3 ng/reação) em cada ponto da curva padrão. O número equivalente de parasitas foi expresso em termos de equivalentes de DNA do parasita/reação em 6 ng de DNA e representado em uma matriz do Grupo Boston Consulting (matriz BCG) realizada no GraphPad Prism 9.

### 3.5.4 Identificação *in silico* de genes ortólogos

Alguns genes que codificam proteínas relevantes para a sobrevivência e virulência de parasitos do gênero *Leishmania* foram selecionados com base na literatura (Tabela 4). Estes genes foram prospectados a partir de um BLAST local comparando as sequências dos genes de *L. infantum*, obtidos do banco de dados de tripanossomatídeos TrityDB (<https://tritrypdb.org/>) com os genes do parasita *Crithidia* sp. LVH60A. A execução do alinhamento ocorreu por meio de linha de comando no terminal, utilizando os parâmetros



padrão (*Expect threshold* 0,05, *word size* 11, *Match/Mismatch scores* 2, -3, *Gap costs Existense* 5 e *Extension* 2), conforme demonstrado no script abaixo:

```
$ makeblastdb -in seu_banco_de_dados.fasta -dbtype tipo_de_banco_de_dados
$ blastn -query gene_alvo -db seu_banco_de_dados.fasta -out resultado_blast
```

**Tabela 4.** Genes associados a fatores de virulência e sobrevivência em tripanossomatídeos.

<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b>Bibliografia</b>
A2 protein	Expresso predominantemente em amastigotas e, provavelmente desempenha um papel na sobrevivência no hospedeiro mamífero; proteína de resposta ao estresse celular.	McCall; Matlashewski, 2010; Zhang et al., 2003
14-3-3 protein-like protein	Proteína antiapoptótica secretada, podendo ser responsável pelo prolongamento da vida de células hospedeiras infectadas.	Da Fonseca Pires et al., 2014; Silverman et al., 2008
HSP-70 heat shock protein 70	Proteína que possui diversas funções celulares essenciais, incluindo a montagem, dobragem e translocação de outras proteínas, além de agir sob uma variedade de estresses, incluindo calor, radiação, infecção, estresse químico ou bioquímico, fornecendo citoproteção.	Brochu; Haimeur; Ouellette, 2004; Da Fonseca Pires et al., 2014
KMP-11 kinetoplastid membrane protein- 11	Não possui função esclarecida, porém, pode estar associada à interação com a célula hospedeira.	Da Fonseca Pires et al., 2014; Jardim et al., 1995
lpg2 - LPG Lipophosphoglycan	Molécula de ligação à lectina no epitélio intestinal dos flebotomos, tornando essas moléculas essenciais para o estabelecimento da infecção por flebotomíneos; em promastigotas metacíclicas conferem resistência ao sistema complemento humano, protegendo a membrana do parasita; O gene lpg2 possui propriedades quimiotática e imunomoduladora no hospedeiro mamífero.	Bifeld; Clos, 2015; Rogers et al., 2009

Metalloprotease GP63	Aumenta a ligação do parasita aos macrófagos pela interação com os receptores de fibronectina, além da inativação do sistema complemento. GP63 também inativa fatores de transcrição pró-inflamatória.	Bifeld; Clos, 2015
Peroxidoxin	Auxilia na proteção do parasita contra o estresse oxidativo da célula do hospedeiro e atua conjunto a Tryparedoxin peroxidase.	Castro <i>et al.</i> , 2002; Da Fonseca Pires <i>et al.</i> , 2014
Tryparedoxin peroxidase	Auxilia na proteção do parasita contra o estresse oxidativo da célula do hospedeiro e atua conjunto a Peroxidoxin	Da Fonseca Pires <i>et al.</i> , 2014; Romao <i>et al.</i> , 2009

### 3.5.5 Sequenciamento do genoma completo por tecnologia Illumina

O genoma dos isolados policlonais e clonais de LVH117 e LVH120 foram obtidos por sequenciamento pela plataforma Illumina HiSeq 3000, utilizado o kit NEBNext® Ultra II FS DNA Library Prep. Já os genomas dos novos isolados policlonais LVH161 e LVH161a e clonal LVH161 C6 foram obtidos por sequenciamento pela plataforma Illumina Novaseq 6000. Ambos os sequenciamentos produziram *paired-end reads* de 150 pb (pares de base) com aproximadamente 57 milhões de *paired-reads*, perfazendo ~50X de cobertura de sequenciamento do genoma.

### 3.5.6 Pré-processamento das sequências Illumina *short reads*

A qualidade dos dados brutos de sequenciamento foi analisada pelo programa FastQC, o qual utiliza diversos parâmetros para garantir que os dados brutos tenham boa qualidade e não afete as análises seguintes. A remoção dos adaptadores Illumina foi realizado utilizando o *software* Cutadapt (MARTIN, 2011) e as sequências de baixa qualidade (*phread score* inferior a 20), utilizando o *software* Spades. Posteriormente, estes genomas foram filtrados para remover *scaffolds* menores que 300 pares de base (Tabela 11).

foram removidas utilizando o programa Sickle (JOSHI; FASS, 2011), conforme descrito anteriormente (TAKAHASHI, 2020).

Os comandos utilizados encontram-se a seguir:

```
$ cutadapt \
-a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC \
-A AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGT \
GGTCGCCGTATCATT -o sample_trimmed.1.fastq.gz \
-p sample_trimmed.2.fastq.gz sample_R1.fastq.gz sample_R2.fastq.gz
```

```
$ sickle pe -f sample_trimmed.1.fastq.gz -r sample_trimmed.2.fastq.gz \
-t sanger -o sample_sickle_R1.fastq.gz \
-p sample_sickle_R2.fastq.gz \
-s sample_sickle_R0.fastq.gz -q 20 -l 20
```

As sequências de alta qualidade (*phread score* superior a 20) foram usadas em análises posteriores, como, mapeamento no genoma de referência, análise de cobertura e porcentagem de identidade das sequências nos genomas de referência.

### 3.5.7 Mapeamento das *reads* em genomas de referência

Para as etapas de mapeamento, utilizamos os genomas *L. infantum* (JPCM5) e *C. fasciculata* (CfCI) na versão 59, que estão disponíveis no banco de dados TriTrypDB ([www.trytrip.org](http://www.trytrip.org)), juntamente com a montagem de referência de *Crithidia* sp. LVH60A obtida por Takahashi et al. (2020).

Os *softwares* BWA (LI; DURBIN, 2009) e Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) foram utilizados para realizar o mapeamento das *reads* em relação a um genoma de referência. A montagem do genoma de referência foi indexada seguido pelo mapeamento das *reads* utilizando os comandos abaixo:

```
$ bwa index Genoma_de_referência.fasta
$ bwa mem Genoma_de_referência.fasta sample_sickle_R1.fastq.gz \
sample_sickle_R2.fastq.gz > sample.sam

$ bowtie2-build -f Genoma_de_referência.fasta prefixo
$ bowtie2 -x prefixo -1 amostra_sickle_R1.fastq.gz -2 amostra_sickle_R2.fastq.gz -S
sample.sam
```

O comando de visualização SAMtools (LI et al., 2009) foi aplicado para gerar um arquivo bam a partir de um arquivo sam. Ainda utilizando o *software* SAMtools, o comando de classificação (sort) foi usado para ordenar o conteúdo do arquivo, enquanto rmdup foi usado para remover duplicatas. Todos os arquivos foram indexados.

```
$ samtools view -bT Genoma_de_referência.fasta sample.sam > sample.bam
$ samtools sort sample.bam > sample_sort.bam
$ samtools index sample_sort.bam
$ samtools rmdup -S sample_sort.bam sample_sort_nodup.bam
$ samtools index sample_sort_nodup.bam
```

Os valores médios de identidade de nucleotídeos (ANI) foram obtidos por comparação pareada de isolados clínicos, *L. infantum* JPCM5 (TriTrypDB release-61), *C. fasciculata* CfCI (TriTrypDB release-61), *C. mellifica* (NCBI GCA\_002216565.1) e *Crithidia* sp. LVH60A (NCBI GCA\_030078075.1) usando o NUCmer (NUCleotide MUMmer) com parâmetros padrões, incluindo o espaçamento máximo entre duas correspondências adjacentes em um

agrupamento (padrão 90 pares de base), o comprimento mínimo de um agrupamento (padrão 65 pares de base) e o comprimento mínimo de uma correspondência exata máxima (padrão 20). (MARÇAIS et al., 2018).

```
$ nucmer --prefix=ref_qry ref.fasta qry.fasta
$ show-coords -rcl ref_qry.delta > ref_qry.coords
```

Também usamos ANI calculator (RODRIGUEZ-R; KONSTANTINIDIS, 2016) disponível em <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>, e JSpeciesWS (RICHTER et al., 2016), que utiliza o algoritmo do MUMmer, disponível em <http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws>.

A porcentagem de alinhamento do genoma e a porcentagem de ANI de isolados clínicos e genomas de referência foram representadas usando gráfico de mapa de calor realizado no *software* GraphPad Prism 9. Os dendrogramas foram realizados utilizando o pacote Heatmaply no RStudio versão 4.2.2 de acordo com o exemplo abaixo:

```
$ data <-data.frame("L.infantum JPCM5" =c(01.07, 1.11, 01.08, 1.14, 01.09, 1.10,
97.63, 95.94, 98.61, 1.39), "Crithidia like LVH60aC1" =c(98.83, 98.74, 98.85, 98.45, 98.88,
98.95, 01.01, 1.0, 0.99, 79.87), "C. fasciculata CfCI" =c(72.53, 74.14, 73.45, 72.70, 71.72,
77.83, 1.17, 1.17, 1.18, 93.09))
$ class(data)
$ rownames(data) <-c("LVH117 policlonal", "LVH117 clone 1", "LVH117 clone 2",
"LVH120 policlonal", "LVH120 clone 4", "LVH120 clone 5", "LVH161 policlonal", "LVH161
clone 6", "LVH161a policlonal", "TCC039E")
$ colnames(data) <-c("L.infantum JPCM5", "Crithidia sp. LVH60A", "C. fasciculata
CfCI")
$ data2 <- as.matrix(data)
$ class(data2)
$ library(heatmaply)
$ library(viridis)
$ library(viridisLite)
$ heatmaply <- heatmaply(data2,
ylab = "Isolates", xlab = "Reference Genomes",
col = rainbow,
cellnote = data2,
main = "",
scale = "column",
margins = c(60,100,40,20),
grid_color = "white",
grid_width = 0.00001,
titleX = T,
hide_colorbar = F,
key.title = "Percentage of mapping",
branches_lwd = 0.1,
fontsize_row = 10, fontsize_col = 10,
labCol = colnames(data2),
labRow = rownames(data2),
heatmap_layers = theme(axis.line=element_blank()))
)
```

```
$ print(heatmaply, file = "dendograma", width=10, height=12, dpi=180, type="cairo",
device = jpeg)
```

### 3.5.8 Identificação de aneuploidias por estimativa de somia cromossômica

A estimativa da somia obtida através da média de cobertura obtida para cada cromossomo de *L. infantum*, *C. fasciculata* ou *Crithidia* sp. LVH60A utilizando os alinhamentos das *reads* Illumina obtidos pelo programa BWA. A somia foi estimada com base em valores normalizados de profundidade de cobertura por cromossomos, conforme descrito anteriormente (IMAMURA; DUJARDIN, 2019). Foi utilizado o alinhamento das *reads* Illumina com o respectivo genoma de referência pelo programa BWA (LI; DURBIN, 2009). Arquivos em formato BED (Browser Extendable Data) foram construídos como no exemplo abaixo:

```
Exemplo:
Cromossomo.1 1 comprimento-do-cromossomo-em-pb
Cromossomo.2 1 comprimento-do-cromossomo-em-pb
Cromossomo.3 1 comprimento-do-cromossomo-em-pb
Cromossomo.4 1 comprimento-do-cromossomo-em-pb
.
.
Cromossomo.38 1 comprimento-do-cromossomo-em-pb
```

A contagem total de bases das *reads* por cromossomo, utilizando o comando `bedcov` do SAMtools (LI et al., 2009), conforme demonstrado abaixo:

```
$ samtools bedcov yourbed.bed yourbam.bam > output.txt
```

A média da cobertura das *reads* foi calculada para todos os cromossomos, pressupondo que a maioria deles é diploide. É importante ressaltar que realizamos a exclusão dos cromossomos que apresentaram diferenças significativas na cobertura, a fim de evitar interferências na análise. Posteriormente, dividimos a média de cobertura de *reads* por dois, para obtermos a ploidia haploide e, em seguida dividimos o valor de cobertura de cada cromossomo pelo valor haploide obtido. O gráfico de heatmap da somia foi gerado pelo *software* GaphPad Prism 9.

### 3.5.9 Anotação dos genomas, detecção e anotação de variantes

Os cromossomos de *Crithidia* sp. LVH60A, obtidos através da montagem utilizando *reads* Oxford nanopore e Illumina (ROGERIO et al., 2023; TAKAHASHI, 2020), foram anotados e através do servidor web Companion (<http://companion.sanger.ac.uk>), com base no genoma de *C. fasciculata* CfCl (STEINBISS et al., 2016). A montagem do genoma de

*Crithidia* sp. LVH60A está disponível pelo BioProject PRJNA940846 acessível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA\\_030078075.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_030078075.1/).

A detecção de variantes dos isolados clínicos LVH117, LVH120, LVH161, LVH161a e TCC039E, foram realizadas através do programa Freebayes (GARRISON; MARTH, 2012), utilizando os arquivos de mapeamento das *reads* nos respectivos genomas de referência. O arquivo de saída gerado no formato de *variant calling file* (.VCF) foi usado como arquivo de entrada no programa SnpEff (CINGOLANI et al., 2012), uma ferramenta de anotação variante e previsão de efeito. Os comandos utilizados encontram-se a seguir:

```
$ freebayes -f genoma_referência.fasta amostra_q60_sort_nodup.bam > amostra.vcf
$ java -Xmx4g -jar snpEff.jar diretorio_do_genoma_referência amostra.vcf >
amostra_snpCall.ann.vcf

$ java -jar snpEff.jar build -gtf22 -v prefixo_genoma -noCheckCds
$ java -Xmx4g -jar snpEff.jar Genoma_ref amostra.vcf > amostra_snpCall.ann.vcf
```

As variantes foram visualizadas de acordo com o tipo, com o impacto - alto, baixo, moderado, modificador e distribuição de acordo com a região do genoma. Foi utilizado a cepa LVH60A como controle para identificar os alelos polimórficos nos isolados clínicos LVH117 C1 e LVH120 C4.

### 3.5.10 Avaliação das variações estruturais dos genomas de *Crithidia* sp. LVH60A e *C. fasciculata*

O algoritmo Nucmer (KURTZ et al., 2004) foi utilizado para comparar os nucleotídeos dos genomas *Crithidia* sp. LVH60A e *C. fasciculata* (TritrypDB release-59). O arquivo de saída do Nucmer foi usado como input para rodar o script DotPrep.py em linguagem Python (<https://dnanexus.github.io/dot/DotPrep.py>). Os scripts utilizados encontram-se descrito abaixo:

```
$ nucmer -p prefixo reference_genome.fasta query_genome.fasta
$ python DotPrep.py --delta prefixo.delta --overview 10000 --out prefixo.nucmer.delta
```

Os resultados gerados foram visualizados em Dot plot (<https://dot.sandbox.bio/>) a fim de avaliar as variações estruturais entre os dois genomas.

Em seguida, as variações estruturais dos cromossomos observadas foram avaliadas de forma independente, utilizando Artemis Comparison Tool (ACT) (CARVER et al., 2005). Para isso, utilizamos o *hit table* obtido a partir do alinhamento das sequências dos cromossomos como arquivo de entrada no BLAST (JOHNSON et al., 2008) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A validação das variações observadas – inversão, translocação, duplicação e rearranjo no genoma *Crithidia* sp. LVH60A – foi realizada através de PCR. Os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest, disponível em <https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest> (Tabela 5). Posteriormente, os *primers* foram verificados de acordo com sua especificidade no genoma utilizando a ferramenta BLAST (JOHNSON et al., 2008). Os produtos das PCRs foram confirmados através de sequenciamento Sanger, conforme descrito no item 3.4.2. ou ensaio de digestão com as enzimas XhoI e HindIII.

**Tabela 5.** Sequência e informações dos primers utilizados para validação das variações estruturais do genoma de *Crithidia* sp. LVH60A.

Nome do primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon esperado em LVH60A	Amplicon esperado em <i>C. fasciculata</i>	Característica avaliada
F1	F:CCTCCTGCAGCATCTCATAAT	1353	-	Inversão e duplicação em <i>Crithidia</i> sp. LVH60A de uma região do cromossomo 8 de <i>C. fasciculata</i>
R1	R:GAATTCCCGTTTGTGCCTTTC			
F1	F:CCTCCTGCAGCATCTCATAAT	2466 pb	2313 pb	Região sem duplicação do cromossomo 8 de <i>C. fasciculata</i> e cromossomo 12 de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A
R2	R:CTTTGTTCTGAGTGCCTTTG			
F3	F:TTGTCGCCTCGCTTYGAT	-	609 pb	Quebra do cromossomo 22 de <i>C. fasciculata</i> que resultaram em dois cromossomos em <i>Crithidia</i> sp. LVH60A
R3	R:TCCTCCTTCGACAACAAGAATAA			
F4	F:ATGAGATGGAGGACTTGAGAGA	-	746 pb	
R4	R:GCACTCACACAGAGAGAAAGAG			
F5	F:CACGCGCACCTCTCTAAAT	3434 pb	-	Rearranjo do cromossomo 25 de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A correspondente ao cromossomo 2 e parte do cromossomo 29 de <i>C. fasciculata</i>
R5	R:TGGGCCTCTGGYAAGTAGAA			
F6	F:GAAGAGAGAGGTGGACATCAA	-	1584 pb	Controle para o Cromossomo 2 de <i>C. fasciculata</i>
R6	R:ATGGATTGAGAAGAGGCAACGA			
F7	F:AAGGAAGCAGCAGCAACA	-	745 pb	Controle para o Cromossomo 29 de <i>C. fasciculata</i>
R7	R:CGGCACAGAAGGCTCAG			

### 3.5.11 Montagem de novo e análise filogenômica de isolados clínicos

As sequências dos isolados clínicos LVH117 C1, LVH120 C4, LVH161, LVH161a, e TCC039E foram montadas seguindo a metodologia *de novo* utilizando o *software* SPAdes (PRJIBELSKI et al., 2020) disponível na plataforma de código aberto baseada na web Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) que utiliza a seguinte linha de comando: `/usr/local/bin/spades.py -o /scratch1/03166/xcgalaxy/main/staging/42656493/working/output -t 24 -m 190`. Posteriormente, estes genomas foram filtrados para a remover *scaffolds* menores que 300 pares de base.

As relações filogenômicas entre os isolados foram avaliadas usando os proteomas preditos com a abordagem TOMM (*Total Ortholog Median Matrix*) (MARUYAMA et al., 2021). Essa análise utilizou genomas de 30 espécies de tripanossomatídeos da subfamília *Leishmaniinae* (Tabela 6) e foi baseada em aproximadamente 6000 sequências proteicas ortólogas. O filograma foi construído usando pares de sequências proteicas submetidas ao algoritmo *Reciprocal Smallest Distance* (RSD) (WALL; DELUCA, 2007) e ao *NIH Biowulf* (<https://hpc.nih.gov/systems/>) para construir uma matriz de distâncias par a par com base na distância média de genes ortólogos. Em seguida, a matriz de distâncias foi submetida aos pacotes Hclust (MÜLLNER, 2013) e Pvcust (SUZUKI; SHIMODAIRA, 2006) no R versão 3.5.283 para obter filogramas após 10.000 bootstrap. O arquivo de filograma foi exportado no formato Newick e editado no MEGA X (KUMAR et al., 2018).

**Tabela 6.** Código de acesso NCBI dos genomas e número total de proteínas de espécies de Tripanossomatídeos utilizados.

Espécie	Código NCBI	# Proteínas codificantes
<i>Crithidia bombi</i>	GCA_900240985.1	ND
<i>Crithidia mellificae</i>	GCA_002216565.1	ND
<i>Crithidia acanthocephali</i>	GCA_000482105.1	ND
<i>Crithidia expoeki</i>	GCA_900240875.1	ND
<i>Crithidia fasciculata</i>	GCA_000331325.2	ND
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	GCA_000333855.2	ND
<i>Leishmania infantum</i>	GCF_000002875.2	8150
<i>Leishmania donovani</i>	GCF_000227135.1	7953
<i>Leishmania amazonensis</i>	GCA_025688915.1	ND
<i>Leishmania braziliensis</i>	GCF_000002845.2	8160
<i>Leishmania lainsoni</i>	GCA_003664395.1	ND
<i>Leishmania orientalis</i>	GCA_017916335.1	8158
<i>Leishmania martiniquensis</i>	GCA_017916325.1	7967



<i>Leishmania tarentolae</i>	GCA_009731335.1	8703
<i>Leishmania arabica</i>	GCA_000410695.2	ND
<i>Leishmania turanica</i>	GCA_000441995.1	ND
<i>Leishmania gerbilli</i>	GCA_000443025.1	ND
<i>Leishmania tropica</i>	GCA_014139745.1	ND
<i>Leishmania major</i>	GCF_000002725.2	8316
<i>Leishmania mexicana</i>	GCF_000234665.1	8147
<i>Leishmania aethiopica</i>	GCA_000444285.2	ND
<i>Leishmania enriettii</i>	GCA_017916305.1	8353
<i>Leishmania panamensis</i>	GCF_000755165.1	7711
<i>Leishmania guyanensis</i>	GCA_024970365.1	ND
<i>Leishmania peruviana</i>	GCA_001403675.1	ND
<i>Leptomonas seymouri</i>	GCA_001299535.1	8485
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	GCF_001293395.1	9872
<i>Lotimaria passim</i>	GCA_000635995.1	ND
<i>Porcisia deanei</i>	GCA_018683835.1	ND
<i>Porcisia hertigi</i>	GCA_017918235.1	7891

---

ND: Não Disponível

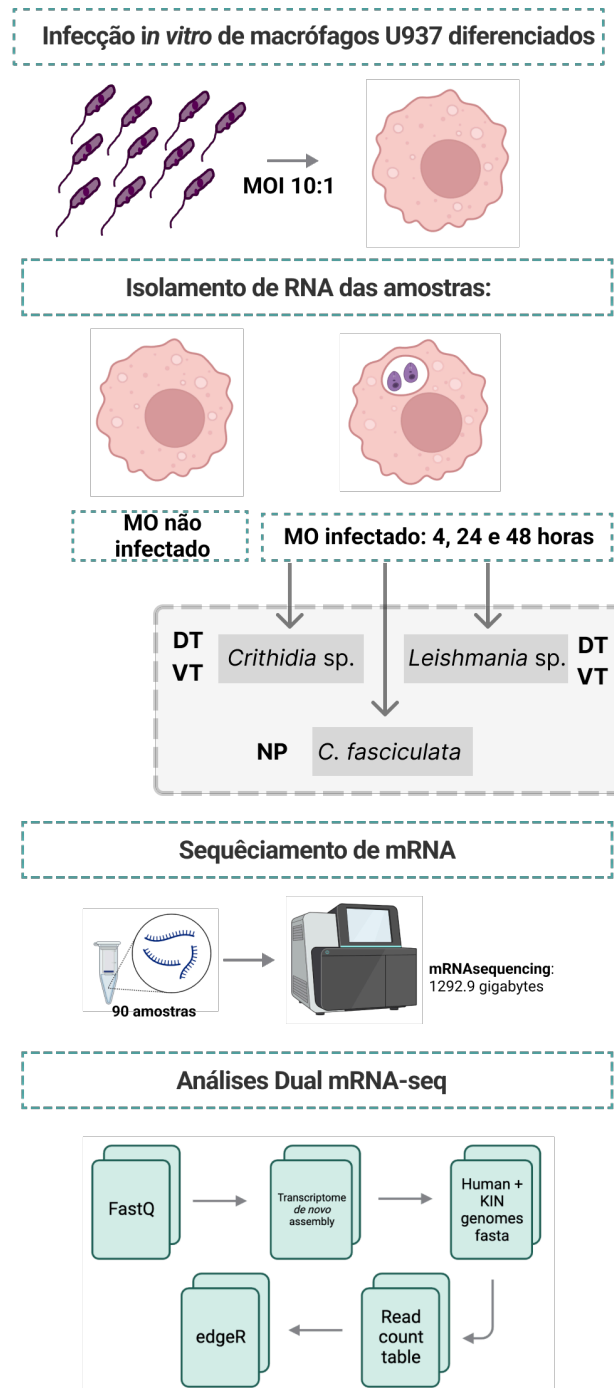
### 3.5.12 Dual Transcriptômica por mRNA-seq

A fim de avaliar assinaturas moleculares associadas a parasitas monoxênicos em comparação com parasitas dixênicos nos tempos de 4, 24 e 48 horas, realizamos o mRNA-seq de macrófagos humanos imortalizados infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e *Crithidia*. Utilizamos os isolados clínicos LVH60 C3 e LVH60a C1, obtidos de medula óssea e lesão cutânea, respectivamente (MARUYAMA et al., 2019). Os clones dos isolados clínicos LVH117 C1, LVH120 C4, LVH161 E1 e LVH161 D6 também foram utilizados. Como controles, utilizamos parasitas dixênicos com características viscerotrópicas e dermatotrópicas (*L. infantum* e *L. major* IRAQ, respectivamente), enquanto o isolado TCC039E (*C. fasciculata*) foi utilizado como controle para parasitas monoxênicos.

Monócitos U937 (linhagem celular pró-monocítica de leucemia mieloide humana) foram mantidos e diferenciados conforme o item 3.3.5.1. Os macrófagos diferenciados foram infectados com os parasitas numa proporção macrófago/parasita de 1:10 durante 4 horas a 37 °C. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e posteriormente incubadas a 37°C até aos tempos de 24 e 48 horas. As amostras destinadas à contagem foram fixadas e coradas com soluções Kwik-Diff™. A porcentagem de infecção foi calculada segundo o item 3.3.5.3. As contagens foram realizadas em duplicata para cada período de

infecção. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O layout experimental do dual mRNA-seq está exibido na Figura 8.

**Figura 8.** Layout experimental do experimento de *dual mRNA-seq*



Layout experimental do *dual mRNA-seq* de macrófagos U937 infectados com cepas de *Crithidia sp.* LVH60A, *Leishmania infantum*, *Leishmania major* e *C. fasciculata*. DT: Dermotrópicas (parasitas isolados da pele); VT: Viscerotrópicas (parasitas isolados de medula óssea ou baço); NP: Parasita não patogênico.

### 3.5.13 Isolamento de RNA e sequenciamento de mRNA

O RNA total foi imediatamente estabilizado adicionando 1 mL do reagente celular *RNAprotect* (Qiagen) diretamente em cada poço contendo os macrófagos infectados ou não infectados. O conteúdo de cada poço foi transferido para microtubos e armazenados imediatamente em freezer – 70 °C para posterior utilização.

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit Qiagen RNeasy Plus 96 (QIAGEN, Hilden, Alemanha). As bibliotecas de cDNA, enriquecidas com Poli (A), foram geradas usando o NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit, de acordo com o protocolo do fabricante e sua qualidade foi avaliada nas instalações da Novogene (Universidade da Califórnia, Davis/Califórnia). *Paired-end reads* de 150 pares de base foram obtidas usando a plataforma Illumina NovaSeq; aproximadamente 12 gigabytes (Gb) de saída de dados de sequenciamento por amostra foram produzidos. Um total de 90 amostras foram sequenciadas.

### 3.5.14 Análises de Bioinformática

Os dados de RNA-seq gerados foram processados e analisados com NIH *High Performance Computing* (HPC), no qual inclui Biowulf, um cluster de processador Linux e servidor local da UFSCar.

A análise de RNA-seq foi realizada usando montagem *de novo* do transcriptoma de tripanossomatídeos, em colaboração com o Dr. José Marcos Ribeiro (NIAID/NIH). Os adaptadores de sequenciamento das *reads* foram removidos usando Trim Galore (KRUEGER, 2023) e posteriormente, convertidas em extensão *.fa* usando Seqtk (LI, 2023) com a finalidade de economizar espaço em disco. Foi utilizado o comando *chmod -775 fa.txt* para permitir que o arquivo em extensão *fasta* fosse executável.

```
$ trim_galore -q 25 --cores 8 -j 4 --fastqc --dont_gzip --trim-n --max_n 2 --length 25 --phred33 --basename INPUT -o path/to/clean/files INPUT.fq.gz
$ seqtk seq -a INPUT.fastq > INPUT1.fa
```

A seguir, as *reads forward* e *reverse* foram combinadas usando o comando *Cat*, e os cabeçalhos dos arquivos foram substituídos por números utilizando o programa Seqkit (SHEN et al., 2016). Os arquivos contendo as *reads* combinadas foram submetidas a normalização usando o script *insilico\_read\_normalization.pl* disponível no *software* Trinity (GRABHERR et al., 2011).

```
$ cat INPUT1_1.fa > INPUT.fasta
$ cat INPUT1_2.fa >> INPUT.fasta
$ rm INPUT1_1.fa
$ seqkit replace -p .+ -r "{nr}" INPUT.fasta > INPUT.fa
$ rm INPUT1.fasta
```

```

$ cat *.fa > all_reads.fa
$ export TMPDIR=/lscratch/$SLURM_JOB_ID
$ set -e
$ module load perl
$ module load trinity/2.9.0
$ module load pigz
$ /usr/local/apps/trinity/trinityrnaseq-2.9.0/util/insilico_read_normalization.pl --seqType
fa --JM 240G --max_cov 100 --min_cov 5 --CPU 24 --output /data/LMVR-
VBS/crithidia/normalized --max_CV 10000 --single /path/to/trimmed/reads/all_reads.fa

```

Foram utilizados dois *softwares* para realizar a montagem *de novo*: Trinity (GRABHERR et al., 2011) e ABySS (SIMPSON et al., 2009). O *software* Trinity é amplamente utilizado para a montagem de transcriptoma *de novo*. Este *software* utiliza a combinação de três módulos de *software* independentes (Inchworm, Chrysalis e Butterfly) para gerar uma montagem de alta qualidade. Ademais, Trinity é otimizado para manipulação de transcriptomas complexos, com altos níveis de *splicing* alternativo e diversidade de isoformas. Já o *software* ABySS, é um montador *de novo* que utiliza apenas a abordagem baseada em gráfico De Bruijn para construir um conjunto de genoma ou transcriptoma. O tamanho k-mer usado no ABySS variou de k-25 a k-95 em incrementos de 10.

```

$ Trinity --seqType fa --single /path/to/normalized/norm.fa --CPU 16 --
bflyCalculateCPU --max_memory 1000G --inchworm_cpu 16 --min_contig_length 200 --
full_cleanup --min_kmer_cov 3 --output /data/LMVR-VBS/crithidia/trinity > /data/LMVR-
VBS/crithidia/trinity/trinity-log.txt

$ export TMPDIR=/lscratch/$SLURM_JOB_ID; cd name_of_subdirectory;mpirun -np
36 -oversubscribe ABySS-P /path/to/normalized/directory/normalized.fa --SS -k
number_of_kmer_size c5 -e2 -E2 -o crit-abyss-kINPUT1.fa

```

Em seguida, as montagens resultantes dos *softwares* Trinity e ABySS foram filtrados para remover sequências com comprimento menor que 180 pb. Foi utilizado o comando *cat* para concatenar o arquivo fasta montado do ABySS e o genoma do *Homo sapiens* GRCh38.p14 disponível no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/9606/>). Em seguida, os nomes dos cromossomos e dos *contigs* foram alterados para identificadores numéricos usando o comando Seqkit, conforme demonstrado abaixo.

```

$ Z:\crithidia\abyss> dir *.fa /s/b
$ seqkit seq -m 180 contigs.fa > contigs-180.fa
$ seqkit replace -p .+ -r "{nr}" contigs-180.fa > contigs-180.fasta
$ seqkit replace -p .+ -r "{nr}" chrit-assb-hs.fasta > chrit-assb-hs-num.fa

```

Foi utilizado o programa CD-HIT-EST (LI; GODZIK, 2006) para agrupar sequências de nucleotídeos obtidos com os *softwares* Trinity e ABySS, que compartilham um alto nível de similaridade, usando um limiar de identidade de sequência de 95% (-c 0,95), um tamanho de nucleotídeo de 10 (-n 10) e sem corte de diferença de comprimento (-d 0). Este programa é frequentemente utilizado para agrupar sequências EST (*expressed sequence tag*), as quais não contêm íntrons (LI; GODZIK, 2006) e também foi utilizado com o objetivo de reduzir a redundância das sequências, melhorando consequentemente a eficiência das análises de expressão gênica subsequentes.

```
$ cd-hit-est -i chrit-assb-hs-num.fa -o chri-all-95.fa -c 0.95 -n 10 -d 0 -M 16000 -T 24 > cdhit-log.txt
```

Além disso, o *software* RSEM (LI; DEWEY, 2011) foi empregado para estimar os níveis de expressão gênica a partir de dados de RNA-Seq, conforme demonstrado na caixa abaixo. O arquivo de saída do RSEM fornece as contagens de *reads* estimadas, valores de FPKM (fragmentos por quilo base por milhão de fragmentos mapeados) e TPM (transcritos por milhão) para cada gene e isoformas. Posteriormente, foi realizada uma filtragem para remover transcritos com TPM inferior a 2.

```
$ rsem-prepare-reference --bowtie2 chri-all-95.fa cr -p 8
$ rsem-calculate-expression --bowtie2 --no-qualities --sort-bam-by-coordinate -p 24 /path/to/trimmed/reads/Sample_name.fa.gz cri Sample_Name
```

Com o propósito de avaliar a similaridade entre amostras com base em seus perfis de expressão gênica e realizar a análise de expressão gênica diferencial entre os grupos experimentais, foram utilizados os conjuntos de dados contendo a contagem de *reads* mapeados no genoma humano ou no genoma de cinetoplastídeos como arquivos de entrada no pacote de linguagem estatística R, edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010).

A similaridade entre amostras com base em seus perfis de expressão gênica foi avaliada utilizando a função plotMDS, a qual gera um gráfico de escala multidimensional representando as similaridades relativas entre as amostras. As distâncias entre as amostras correspondem às principais mudanças logarítmicas (*leading log-fold-changes*) entre cada par de amostras, sendo que tais mudanças calculadas com as maiores variações logarítmica absolutas, representado pela raiz quadrada média das maiores variações *log<sub>2</sub>-fold-changes* entre cada par de amostra (CHEN et al., 2008).

A seguir, realizamos a conversão do gráfico de escala multidimensional (MDS – do inglês *Multidimensional Scaling*) para o gráfico de análise do componente principal (PCA – do

inglês *Principal Component Analysis*) com o objetivo de verificar a variância entre as amostras, a análise no pacote edgeR seguiu o *script* abaixo:

```

$ library(edgeR)
$ setwd("/data/LMVR-VBS/crithidia/edger/")
$ x <- read.table("kin24.txt", header = TRUE, row.names="Symbol", sep = "\t")
$ x <- as.matrix(x)
$ targets <- read.delim("kin24Targets.txt")
$ Group <- factor(paste(targets$Time,targets$Species,targets$Tropism,sep=""))
$ cbind(targets,group=Group)
$ y <- DGEList(counts=x, group=Group)
$ design <- model.matrix(~group,data=y$samples)
$ colnames(design) <- levels(Group)

$ y <- calcNormFactors(y)
$ y <- estimateGLMCommonDisp(y, design, verbose=TRUE)
$ y <- estimateGLMTrendedDisp(y, design)
$ y <- estimateGLMTagwiseDisp(y, design)

$ fit <- glmQLFit(y, design)
o <- order(qlf$table$PValue)
$ FDR <- p.adjust(qlf$table$PValue, method="BH")
$ t <- topTags(qlf,n=sum(FDR < 0.01))
$ write.table(t,"edgeR-FWB24vsFKB24", sep = "\t")
$ colnames(fit)
$ pdf(file="kin24.pdf")
$
$
$ colors <-
c("darkolivegreen","darkolivegreen","darkolivegreen","chartreuse4","chartreuse4","chartreuse
4","chartreuse3","chartreuse3","chartreuse3","chartreuse","chartreuse","chartreuse","darkora
nge3","darkorange3","darkorange3","darkorange","darkorange","darkorange","darkred","darkr
ed","darkred","darkgoldenrod1","darkgoldenrod1","darkgoldenrod1","darkgray","darkgray","da
rkgray","black","black","black")
$ plotMDS(y,col=colors,main = "MDS Plot for Count Data TPM > 2")
$ dev.off()

$ unique(df$Group)

# MDS to PCA (without the last line above)

$ library (ggplot2)
$ library(hrbrthemes)

#This will create a variable containing all the information for the MDSplot
$ mds <- plotMDS(y,main = "MDS Plot for Count Data TPM>2",cex = 1, labels = Group)

#Extract coordinates information from the de variable
$ v1 <- mds$x
$ v2 <- mds$y

#Create a dataframe with the coordinates and the biological condition
$ df <- data.frame(v1, v2, Group)

#Convert the "Group" variable into a factor to fixate their order of appearance in the
legend

```

```

$ df$Group <- factor(df$Group, levels = c('24LVH60_C3_V', '24LVH60a_C1_D',
'24LVH117_C1_V', '24LVH120_C4_V', '24LVH161_E1_V', '24LVH161a_D6_D',
'24L._infantum_V', '24L._major_IRAQ_D', '24Crithidia_fasciculata_TCC039_N',
'24U937_macrophage_N'))

#Assing colors for each biological condition:

$ mycolors <- c ("darkolivegreen", "chartreuse4", "chartreuse3", "chartreuse",
"darkorange3", "darkorange", "darkred", "darkgoldenrod1", "darkgray", "black")

#Use the df data.frame as input for ggplot2
#Replace the values of X and Y with the actual values calculated by edgeR
$ plot <- ggplot(df, aes(v1, v2, colour = Group)) + geom_point(size = 4) +
scale_colour_manual(values = mycolors) + theme_ipsum_rc() + xlab('Leading LogFC dim
1(48%)') + ylab('Leading LogFC dim 2 (16%)')
$ plot
$ ggsave("MDSplot-Kin24.tiff",plot, dpi = 300, height = 7, width = 7)
$ rsem-calculate-expression --bowtie2 --no-qualities --sort-bam-by-coordinate -p 24
/path/to/trimmed/reads/Sample_name.fa.gz cri Sample_Name

```

Para identificar os genes diferencialmente expressos em cada comparação entre os grupos, foi utilizado a taxa de descoberta falsa (FDR) inferior a 0,05 para os transcritos humanos e FDR inferior a 0,01 para os transcritos de cinetoplastídeos. Além disso, foi realizado a análise de expressão diferencial entre os grupos experimentais utilizando modelo de Distribuição Binomial Negativa com teste estatístico GLM, implementado no edgeR. Ademais, aplicamos a correção de efeito de lote (*batch effect*) disponível no edgeR para cada um dos três experimentos. O *script* utilizado para identificar os genes diferencialmente expressos encontra-se abaixo:

```

#Scrip para reanalisar os dados e normalizar de acordo com o Batch effect
#Loading the data

$ setwd("/Users/luanarogério/Downloads/edger/Batch_effect")
$ library(edgeR)
$ x <- read.delim("Read-table-KIN-LAR.txt", header = TRUE, row.names="Symbol",
sep = "\t")
$ x <- as.matrix(x)
$ head(x)
$ Parasite <- factor(substring(colnames(x),2,5))
$ Batch <- factor(substring(colnames(x),1,1))
$ Time <- factor(substring(colnames(x),4,5))
$ y <- DGEList(counts=x, group=Parasite)
$ keep <- filterByExpr(y)
$ table(keep)
$ y <- y[keep, , keep.lib.sizes=FALSE]
$ y <- calcNormFactors(y)
$ y$samples

```

```

#Design
$ design2 <- model.matrix(~0+Parasite+Batch)
$ rownames(design2) <- colnames(y)
$ design2

#Estimating the dispersion
$ y <- estimateGLMCommonDisp(y, design2, verbose=TRUE)
$ y <- estimateGLMTrendedDisp(y, design2)
$ y <- estimateGLMTagwiseDisp(y, design2)
$ fit <- glmQLFit(y, design2)
$ colnames(fit)

#design2
$ qlf <- glmQLFTest(fit, contrast=c(0.25, 0, 0, 0.25, 0, 0, 0.25, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, -1, 0, 0, 0, 0))
$ o <- order(qlf$table$PValue)
$ FDR <- p.adjust(qlf$table$PValue, method="BH")
$ t <- topTags(qlf, n=sum(FDR < 0.01))
$ write.table(t, "Cfas-Crithidia_LVH60-4h", sep = "\t")
$ summary(decideTests(qlf))
$ plotMD(qlf)
$ abline(h=c(-1,1), col="blue")

```

A anotação funcional dos transcritos foi realizada através da busca por similaridade de sequência em vários bancos de dados: Trityp, Uniprot, SMART, KOG, PFAM, entre outros. Gráficos heatmap da expressão diferencial, expressos em  $\text{Log}_2$  Fold Change, foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism 9. Os dendrogramas foram realizados utilizando o pacote Heatmaply no RStudio versão 4.2.2., onde a clusterização hierárquica dos dados de expressão foi realizada utilizando a medida de Distância Euclidiana e a função de ligação média (GALILI et al., 2018).



## ***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização fenotípica

#### 4.1.1 Proliferação celular de culturas axênicas

A fim de verificar a cinética de crescimento *in vitro*, foram analisadas curvas de crescimento dos isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A (LVH117 e LVH120) e de *L. infantum* (LVH161 e LVH161a), tanto policlonais quanto clonais. O potencial de termo tolerância foi avaliado pela capacidade de promastigota ou coanomastigotas sobreviverem e se multiplicarem a temperaturas próximas a do hospedeiro invertebrado (25 °C) e mamíferos (35 °C). Para fins de comparação, foram utilizadas cepas de *L. infantum* (PP75 e HUUFS14) e *C. fasciculata* (TCC039E).

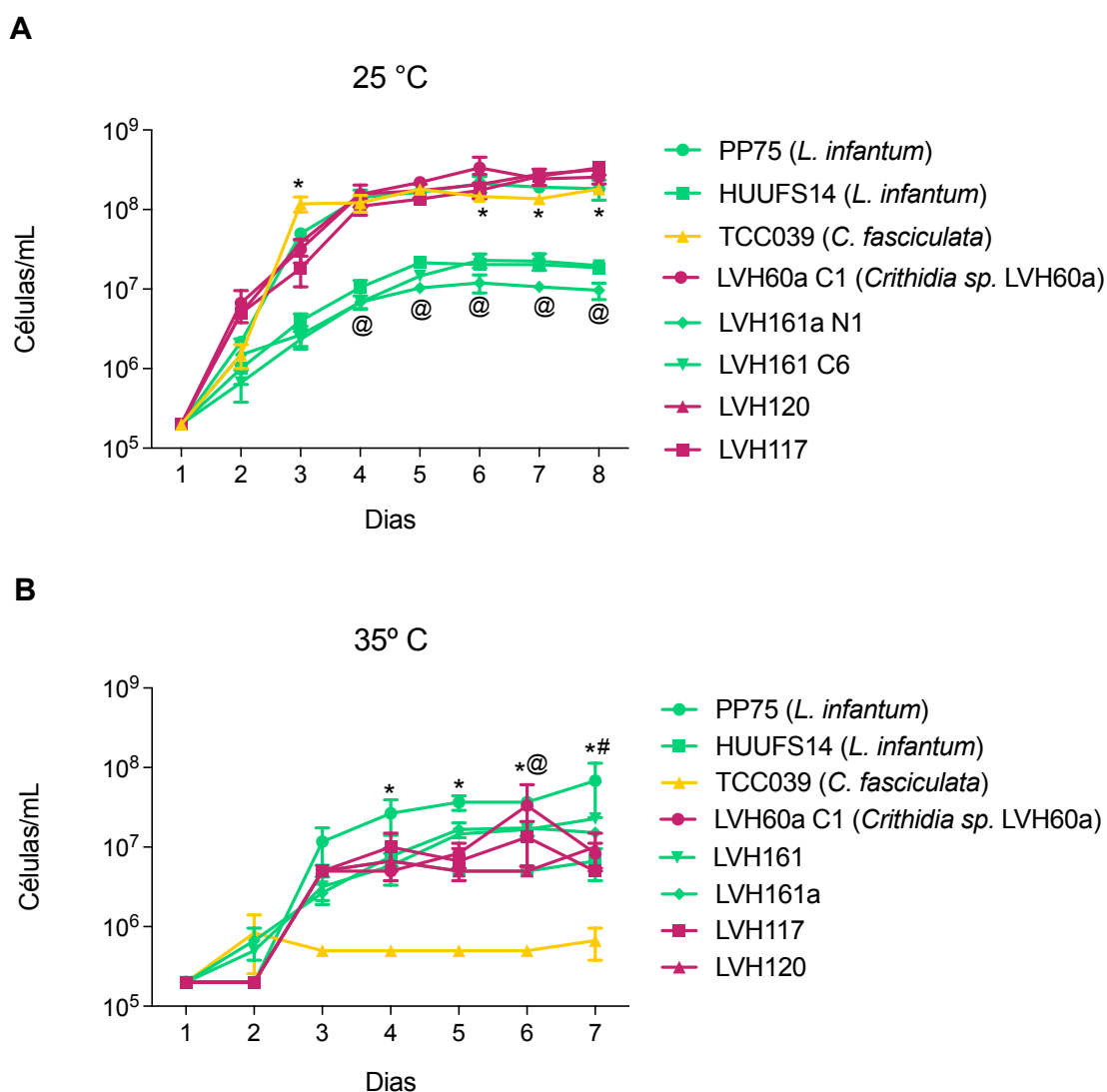
A proliferação celular a 25 °C, revelou uma similaridade notável entre as culturas de LVH117 e LVH120, assim como entre as linhagens PP75, TCC039E e LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A), atingindo em média  $1,76^6 \times 10^8$  células/mL no 5º dia da curva de crescimento (Figura 9A). Não houve diferença na cinética de crescimento entre as linhagens clonais e policlonais dos isolados clínicos LVH117 e LVH120 (Figura 1A apêndice). No entanto, foi observado um crescimento mais limitado nas cepas HUUFS14, LVH161 e LVH161a de *L. infantum*, que alcançaram em média  $1,55 \times 10^7$  células/mL no 5º dia de contagem (Figura 9A). A partir do 5º dia, todas as amostras, com exceção de TCC039E, entraram em fase estacionária, apresentando uma redução na taxa de proliferação celular até o último dia de contagem. No 8º dia do experimento, as cepas de *Crithidia* sp. LVH60A (LVH117 e LVH120), TCC039E e PP75 atingiram em média  $2,73 \times 10^8$  células/mL, enquanto os isolados de *L. infantum* (HUUFS14, LVH161 e LVH161a) atingiram em média  $1,60 \times 10^7$  células/mL (Figura 9A).

Os dados foram submetidos a uma análise estatística utilizando o teste Two-Way ANOVA acrescido pelo pós-teste Bonferroni, usando o programa GraphPrism 9.0. Houve diferença estatística entre os diferentes dias de crescimento para cada amostra ( $p < 0,0001$ ). Além disso, foi observado diferença estatística entre as amostras em comparação com TCC039E (representado por “\*” -  $p \leq 0,05$ ) e entre as amostras em relação a HUUFS14, LVH161 e LVH161a (representado por “@” -  $p \leq 0,05$ ).

A proliferação celular a 35 °C mostrou similaridade entre as linhagens clonais e policlonais de LVH117 e LVH120 (Figura 1B apêndice) com as linhagens HUUFS14, LVH161 e LVH161a (*L. infantum*) e LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A). Todas as cepas foram capazes de se multiplicar, iniciando com  $2 \times 10^5$  células/mL até atingir em média  $1,13 \times 10^7$  células/mL para as cepas *Crithidia* sp. LVH60A (LVH117 e LVH120), e cepas de *L. infantum* (HUUFS14, LVH161 e LVH161a); e  $6,83 \times 10^8$  /mL para a cepa PP75 (*L. infantum*) no 7º dia da curva de crescimento (Figura 9B). Entretanto, a proliferação da cepa TCC039E (*C. fasciculata*) a 35 °C

foi a menor entre todas, sendo observada somente até o 2º dia de cultivo e permanecendo estável até 7º dia da curva de crescimento, alcançando apenas  $6,66 \times 10^5$  células/mL, com uma diferença no número de células de  $10^3$  e  $10^2$  quando comparado a *L. infantum* e *Crithidia* sp. LVH60A, respectivamente.

**Figura 9.** Curvas de crescimento celular de parasitos *in vitro*.



(A) Curva de crescimento celular a 25 °C. Houve diferença estatística entre os dias de crescimento dentro de cada amostra ( $p < 0,0001$ ), entre as amostras em relação a TCC039E, representado por (\*), ( $p < 0,05$ ) e entre as amostras em relação à HUUFS14, LVH161 e LVH161a, representado por (@), ( $p < 0,05$ ); (B) Curva de crescimento celular a 35 °C. Houve diferença estatística entre os dias de crescimento dentro de cada amostra ( $p < 0,001$ ), entre as mostras e PP75 a partir do 4º dia da curva de crescimento, representado por (\*), ( $p < 0,05$ ), entre as amostras em relação a LVH60a C1 no 6º dia, com exceção das cepas LVH161 e LVH161a, representado por (@), ( $p < 0,05$ ), e entre as amostras HUUFS14 e TCC039E em relação a LVH60a C1 no 7º dia, representado por (#), ( $p < 0,05$ ). Linhas verdes representam isolados de *L. infantum*; Linhas rosas representam isolados de *Crithidia* sp. LVH60A; Linha amarela representa o isolado de *C. fasciculata*. As células foram contadas em câmara de Neubauer e microscópio de luz diariamente, em que a concentração inicial de parasitos na cultura foi de  $2 \times 10^5$  células/mL. As contagens foram realizadas em triplicata em três experimentos independentes.

Os dados também foram submetidos a uma análise estatística, conforme mencionado anteriormente. Os isolados testados mostraram diferença estatisticamente significativa entre os dias de crescimento dentro de cada amostra ( $p < 0,001$ ). Além disso, foi observado diferença estatisticamente significativa entre as amostras e a cepa PP75 a partir do 4º dia da curva de crescimento (representado por “\*” -  $p < 0,05$ ). Também houve diferença estatística entre as amostras em relação a LVH60a C1 no 6º dia, com exceção das cepas LVH161 e LVH161a (representado por “@” -  $p < 0,05$ ), e entre as amostras HUUFS14 e TCC039E em relação a LVH60a C1 no 7º dia (representado por “#” -  $p < 0,05$ ).

A partir dos dados de crescimento celular a 25 °C, foi possível calcular o tempo de duplicação, que representa o tempo que uma população leva para dobrar de tamanho. O tempo de duplicação das cepas *Crithidia* sp. LVH60A variou de 9,05 a 10,03 horas - LVH60a C1 e LVH117 C2, respectivamente. De maneira similar, *C. fasciculata* apresentou tempo de duplicação de 7,81 horas. No entanto, para *L. infantum* foi observado uma diferença significativa no tempo de duplicação a depender da cepa, variando de 9,48 horas (PP75) a 15,49 horas (LVH161) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Tempo de duplicação das cepas *Crithidia* sp. LVH60A, *L. infantum* e *C. fasciculata* em cultura a 25 °C.

Cepa	Espécie	Tempo de duplicação (horas)
HUUFS14	<i>L. infantum</i>	15,20
PP75	<i>L. infantum</i>	9,48
TCC039E	<i>C. fasciculata</i>	7,81
LVH60a C1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	9,05
LVH117	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	9,07
LVH117 C1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	9,87
LVH117 C2	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	10,03
LVH120	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	9,59
LVH120 C4	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	9,84
LVH120 C5	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	9,76
LVH161	<i>L. infantum</i>	15,49
LVH161a	<i>L. infantum</i>	15,41

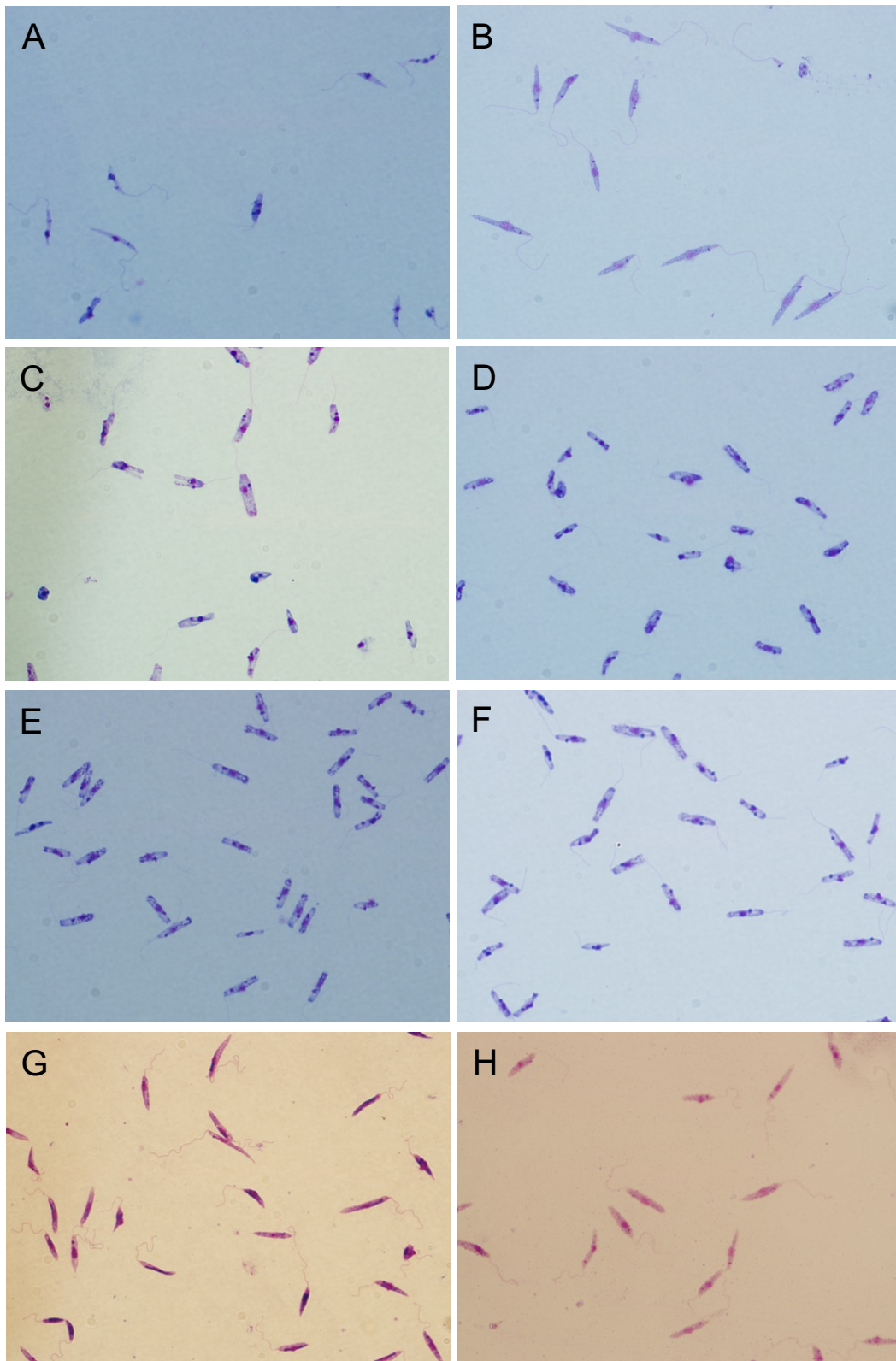
É importante destacar que *Crithidia* sp. LVH60A apresentou um fenótipo intermediário de crescimento celular, em que a 25 °C assemelha-se a *C. fasciculata* com alta taxa de duplicação, refletindo num crescimento mais abundante e acelerado e a 35 °C assemelha-se a *L. infantum*, com crescimento menos acelerado, mas sendo termotolerante a esta

temperatura. Já a cepa TCC039E (*C. fasciculata*) não foi capaz de se replicar em temperatura similar à corpórea de mamíferos.

#### **4.1.2 Análises morfológicas**

Com o propósito de realçar as estruturas celulares, como o cinetoplasto, núcleo e flagelo, foram realizados diversos esfregaços a partir de 10 µL das culturas de parasitas obtidas no oitavo dia da curva de crescimento de cada experimento. Imagens representativas de cada isolado são apresentadas na figura 10.

**Figura 10.** Imagens das culturas de tripanossomatídeos por microscopia de luz.

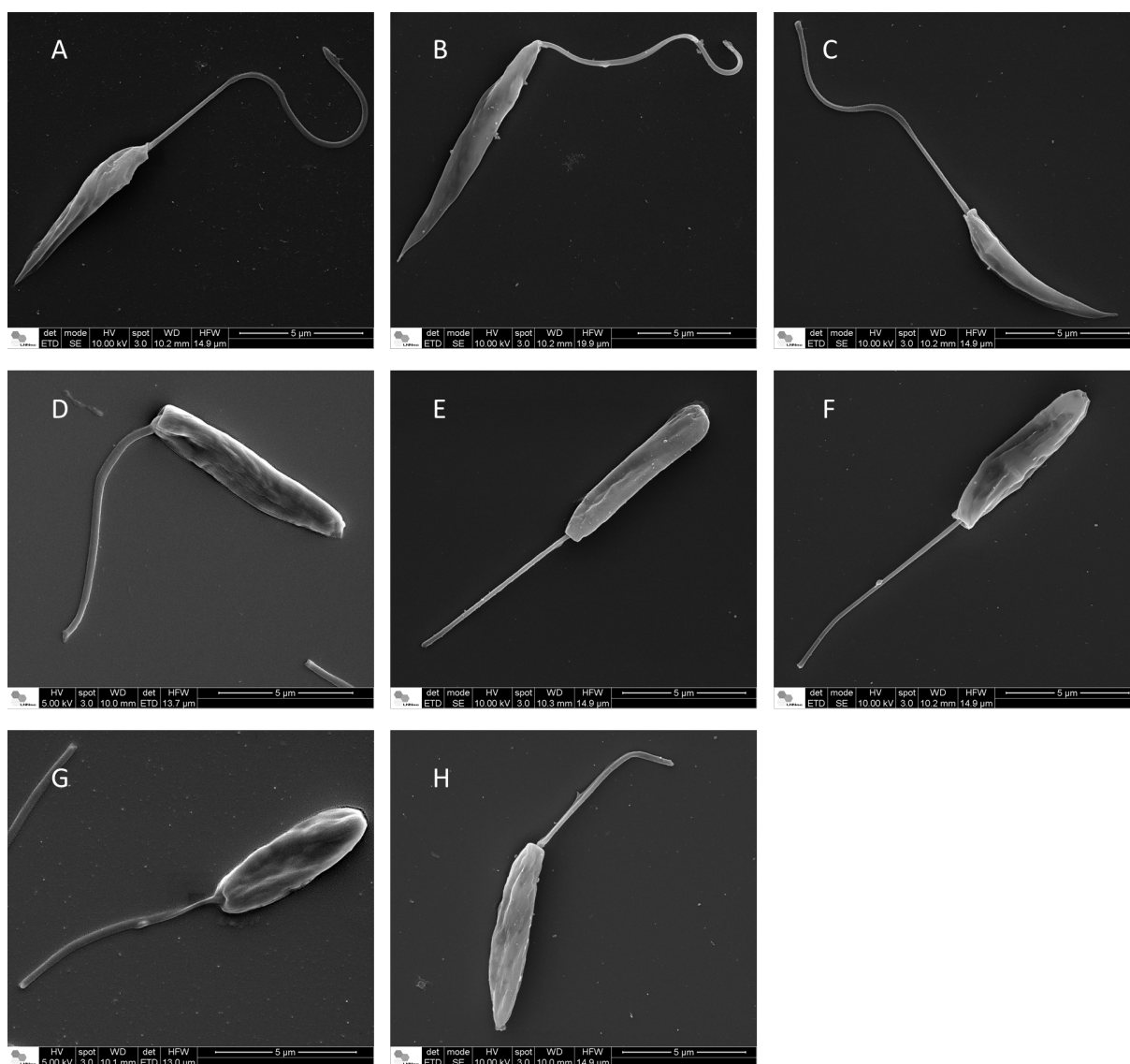


(A) cepa HUUF14 (*L. infantum*); (B) cepa PP75 (*L. infantum*); (C) cepa TCC039E (*C. fasciculata*); (D) cepa LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A); (E) isolado clínico LVH117 C1 (*Crithidia* sp. LVH60A); (F) isolado clínico LVH120 C4 (*Crithidia* sp. LVH60A); (G) isolado clínico LVH161 (*L. infantum*); (H) isolado clínico LVH161a (*L. infantum*). Imagens obtidas pelo microscópio de luz Olympus BX50F com a câmera anexada Olympus DP72 exibida com 1000x de aumento. As culturas foram

mantidas *in vitro* a 25 °C em meio Schneider suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2% de penicilina e estreptomicina e 2% de urina masculina filtrada.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com objetivo de examinar detalhadamente a morfologia celular em alta resolução. Para isto, foi realizado o cultivo dos isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A (LVH60 C3, LVH60a C1, LVH117 C1, LVH120 C4), *C. fasciculata* (TCC039E) e *L. infantum* (LVH161a, HUUFS14 e PP75), até o 8º dia de crescimento. Após o cultivo, as células foram fixadas, desidratadas e recobertas com partículas condutoras. Esse material foi fotografado em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e as imagens correspondentemente podem ser visualizadas na figura 11.

**Figura 11.** Microscopia eletrônica de varredura de parasitos em cultura *in vitro*.



(A) cepa HUUFS14 (*L. infantum*); (B) cepa PP75 (*L. infantum*) C4; (C) isolado clínico LVH161a (*L. infantum*); (D) isolado clínico LVH60 C3 (*Crithidia* sp. LVH60A); (E) isolado clínico LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A); (F) isolado clínico LVH117 C1 (*Crithidia* sp. LVH60A); (G) isolado clínico LVH120 C5 (*Crithidia* sp. LVH60A); (H) cepa TCC039E (*C. fasciculata*). Imagens obtidas no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), no laboratório Nacional de Nanotecnologia

(LNNano) através das propostas de pesquisa SEM-C2-26215 e SEM-C2-27188, utilizando o microscópio Inspect F50 (FEI Company, Japão). As culturas foram mantidas *in vitro* a 25 °C em meio Schneider suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2% de penicilina e estreptomicina e 2% de urina masculina filtrada.

Durante as análises morfológicas de ambas as microscopias, foram observados que os isolados clínicos LVH60 C3, LVH60a C1, LVH117 C1 e LVH120 C4, exibem células com formato mais arredondado e flagelos mais curtos. Essa morfologia também foi observada para a cepa TCC039E (*C. fasciculata*), aproximando-se da forma celular de coanomastigota. Por outro lado, os isolados de LVH161 e LVH161a, se assemelham às cepas HUUFS14 e PP75 (*L. infantum*), apresentando corpo celular alongado em formato fusiforme, com um flagelo longo, característico da forma promastigota metacíclica.

As imagens de MEV das cepas LVH60a C1, TCC039E e PP75 foram empregadas para fins de análise visual e comparativa da morfologia. Foram avaliados parâmetros como o comprimento de flagelo, área e comprimento do corpo, e os resultados destas medições, incluindo média, desvio padrão e valor máximo e mínimo, foram sumarizados na tabela 8.

**Tabela 8.** Medidas de estruturas celulares de promastigotas através da análise de fotografias obtidas por MEV.

Cepa	Espécie	Estrutura celular (número de células avaliadas)	Medida (µM)	Média ± SD (Min - Max)
PP75	<i>L. infantum</i>	Flagelo (63)	Comprimento	12,96 ± 2,43 (8,37 – 18,25)
			Área	11,13 ± 2,45 (6,68 -18,06)
		Corpo (78)	Comprimento	9,81 ± 1,65 (6,62 - 13,27)
LVH60a C1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	Flagelo (69)	Comprimento	8,19 ± 1,64 (5,34 – 11,85)
			Área	9,82 ± 2,40 (5,45 - 16,38)
		Corpo (70)	Comprimento	7,60 ± 1,15 (5,29 - 10,48)
TCC039E	<i>C. fasciculata</i>	Flagelo (76)	Comprimento	8,99 ± 2,37 (4,68 – 14,93)
			Área	13,92 ± 4,10 (7,81 - 29,73)
		Corpo (72)	Comprimento	8,05 ± 1,83 (4,93 – 13,21)

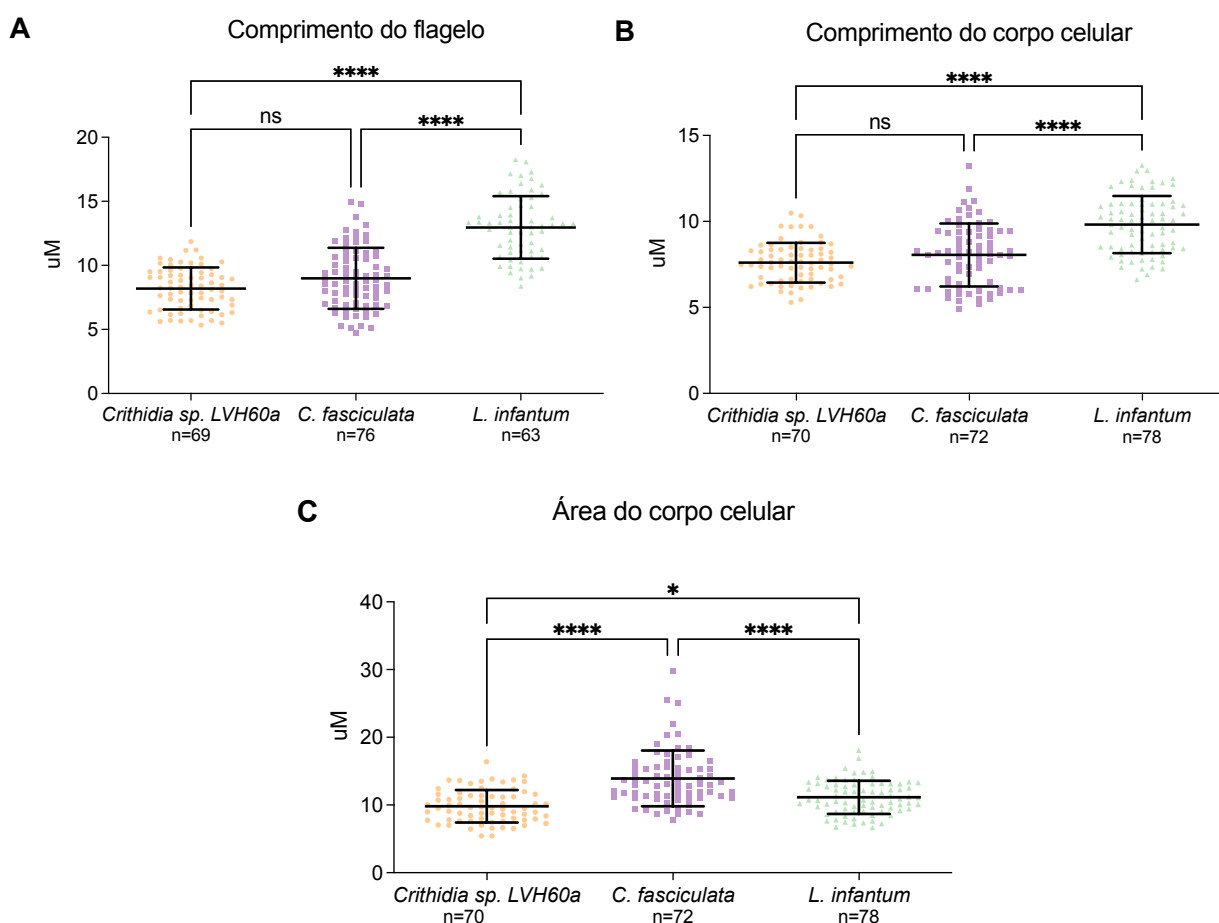
Além disso, informações adicionais, tais como mediana e o intervalo interquartil, que indicam os percentis 75 e 25 estão representados na figura 12.

A análise morfométrica revelou um comprimento flagelar em *L. infantum* significativamente maior do que os isolados *Crithidia* sp. LVH60A e *C. fasciculata* ( $p < 0,001$ ),



conforme demonstrado na figura 12. Os valores médios de comprimento flagelar foram de 8,19  $\mu\text{M}$  para *Crithidia* sp. LVH60A, 8,99  $\mu\text{M}$  para *C. fasciculata* e 12,96  $\mu\text{M}$  para *L. infantum* (Tabela 8). De maneira similar, foi observado que o comprimento do corpo celular de *L. infantum* é superior ao das espécies avaliadas neste experimento ( $p < 0,001$ ; Figura 12). No entanto, é importante notar que *C. fasciculata* possui maior área do corpo celular do que *L. infantum* ( $p < 0,001$ ) e *Crithidia* sp. LVH60A ( $p < 0,001$ ). Os valores médios da área do corpo celular foram de 9,82  $\mu\text{M}$  para *Crithidia* sp. LVH60A, 13,92  $\mu\text{M}$  para *C. fasciculata* e 11,13  $\mu\text{M}$  para *L. infantum* (Figura 12; Tabela 8).

**Figura 12.** Medidas em micrometros ( $\mu\text{M}$ ) de estruturas celulares de promastigotas de *Crithidia* sp. LVH60A, *C. fasciculata* e *L. infantum*.

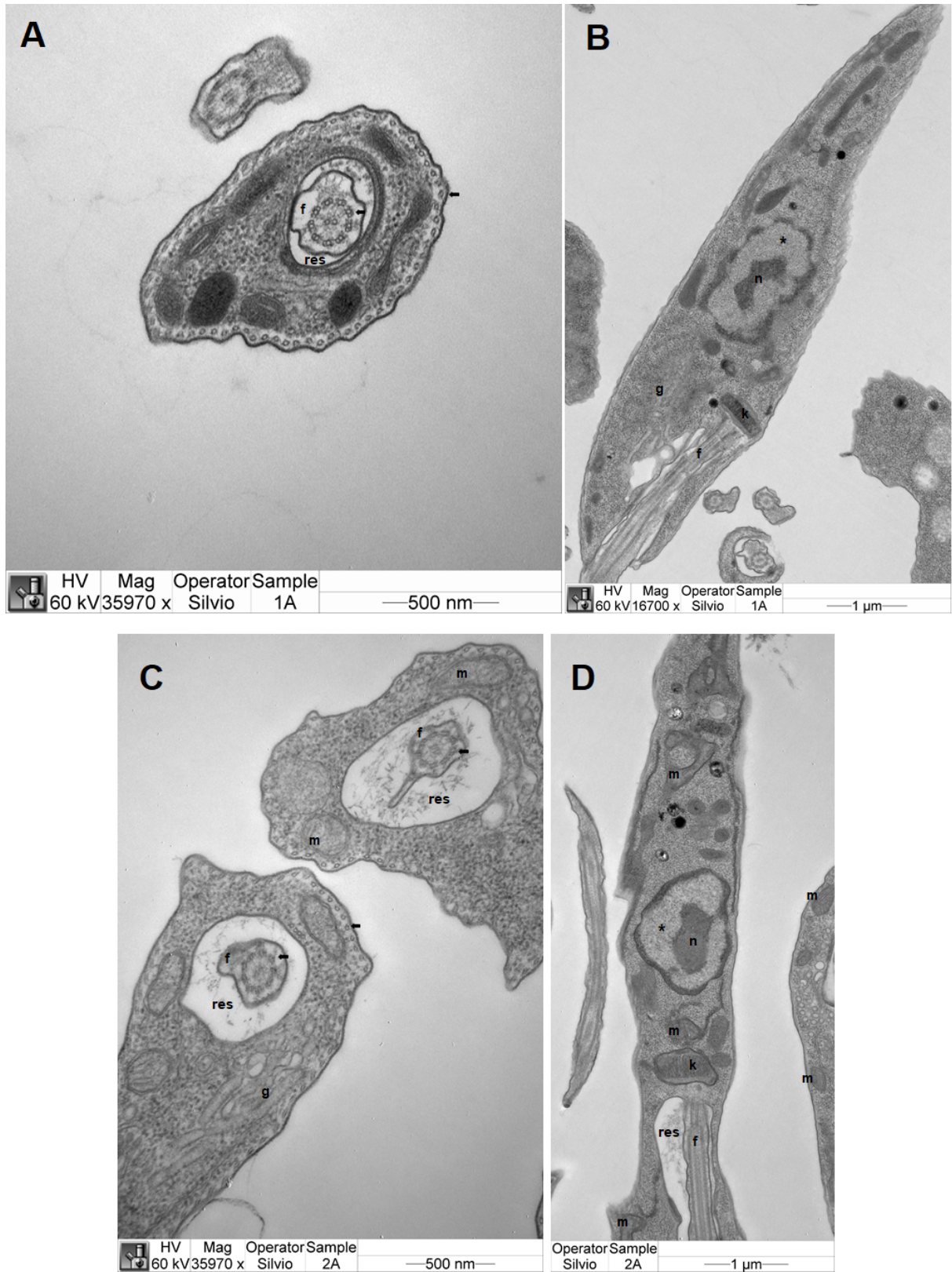


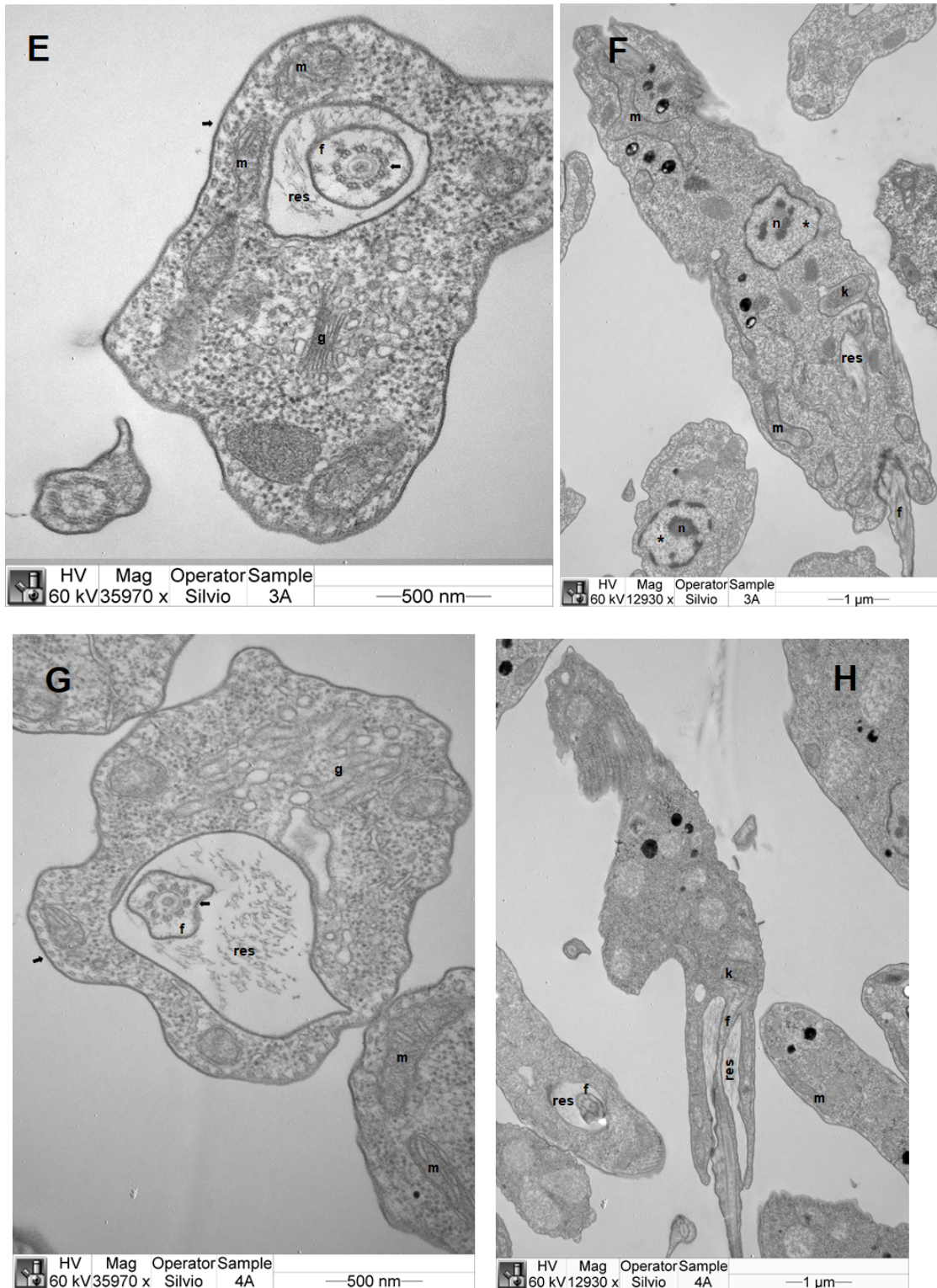
**(A)** Comprimento do flagelo; **(B)** Comprimento do corpo celular; **(C)** Área do corpo celular. As medidas foram analisadas pelo *software* Digimazer através de imagens obtidas pelo microscópio Inspect F50 (FEI Company, Japão). A mediana é representada pela linha dentro da caixa. O intervalo interquartil é delimitado pelas bordas superior e inferior, que indicam os percentis 75 e 25, respectivamente. Os dados foram analisados com teste estatístico One-Way ANOVA acrescido do pós-teste Bonferroni, usando o programa GraphPrism 9.0. \*\*\*\*, \*\*\* e \* representam diferença estatística de  $P < 0,0001$ ,  $P < 0,001$  e  $P < 0,5$ , respectivamente.

Também foi realizada a análise das ultraestruturas. Para este experimento, utilizamos as seguintes amostras: *C. fasciculata* TCC039E, *L. infantum* PP75, LVH117 C1 e LVH60a C1

(*Crithidia* sp. LVH60A) em dois diferentes estágios de desenvolvimento: na fase de crescimento ativo (mid-log) e na fase estacionária. As imagens em diferentes cortes dos protozoários durante a fase mid-log se encontram dispostos na figura 13.

**Figura 13.** Microscopia eletrônica de transmissão de ultraestruturas de parasitos em cultura (fase mid-log).





(A) Corte transversal e (B) corte longitudinal da cepa PP75 (*L. infantum*); (C) Corte transversal e (D) corte longitudinal do isolado clínico LVH117 C1 (*Crithidia* sp. LVH60A); (E) Corte transversal e (F) corte longitudinal do isolado clínico LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A); (G) Corte transversal e (H) corte longitudinal da cepa TCC039E (*C. fasciculata*); Setas representam os microtúbulos, (f) flagelo, (m) mitocôndria, (n) núcleo, (k) cinetoplasto, (g) complexo de golgi, (res) reservatório flagelar e (\*) zona clara do núcleo. As seções ultrafinas foram fotografadas em um microscópio eletrônico de transmissão a uma tensão de aceleração de 60 kV. As culturas foram mantidas *in vitro* a 25 °C em meio Schneider suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2% de penicilina e estreptomicina e 2% de urina masculina filtrada.

Apesar de existir uma relação estabelecida entre o tamanho e inserção do flagelo, posição do cinetoplasto e do núcleo, que são utilizadas para determinar e diferenciar espécies de tripanossomatídeos (RODRIGUEZ, et al., 2018), não foi possível observar diferenças na posição do cinetoplasto e do núcleo nas células analisadas na fase mid-log das diferentes espécies utilizadas (Figura 13). No entanto, foi notado que a bolsa flagelar em *C. fasciculata* é maior do que nos isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A (Figura 13 C-H) e PP75 (*L. infantum*). Essa variação no tamanho do reservatório flagelar já foi descrita anteriormente para *C. fasciculata* (BROOKER, 1971; KUSEL; MOORE; WEBER, 1967; YURCHENKO et al., 2008).

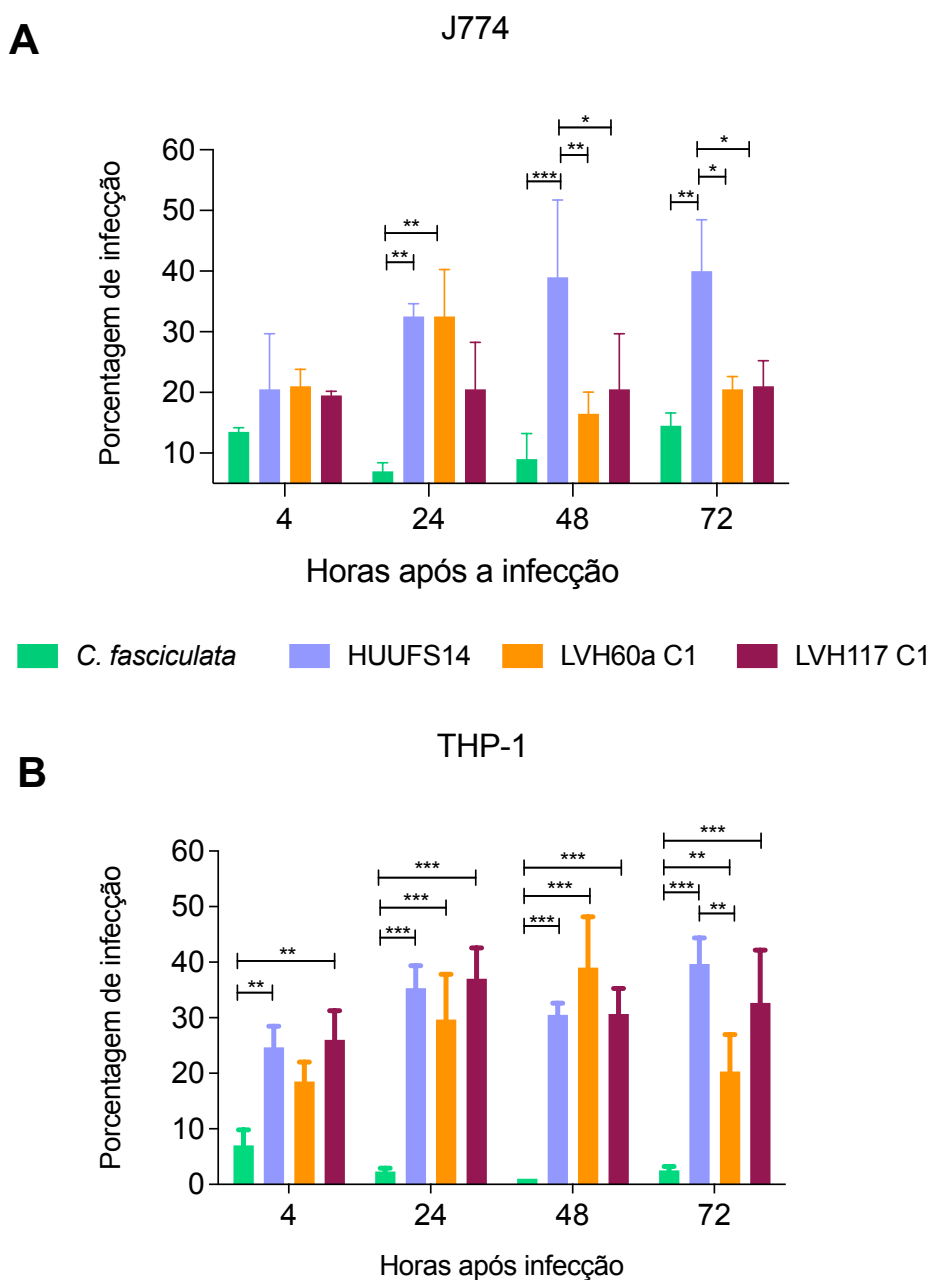
Conforme pode ser observado na figura 13, nas imagens A, C, E e G, os flagelos de todas as espécies de tripanossomatídeos analisadas exibem um arranjo característico de 9 + 2 de microtúbulos do axonema. Esta estrutura é comum em todos os flagelados da subfamília *Leishmaniinae* (BROOKER, 1971; GLUENZ; GINGER; MCKEAN, 2010). O núcleo, localizado centralmente, encontra-se envolvido por 2 membranas unitárias que são separadas por uma zona clara. Anterior e lateralmente ao núcleo está posicionado o cinetoplasto em forma ovalada. No cinetoplasto existe um núcleo central de fibras elétron-densas que são direcionadas paralelamente ao eixo longitudinal da célula, que dá o formato de cápsula. Esse posicionamento já foi descrito anteriormente para *C. fasciculata* (KUSEL; MOORE; WEBER, 1967), mas também pode ser observada para as cepas de *Crithidia* sp. LVH60A e *L. infantum* (Figura 13).

#### **4.1.3 Avaliação da infectividade *in vitro***

#### **4.1.4 Infecção *in vitro* com linhagens celulares imortalizadas**

Os isolados clínicos LVH117 C1 e LVH60a C1 foram utilizados nas infecções de macrófagos diferenciados das linhagens celulares THP-1 (humana) e J774 (murina), utilizando MOI de 10:1. Além disso, foram utilizados como controle positivo de infecção a cepa de *L. infantum* HUUFS14 e como controle negativo, a cepa *C. fasciculata* TCC039E. As lâminas foram submetidas a coloração e as infecções foram posteriormente examinadas em microscópio de luz com ampliação de 1000x, utilizando óleo de imersão. A porcentagem de infecção, número médio de amastigotas intracelulares por célula infectada e o índice de infecção foram determinados em intervalos de 4, 24, 48 e 72 horas após a infecção (hpi) como mostra a Figura 14. Os dados de infecção também foram tabulados e mostrados na Tabela 9.

**Figura 14.** Porcentagem de infecção de macrófagos infectados com cepas de *Crithidia* sp. LVH60A, *L. infantum* e *C. fasciculata*.



(A) Porcentagem de infecção *in vitro* da linhagem celular J774; (B) Porcentagem de infecção *in vitro* de macrófagos provenientes da linhagem celular THP-1. Os dados foram analisados com teste estatístico Two-Way ANOVA acrescido do pós-teste Bonferroni, usando o programa GraphPrism 9.0. “\*”, “\*\*” e “\*\*\*” representam diferença estatística de  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente.

No tempo de 4 hpi, foi possível observar uma diferença significativa na porcentagem de infecção apenas de macrófagos derivados da linhagem celular THP-1 (Figura 14B). Embora todos os isolados de *Crithidia* sp. LVH60A (LVH60a C1 e LVH117 C1) e *L. infantum* (HUUFS14) tenham demonstrado uma porcentagem de infecção maior em comparação com TCC039E (*C. fasciculata*), apenas os isolados HUUFS14 e LVH117 C1 apresentaram

diferença significativa ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente). Notavelmente, a cepa LVH60a C1 apresentou maior infectividade neste tempo - 21% de infecção – ao usar macrófagos J774, enquanto LVH117 C1 alcançou 21,2% de infecção utilizando macrófagos THP-1 (Figura 14; Tabela 9).

De modo similar, em 24 hpi, os isolados clínicos LVH60a C1 e LVH117 C1 e a cepa HUUFS14 apresentaram maior porcentagem de infecção de macrófagos diferenciados provenientes de THP-1 quando comparados com a cepa TCC039E, com diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ) (Figura 14B). Todavia, utilizando macrófagos J774, apenas as cepas HUUFS14 e LVH60a C1 apresentaram diferença estatística significativa ( $P < 0,01$ ) (Figura 14A). As cepas mais infectivas neste tempo foram LVH60a C1 e HUUFS14 (32,5% de infecção) e LVH117 C1 (33,1% de infecção) utilizando macrófagos J774 e THP-1, respectivamente (Figura 14; Tabela 9).

No período de 48 hpi, ao utilizar macrófagos J774, a cepa HUUFS14 apresentou maior porcentagem de infecção, correspondendo a 39% de células infectadas, com diferença estatisticamente significativa em comparação a LVH60a C1 ( $P < 0,01$ ), LVH117 C1 ( $P < 0,5$ ) e TCC039E ( $P < 0,001$ ). Em contrapartida, *C. fasciculata* apresentou uma porcentagem de infecção menor, correspondendo a 9% de células infectadas neste tempo (Figura 14A; Tabela 9). De maneira similar, em 72 hpi o isolado de *L. infantum* HUUFS14 apresentou a maior porcentagem de infecção, correspondendo a 40% de células infectadas, com diferença significativa em comparação com as demais cepas testadas ( $p < 0,05$ ).

No entanto, em 48 hpi, quando foi avaliado a infecção de macrófagos derivados de THP-1, os isolados clínicos LVH60a C1 e LVH117 C1 e a cepa HUUFS14 apresentaram uma porcentagem de infecção maior em comparação com a cepa TCC039E, com diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ), sendo a cepa LVH60a C1 a mais infectiva, correspondendo a 32,1% de células infectadas (Figura 14B; Tabela 9). Já em 72 hpi, a cepa que apresentou maior porcentagem de infecção foi HUUFS14 (39,4%), com diferença estatisticamente significativa em relação à TCC039E ( $P < 0,001$ ) e LVH60a C1 ( $P < 0,01$ ). Todas as cepas tiveram diferença estatística significativa na porcentagem de infecção em relação a cepa TCC039E de *C. fasciculata* ( $P < 0,01$ ) (Figura 14B).

O número de parasitas por macrófago J744 infectado (amastigota intracelular por macrófago) foi maior para as células infectadas pela cepa HUUFS14 nos tempos 4, 24, 48 e 72 hpi. De forma semelhante, a carga parasitária em macrófagos derivados de THP-1 em 24, 48 e 72 hpi foi maior para a cepa HUUFS14. Já em 4 hpi, o isolado clínico LVH117 C1 obteve maior número de parasitas por macrófagos (Tabela 9).

**Tabela 9** Porcentagem de infecção, relação amastigota/macrófago e índice de infecção das diferentes linhagens de macrófagos infectados com cepas de *Crithidia* sp. LVH60a, *Leishmania infantum* e *Crithidia fasciculata*.

Linhagem celular	Cepa	% infecção												Relação Amastigota/Macrófago infectado												Índice de infecção												
		4h			24h			48h			72h			4h			24h			48h			72h			4h			24h			48h			72h			
		p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.						
J774	LVH60a C1	21,0	32,5	16,5	20,5	1,86	1,57	1,55	2,66	47,5	46,47	29,45	59,3	21,0	32,5	16,5	20,5	1,86	1,57	1,55	2,66	47,5	46,47	29,45	59,3	21,0	32,5	16,5	20,5	1,86	1,57	1,55	2,66	47,5	46,47	29,45	59,3	
	LVH117 C1	19,5	20,5	20,5	21,0	2,1	1,87	1,6	1,81	39,33	61,35	26,15	37,06	19,5	20,5	20,5	21,0	2,1	1,87	1,6	1,81	39,33	61,35	26,15	37,06	19,5	20,5	20,5	21,0	2,1	1,87	1,6	1,81	39,33	61,35	26,15	37,06	
	HUUFS14	20,5	32,5	39,0	40,0	2,21	2,9	2,29	2,75	44,85	94,25	91,02	107,3	20,5	32,5	39,0	40,0	2,21	2,9	2,29	2,75	44,85	94,25	91,02	107,3	20,5	32,5	39,0	40,0	2,21	2,9	2,29	2,75	44,85	94,25	91,02	107,3	
	TCC039E	13,5	7,0	9,0	14,5	1,61	1,14	1,5	1,8	21,64	7,96	15,0	25,65	13,5	7,0	9,0	14,5	1,61	1,14	1,5	1,8	21,64	7,96	15,0	25,65	13,5	7,0	9,0	14,5	1,61	1,14	1,5	1,8	21,64	7,96	15,0	25,65	
THP-1	LVH60a C1	17,7	27,6	32,1	17,9	1,6	1,7	1,9	1,6	28,4	47,1	66,9	29,4	17,7	27,6	32,1	17,9	1,6	1,7	1,9	1,6	28,4	47,1	66,9	29,4	17,7	27,6	32,1	17,9	1,6	1,7	1,9	1,6	28,4	47,1	66,9	29,4	
	LVH117 C1	21,2	33,1	26,8	19,3	1,8	2,0	1,8	1,8	39,1	65,5	47,6	41,3	21,2	33,1	26,8	19,3	1,8	2,0	1,8	1,8	39,1	65,5	47,6	41,3	21,2	33,1	26,8	19,3	1,8	2,0	1,8	1,8	39,1	65,5	47,6	41,3	
	HUUFS14	19,7	29,0	22,3	39,4	1,7	2,1	2,2	3,4	36,2	64,3	52,2	131,5	19,7	29,0	22,3	39,4	1,7	2,1	2,2	3,4	36,2	64,3	52,2	131,5	19,7	29,0	22,3	39,4	1,7	2,1	2,2	3,4	36,2	64,3	52,2	131,5	
	TCC039E	8,0	4,7	2,7	4,4	1,7	1,1	1,1	1	10,2	4,6	3,5	5,3	8,0	4,7	2,7	4,4	1,7	1,1	1,1	1	10,2	4,6	3,5	5,3	8,0	4,7	2,7	4,4	1,7	1,1	1,1	1	10,2	4,6	3,5	5,3	
BMDM	LVH60a C1	NA	41,5	52,83	37,6	NA	2,45	3,30	4,07	NA	101,67	174,33	153,03	NA	41,5	52,83	37,6	NA	2,45	3,30	4,07	NA	101,67	174,33	153,03	NA	41,5	52,83	37,6	NA	2,45	3,30	4,07	NA	101,67	174,33	153,03	
	LVH117 C1	NA	63,0	57,83	43,0	NA	4,32	4,46	4,20	NA	276,16	257,92	180,60	NA	63,0	57,83	43,0	NA	4,32	4,46	4,20	NA	276,16	257,92	180,60	NA	63,0	57,83	43,0	NA	4,32	4,46	4,20	NA	276,16	257,92	180,60	
	PP75 P1E2	NA	21,75	29,66	26,66	NA	1,69	1,48	1,62	NA	36,75	43,89	43,18	NA	21,75	29,66	26,66	NA	1,69	1,48	1,62	NA	36,75	43,89	43,18	NA	21,75	29,66	26,66	NA	1,69	1,48	1,62	NA	36,75	43,89	43,18	
	HUUFS14	NA	49,25	51,0	48,75	NA	3,71	4,58	4,76	NA	182,71	233,58	232,05	NA	49,25	51,0	48,75	NA	3,71	4,58	4,76	NA	182,71	233,58	232,05	NA	49,25	51,0	48,75	NA	3,71	4,58	4,76	NA	182,71	233,58	232,05	
PBMC	TCC039E	NA	3	4,5	5,25	NA	1,22	1,19	1,56	NA	3,66	5,35	6,09	NA	3	4,5	5,25	NA	1,22	1,19	1,56	NA	3,66	5,35	6,09	NA	3	4,5	5,25	NA	1,22	1,19	1,56	NA	3,66	5,35	6,09	
	LVH60a C1	NA	32,5	NA	NA	NA	2,0	NA	NA	NA	65,0	NA	NA	NA	32,5	NA	NA	NA	2,0	NA	NA	NA	65,0	NA	NA	NA	NA	32,5	NA	NA	NA	2,0	NA	NA	NA	65,0	NA	NA
	HUUFS14	NA	65,0	NA	NA	NA	3,8	NA	NA	NA	247,0	NA	NA	NA	65,0	NA	NA	NA	3,8	NA	NA	NA	247,0	NA	NA	NA	NA	65,0	NA	NA	NA	3,8	NA	NA	NA	247,0	NA	NA

NA = Não avaliado



Todas as cepas, exceto o isolado LVH117 C1 (*Crithidia* sp. LVH60A), alcançaram o valor máximo de índice de infecção de macrófagos J774 no tempo de 72 hpi. Os índices de infecção nos diferentes tempos variaram de um mínimo de 7,96 (*C. fasciculata* TCC039E – 24 hpi) e no máximo de 107,3 (HUUFS14 – 72 hpi). Todavia, o índice de infecção em macrófagos derivados de THP-1 foi maior para a cepa LVH117 C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) nos tempos de 4 e 24 hpi (39,1 e 65,5, respectivamente), LVH60a C1 no tempo de 48 hpi (66,9) e *L. infantum* HUUFS14 no tempo de 72 hpi (131,5). Em todos os tempos o menor índice de infecção foi obtido por *C. fasciculata* TCC039E (Tabela 9).

#### 4.1.5 Infecção *in vitro* com cultura celular primária

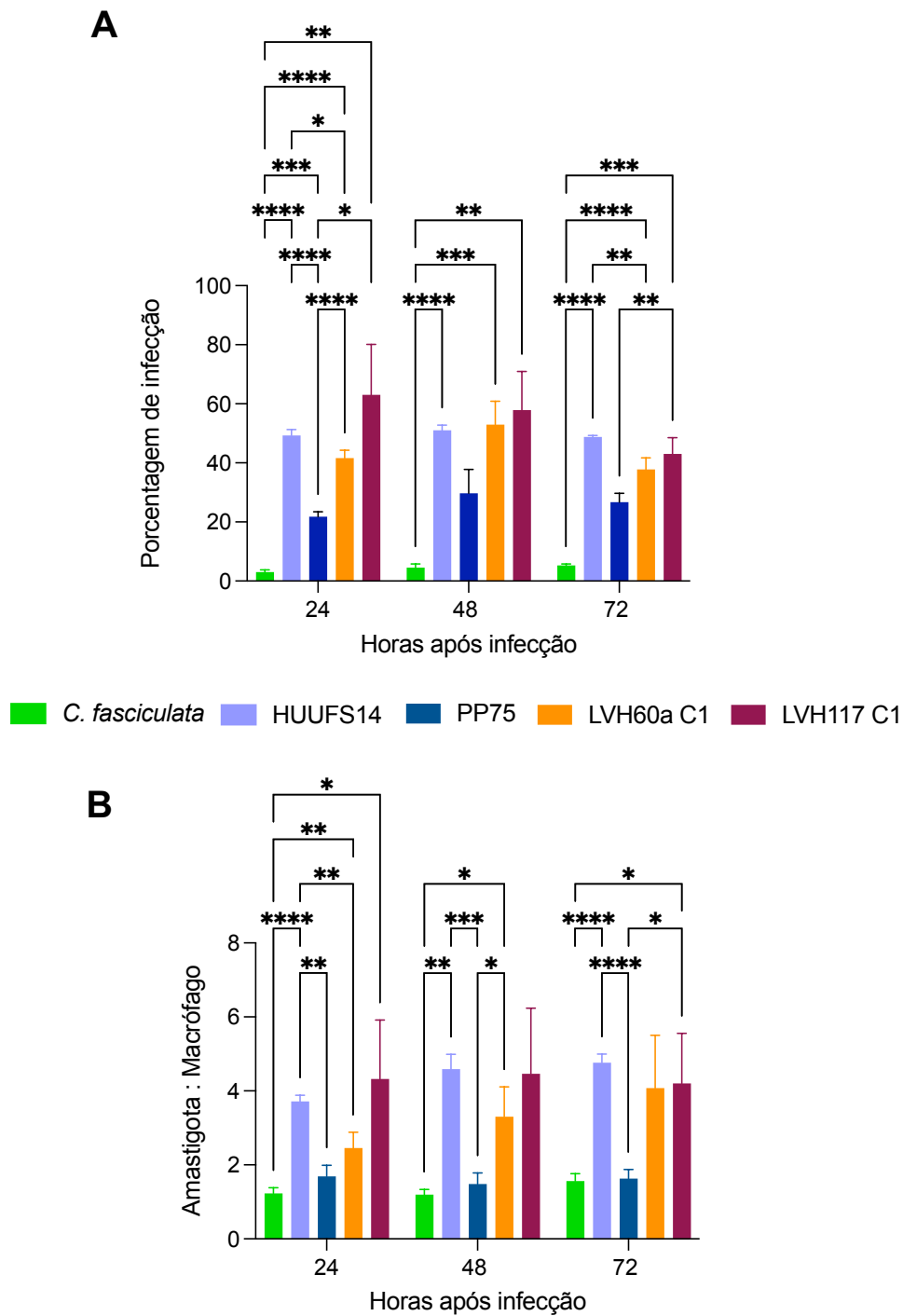
Avaliamos também a capacidade de infecção das diferentes cepas *Crithidia* sp. LVH60A utilizando macrófagos diferenciados da cavidade medular de camundongos BALB/c (BMDM). Além disso, foram utilizadas cepas da espécie *L. infantum* (PP75 e HUUFS14) e *C. fasciculata* (TCC039E) para comparação. As infecções foram avaliadas nos períodos de 24, 48 e 72 hpi. As lâminas foram coradas e as infecções foram observadas por microscopia de luz. A porcentagem de infecção e o número médio de amastigotas intracelulares por célula infectada estão representadas na figura 15. As imagens das infecções, representadas na figura 16, foram obtidas utilizando o microscópio de luz Olympus BX50F com a câmera anexada Olympus DP72 exibida com 1000 x.

No tempo de 24 horas, os clones dos isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A apresentaram maior porcentagem de infecção de macrófagos quando comparados com a cepa PP75 e TCC039E. Estas diferenças foram estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ). Notavelmente, a cepa LVH117 C1 apresentou maior infectividade, atingindo 63% de infecção neste tempo (Figura 15A; Tabela 9).

De maneira similar, em 48 hpi, a cepa LVH117 C1 apresentou uma porcentagem de infecção maior, correspondendo a 57,83% de células infectadas, seguido por LVH60a C1 (52,83%) e HUUFS14 (51%). Todas as cepas, com exceção de PP75, apresentaram diferença significativa em comparação com TCC039E ( $P < 0,01$ ). Entretanto, em 72 hpi, a cepa HUUFS14 foi mais infectiva, correspondendo a 48,75% das células infectadas, seguido por LVH117 C1 (43%) e LVH60a C1 (37,6%) (Figura 15A; Tabela 9).

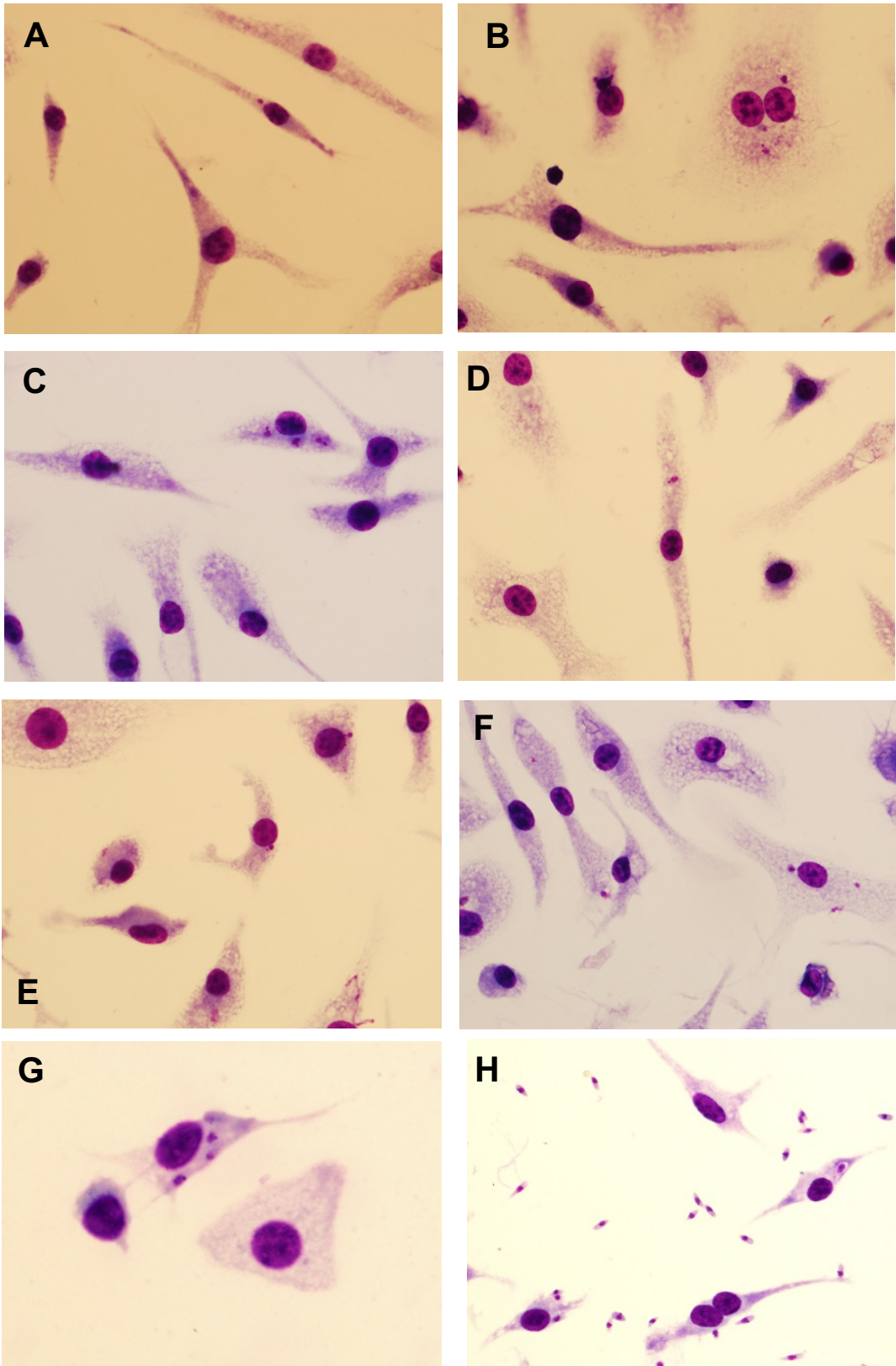
O número de parasitas por célula infectada foi maior para as células infectadas com a cepa HUUFS14 de *L. infantum* em todos os tempos avaliados, seguido pelo isolado clínico LVH117 C1 (Figura 15B; Tabela 9). As taxas de infecção nos diferentes tempos resultaram no mínimo de 3,66 (*C. fasciculata* em 24 hpi) e no máximo de 276,16 (LVH117 C1 em 24 hpi). Em todos os tempos *C. fasciculata* apresentou menor porcentagem de infecção e número médio de amastigotas por macrófago infectado, resultando consequentemente, menor índice de infecção (Figura 15; Tabela 9).

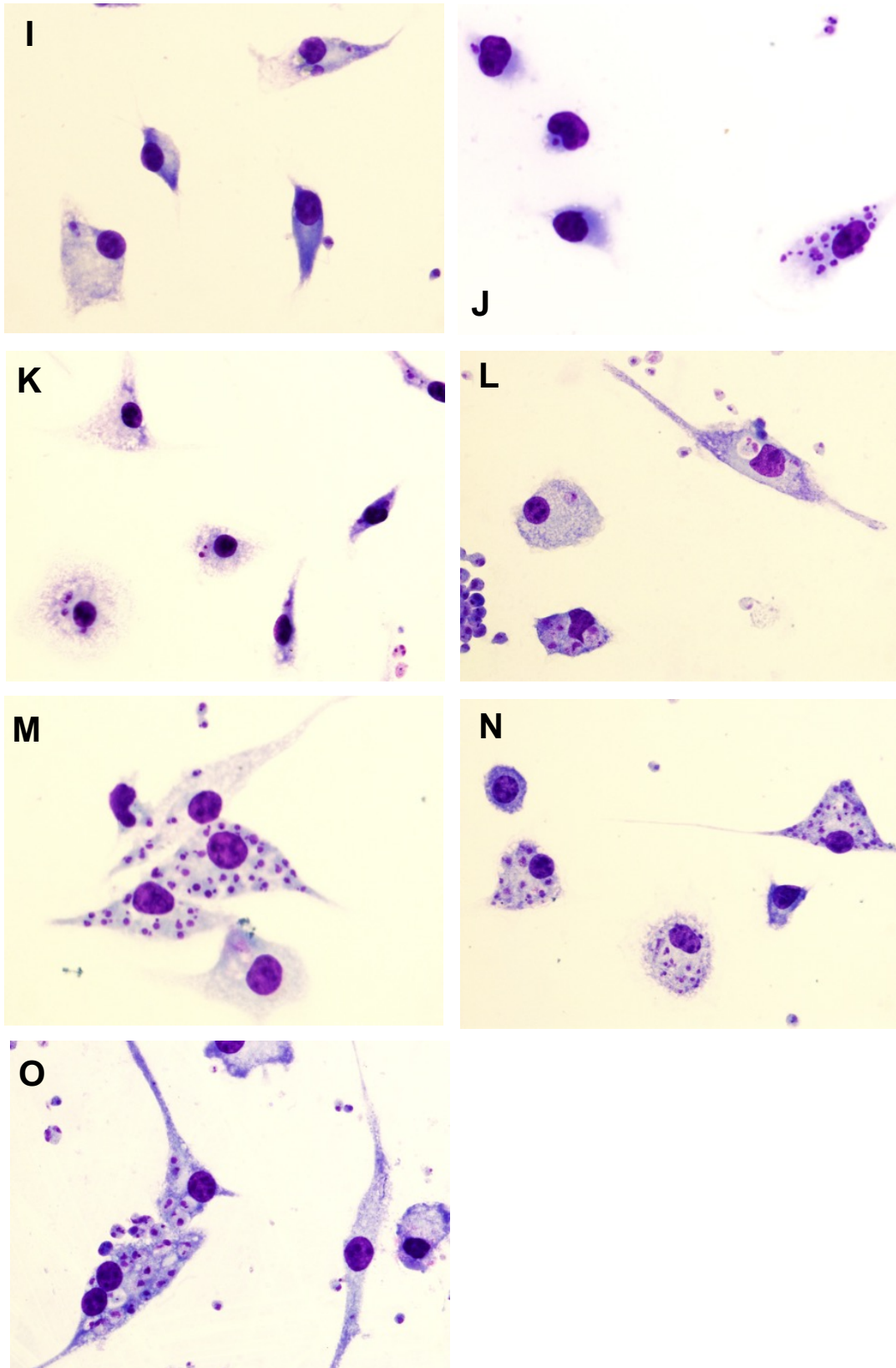
**Figura 15.** Infecção *in vitro* de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongo infectados com diferentes cepas de *Crithidia* sp. LVH60A, *L. infantum* e *C. fasciculata*.



(A) Porcentagem de infecção de macrófagos diferenciados de medula óssea de camundongo; (B) Número médio de parasitas por célula infectada após 24, 48 e 72 horas p.i. Os dados foram analisados com teste estatístico Two-Way ANOVA acrescido do pós-teste Bonferroni, usando o programa GraphPrism 9.0. \*, \*\*, \*\*\* e \*\*\*\* representam diferença estatística de  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  e  $P < 0,0001$ , respectivamente.

**Figura 16.** Imagens de microscopia de luz de macrófagos provenientes de medula óssea de camundongos Balb/C, infectados com diferentes cepas de tripanossomatídeos no tempo de 24, 48 e 72 horas após a infecção.

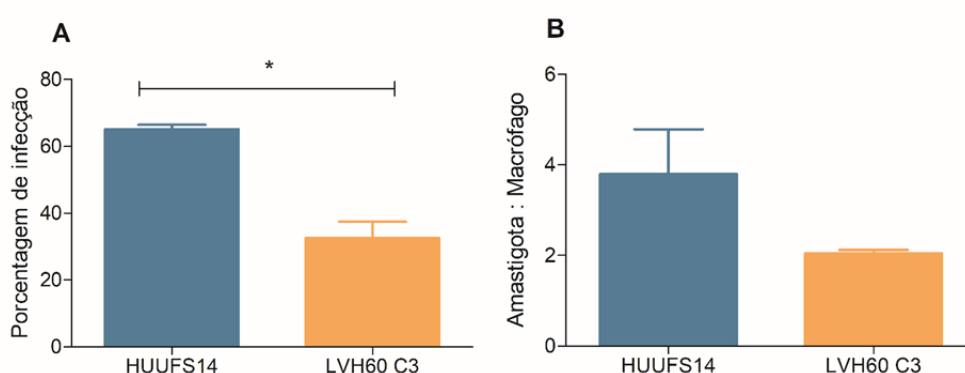




Macrófagos infectados com a cepa TCC039E (*C. fasciculata*) em 24- (A), 48- (B) e 72 hpi (C); Macrófagos infectados com o isolado HUUFS14 (*L. infantum*) em 24- (D), 48 (E) e 72 hpi (F); Macrófago infectado com a cepa PP75 (*L. infantum*) em 24- (G), 48- (H) e 72 hpi (I); Macrófago infectado com o isolado LVH60a C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) em 24- (J), 48- (K) e 72 hpi (L); Macrófagos infectados com o isolado LVH117 C1 (*Crithidia* sp. LVH60A) em 24- (M), 48- (N) e 72 hpi (O). Imagens obtidas pelo microscópio de luz Olympus BX50F com a câmera anexada Olympus DP72 exibida com 1000x.

Um experimento piloto utilizando monócitos de sangue periférico humano (PBMC) foi realizado empregando duas espécies de tripanossomatídeos (*L. infantum* HUUFS14 e *Crithidia* sp. LV60A isolado clínico LVH60 C3). PBMCs foram diferenciados em macrófagos e estes foram infectados na proporção de 5:1 MOI por 24 horas. As lâminas foram coradas e as infecções foram observadas em microscópio de luz com aumento de 1000 x usando óleo de imersão. A porcentagem de infecção e número médio de parasitas por célula infectada encontram-se na figura 17.

**Figura 17.** Porcentagem de infecção em PBMC e número médio de parasitas por macrófago infectado com *Crithidia* sp. LVH60A e *L. infantum*.



(A) Porcentagem de infecção após 24 horas após infecção (p.i); (B) Número médio de parasitas por célula infectada após 24 horas p.i. \* representam diferença significativa de infecção entre as cepas, obtidas pelo Teste T não pareado ( $p$ -value = 0,0123).

Em 24 horas de infecção, a cepa HUUFS14 apresentou porcentagem de infecção de 65%, com média de 3,8 parasitas por célula infectada. Já o clone 3 (C3) isolado LVH60, apresentou 32,5% de células infectadas, com diferença estatística significativa ( $P < 0,0123$ ), e média de 2 parasitos por macrófago (Figura 17; Tabela 9).

## 4.2 Caracterização molecular

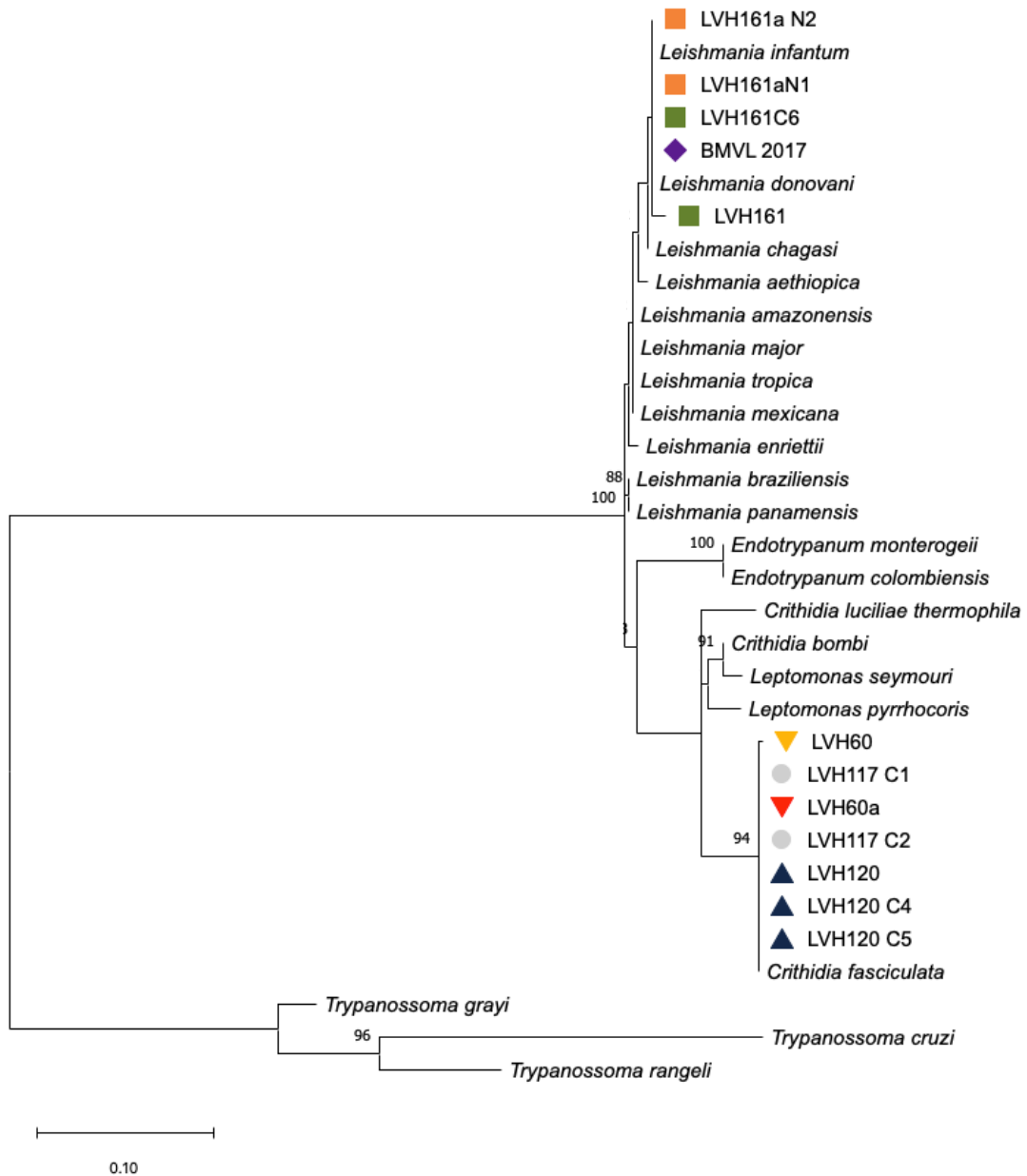
### 4.2.1 Análise filogenética do marcador taxonômico SSU rRNA

A árvore filogenética foi construída com base na região variável V7-V8 de SSU rRNA, presente em todos os tripanossomatídeos. Esta análise incluiu as sequências de isolados clínicos LVH117, LVH120, LVH161 e LVH161a, juntamente com a amostra de biópsia de medula óssea de 2017 e sequências correspondentes de organismos de diferentes grupos taxonômicos de tripanossomatídeos.

A análise filogenética mostrou que os isolados policlonais LVH117 e LVH120 e seus clones agrupam-se com *C. fasciculata*, uma espécie considerada não patogênica para os seres humanos. De maneira interessante, a amostra de DNA de medula óssea do paciente BASF coletada em 2017 agrupou-se com o clado de *Leishmania*, apontando uma coinfeção

entre estas duas espécies em 2017. Por outro lado, os isolados clínicos obtidos em 2020 (LVH161, LVH161 C6 LVH161aN1 e LVH161aN2) agruparam-se com *Leishmania infantum* (ROGERIO et al., 2023), como demonstrado na figura 18.

**Figura 18.** Análise filogenética de sequências de SSU (18S rRNA).



O alinhamento foi realizado com Muscle (software Mega X), usando sequências de nucleotídeos obtidas no banco de dados NCBI (códigos de acesso disponíveis na tabela 2). As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de *Maximum Likelihood*, baseado no modelo de substituição de nucleotídeo Kimura 2-parameter. A árvore com a maior verossimilhança logarítmica (0,00) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam está indicada acima dos ramos (valores do teste de *bootstrap* com 1.000 repetições). As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL), e então selecionando a topologia com o valor superior de verossimilhança logarítmica. Uma distribuição discreta de Gamma foi utilizada para modelar diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios (5 categorias (+G, parâmetro = 0,4696)). A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramo

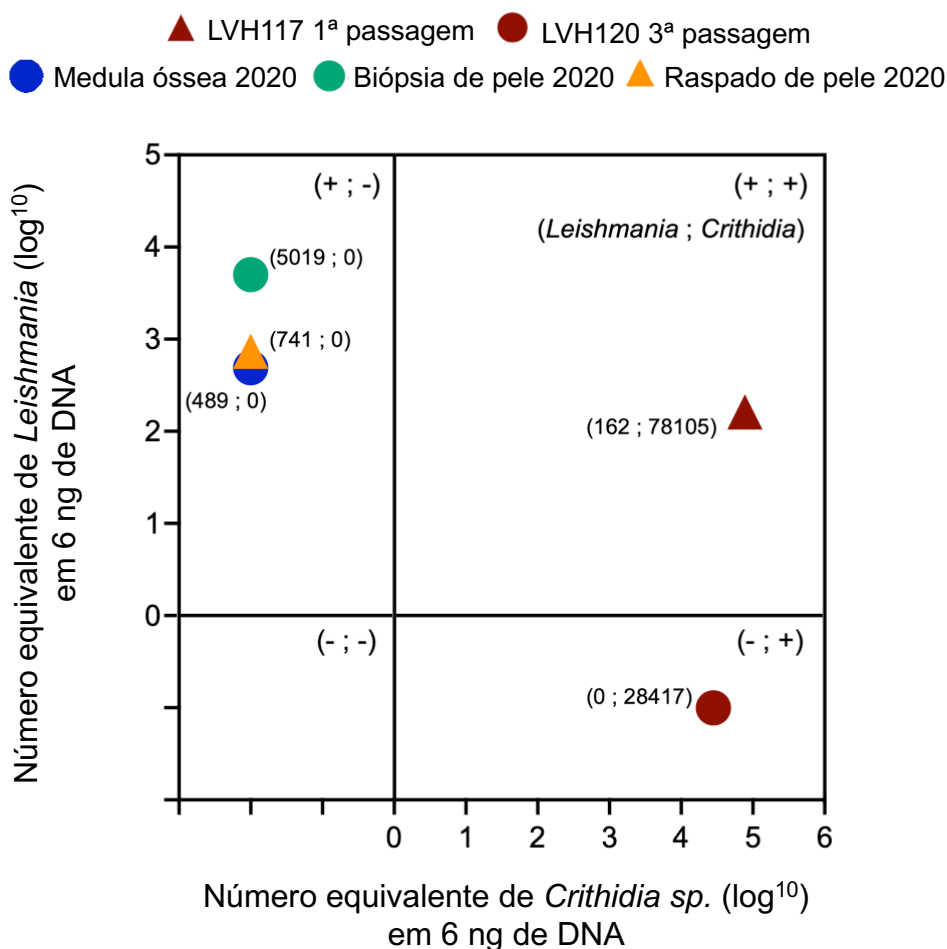
medidos no número de substituições por sítio. Essa análise envolveu 33 sequências nucleotídicas. Houve um total de 570 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X. O diamante roxo representa a medula óssea do paciente BASF obtida em 2017, os círculos cinzas indicam cepas de parasitas isoladas em 2017 da medula óssea, os triângulos azuis indicam cepas de parasitas isoladas em 2017 do baço, o quadrado verde indica cepas de parasitas isoladas em 2020 da medula óssea, os quadrados laranjas indicam cepas de parasitas isoladas em 2020 de nódulo de pele. Os triângulos invertidos amarelo e vermelho representam isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A obtidos da medula óssea e lesão de pele, respectivamente (Maruyama et al., 2019). C#: colônias clonais para as respectivas cepas de parasitas. Fonte: Adaptado de ROGERIO et al., 2023.

#### 4.2.2 Quantificação da carga parasitária

Foram isolados DNA das amostras biológicas coletadas do paciente BASF em 2020, assim como culturas de promastigotas isoladas em 2017, a partir da medula óssea (LVH117, primeira passagem) e do baço (LVH120, terceira passagem), ambos com baixo número de cultivo.

Em concordância com a análise de filogenia mostrada anteriormente, as amostras biológicas de 2020 amplificaram para *L. infantum* (Takamiya et al., 2023; Rogerio et al., 2023), variando de 489 cópias (Bone marrow visceral leishmaniasis – BMVL 2020) a 5.019 cópias (Biópsia da lesão nodular – Biópsia 2020) em 6 ng de DNA (Figura 19). Curiosamente, a cultura do isolado LVH117, de primeira passagem e isoladas da medula óssea em 2017, amplificaram tanto para os genes de *L. infantum*, quanto para *Crithidia* sp. LVH60A, como demonstrado na figura 19. No entanto, o número de cópias para o gene catalase, utilizado na quantificação dos parasitos da espécie *Crithidia* sp. LVH60A, foi aproximadamente 482 vezes maior do que para o gene LinJ312420, empregado para a quantificação dos parasitos da espécie *L. infantum*, mostrando uma coinfeção entre estas duas espécies em 2017 (ROGERIO et al., 2023; TAKAMIYA et al., 2023).

**Figura 19.** Detecção e quantificação de parasitas baseada na reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em culturas de parasitas e amostras de tecidos do paciente BASF.



O número equivalente de parasitas foi expresso pelos equivalentes/reacção de DNA do parasita em 6 ng de DNA e representado em plano cartesiano, realizado no GraphPad Prism v9.5.0. Fonte: Adaptado de ROGERIO et al., 2023.

Já promastigotas do isolado LVH120, de terceira passagem, apresentaram amplificação apenas para o gene Catalase (Figura 19). No entanto, devido ao menor tempo de duplicação da espécie *Crithidia* sp. LVH60A em comparação com *L. infantum*, é possível que a primeira espécie tenha se sobreposto a segunda em cultura. De todo modo, não podemos afirmar se o baço apresentava infecção ocasionada pelas duas espécies.

#### 4.2.3 Sequenciamento completo de DNA genômico e montagem *de novo*

As culturas dos isolados clínicos LVH117, LVH120 policlonais e clonais foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina HiSeq 3000. No total foram obtidos 21,756 milhões de *paired-ends reads* (2 x 150 pares de base - pb), com uma média de 3,626 milhões de *reads* de rendimento por amostra. Isso proporcionou uma cobertura de sequenciamento aproximado de 32 X, com base no genoma de referência de *Crithidia* sp. LVH60A – 34,4 Mb,



variando >13,5 vezes para a amostra LVH120 a aproximadamente >42,0 vezes para o isolado LVH120 C5 (Tabela 10).

**Tabela 10.** Profundidade média de cobertura das *reads* por cromossomo dos isolados clínicos do paciente BASF.

Isolados clínicos	Espécie	Profundidade média de cobertura por cromossomo (vezes)
LVH60a C1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	34,2
LVH117	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	22,0
LVH117 C1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	19,0
LVH117 C2	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	21,9
LVH120	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	13,5
LVH120 C4	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	27,0
LVH120 C5	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	42,0
LVH161	<i>Leishmania infantum</i>	93,7
LVH161 C6	<i>Leishmania infantum</i>	50,3
LVH161a	<i>Leishmania infantum</i>	46,5

Os genomas dos isolados clínicos de 2020, LVH161, LVH161a LVH161 C6 foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina Novaseq 6000. No total foram obtidos 35,777 milhões de *paired-ends reads* (2 x 150 pb), com uma média de 8,944 milhões de *reads* por amostra. Esse sequenciamento proporcionou uma cobertura de sequenciamento de aproximadamente 81 X, variando >46,5 vezes para a amostra LVH161a a aproximadamente >93,7 vezes para o isolado LVH161 em relação ao genoma de referência *L. infantum* JPCM5 – 32,8 Mb (Tabela 10). Todas as amostras apresentaram *reads* de boa qualidade, com valores médios de qualidade de bases acima de 27.

Conforme demonstrado na tabela 11, os tamanhos dos genomas dos isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A variaram de 39,0 Mb (isolado LVH120C5) a 31,5 Mb (isolado LVH120). Estes genomas, possuíram tamanhos semelhantes à cepa referência LVH60A, que possui um tamanho predito de 34.4 Mb. Os isolados clínicos LVH161a, LVH161 e seu clone, apresentaram um tamanho de genoma estimado em 30,7 Mb, também próximo ao tamanho da cepa de referência JPCM5, de aproximadamente 32,8 Mb. Por outro lado, a cepa TCC039E (*C. fasciculata*) apresentou um tamanho estimado do genoma de 49,3 Mb, ligeiramente maior que a cepa CfCl (41,3 Mb).

Podemos observar também que isolados *Crithidia* sp. apresentaram um número superior de sequências, variando entre 7.900 a 32.220 *scaffolds* e valor de N50 menor (entre 2.766 a 15.136 pb) em comparação aos isolados de *L. infantum*. Isso possivelmente se deve

a maior profundidade de sequenciamento dos isolados LVH161, LVH161a LVH161 C6 quando comparados aos isolados LVH117, LVH120 policlonais e seus clones, o que confere maior cobertura do genoma e consequente, melhor completude. Em geral, uma cobertura mais alta tende a resultar em *scaffolds* mais longos, o que frequentemente leva a um N50 maior. A importância de um valor alto de N50 para garantir a integridade e continuidade das sequências na montagem do genoma é crucial. Um N50 elevado indica que a maioria das sequências está contida em *contigs* ou *scaffolds* mais longos, o que facilita a interpretação e análise do genoma.

Além disso, é importante considerar a presença de regiões repetitivas, variações de tamanho de repetições e heterogeneidade genômica podem dificultar a montagem, levando a um N50 menor. Esses tipos de complexidades podem ser mais comuns nos genomas de *Crithidia* sp., influenciando o valor do N50.

Em relação à porcentagem de conteúdo de GC, observamos que todos os isolados de *Crithidia* sp. apresentaram aproximadamente 56%, enquanto nos isolados de *L. infantum* essa porcentagem foi em torno de 59%. Essa diferença na composição de GC pode ser atribuída às características genômicas intrínsecas de cada espécie.

**Tabela 11.** Características gerais dos genomas dos isolados clínicos sequenciados contendo *scaffolds* maiores que 300 pares de base.

<b>Amostra</b>	<b># seqs</b>	<b>sum_len</b>	<b>min_len</b>	<b>avg_len</b>	<b>max_len</b>	<b>N50</b>	<b>GC(%)</b>
LVH117	16.991	37.688.993	300	2.218,2	209.921	9.699	56,78
LVH117C1	18.753	37.090.380	300	1.977,8	142.074	6.641	56,88
LVH117C2	16.474	37.361.244	300	2.267,9	274.050	11.020	56,82
LVH120	7.900	31.531.648	300	3.991,3	91.910	8.615	56,79
LVH120C4	16.002	38.059.380	300	2.378,4	414.712	10.600	56,81
LVH120C5	12.674	39.097.065	300	3.084,8	314.899	15.136	56,91
LVH161	2.069	30.701.999	300	14.839,1	260.331	50.158	59,32
LVH161C6	2.283	30.668.648	300	13.433,5	244.563	41.343	59,32
LVH161a	2.204	30.843.816	300	13.994,5	275.130	44.174	59,35
TCC039E	32.220	49.347.842	300	1.531,6	447.198	2.766	56,20

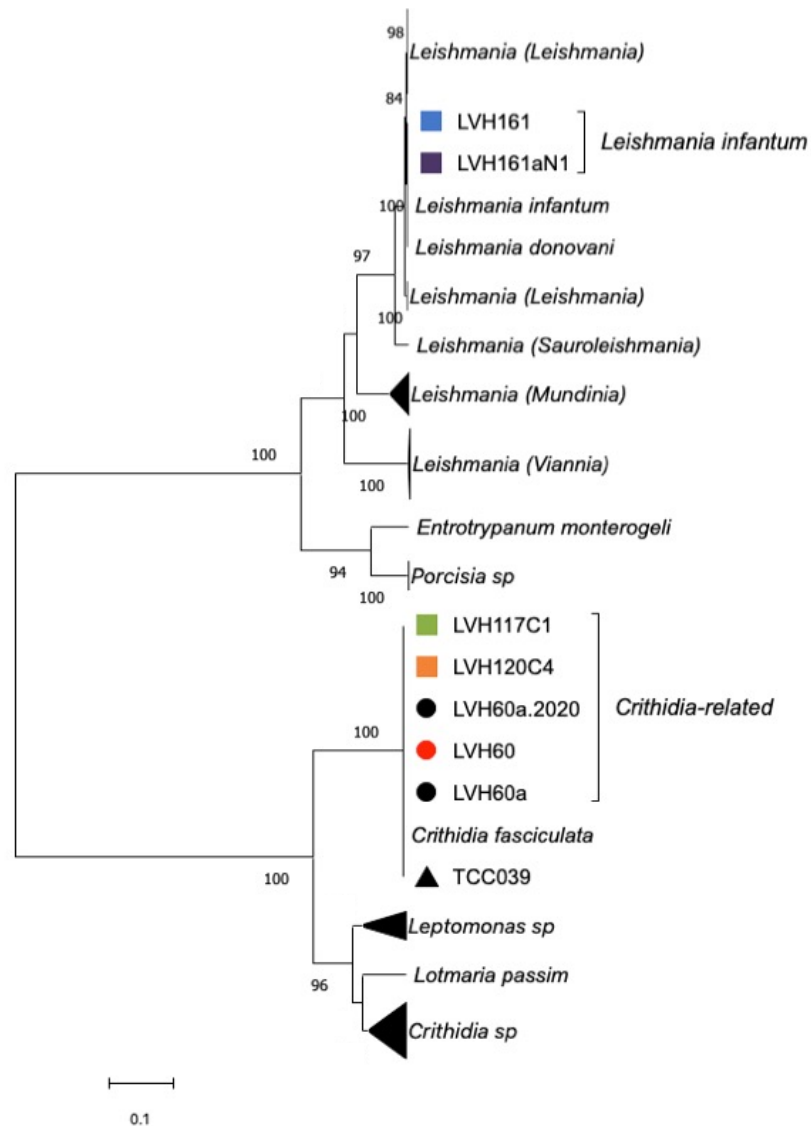
**# seqs:** Número de *scaffolds*; **Sum\_len:** Soma do tamanho dos *scaffolds* (em pares de base); **Min\_len:** Tamanho mínimo do *scaffolds* (em pares de base); **Avg\_len:** Tamanho médio dos *scaffolds* (em pares de base); **Max\_len:** Tamanho máximo do *scaffolds* (em pares de base); **N50:** Tamanho do menor *scaffold* (em pares de base) em um conjunto dos maiores *scaffolds* que representam 50% do tamanho total da montagem;

#### 4.2.4 Análise filogenômica

As relações filogenômicas entre os isolados foram avaliadas usando proteomas deduzidos de genomas, utilizando a abordagem TOMM (MARUYAMA et al., 2021). Os resultados obtidos por meio da análise filogenômica corroboram os resultados obtidos pela análise do marcador SSU rRNA, reforçando a consistência dos resultados. Os isolados

cultivados LVH117 C1 e LVH120 C4 foram agrupados com LVH60, LVH60a e *C. fasciculata*, indicando uma relação filogenética próxima entre estes isolados. Por outro lado, os isolados LVH161 e LVH161a foram colocados no mesmo cluster com *L. infantum* e *L. donovani* (Figura 20).

**Figura 20.** Análise filogenômica de proteínas ortólogas de Trypanosomatidae realizadas com o método Total Ortholog Median Matrix (TOMM).



O dendrograma mostra as relações genéticas entre todas as espécies investigadas neste estudo. Os isolados clínicos LVH117 C1 e LVH120 C4 (quadrado verde e laranja, respectivamente), bem como as cepas LVH60 e LVH60a (círculo azul e vermelho, respectivamente) sequenciadas anteriormente, são colocadas no mesmo ramo com *Crithidia fasciculata* CfCl e TCC039E (triângulo preto). No entanto, os isolados LVH161 e LVH161a (triângulo azul e roxo, respectivamente) são colocados no mesmo ramo com *L. infantum* e *L. donovani*. Os números próximos às ramificações representam as porcentagens aproximadas de probabilidades de suporte imparcial para 10.000 *bootstraps*, calculadas usando o pacote pvclust R (<https://cran.r-project.org/web/packages/pvclust/>). Fonte: Adaptado de ROGERIO et al., 2023.

#### 4.2.5 Identificação *in silico* de genes ortólogos relacionados à virulência e à interação parasita-hospedeiro

Diversas moléculas associadas à virulência e à interação parasita-hospedeiro são proteínas (DA FONSECA PIRES et al., 2014). Algumas destas proteínas foram prospectadas na montagem do genoma da cepa de referência *Crithidia* sp. LVH60A, e os resultados encontram-se na tabela 12. Dentre os oito genes relacionados à virulência selecionados, dois genes não foram identificados, *A2 protein* e *peroxidin*.

O gene que codifica a proteína *14-3-3 protein-like protein* foi identificado em dois cromossomos de *Crithidia* sp. LVH60A, apresentando uma cobertura de alinhamento de  $\geq 99,98\%$  e identidade  $\geq 88\%$ . Além disso, o gene que codifica a proteína *heat shock protein 70* (HSP70) está presente em 2 dos 38 cromossomos, resultando no total de 3 sequências que codificam esta proteína.

**Tabela 12.** Genes relacionados à sobrevivência e virulência identificados na montagem do genoma de *Crithidia* sp. LVH60A

Gene	Número de acesso TriTrypDB	# de sequências presente no genoma de <i>Crithidia</i> sp. LVH60A	Cobertura	Identidade	E-value (a)
<i>14-3-3 protein-like protein</i>	LINF_110008400	Cromossomo 22 1 sequência	99,8%	88%	0.0
	LINF_360040400	Cromossomo 36 1 sequência	100%	89%	0.0
HSP70	LINF_280035000	Cromossomo 38 2 sequências	100%	92%	0.0
		Cromossomo 25 1 sequência	100%	92%	0.0
			81,7%	77%	0.0
<i>KMP-11 - kinetoplastid membrane protein-11</i>	LINF_350027400		100%	90%	$3^{-101}$
			100%	90%	$2^{-99}$
			100%	90%	$8^{-98}$
			99,6%	90%	$3^{-97}$
<i>Lpg2 - Lipophosphoglycan</i>	CFAC1_290060700 .1	Cromossomo 37 1 sequência	100%	98%	0.0
<i>Metalloprotease GP63</i>	LINF_100010100		47,9%	76%	$5^{-112}$
			47,8%	73%	$4^{-73}$
			47,5%	73%	$5^{-72}$
<i>Tryparedoxin peroxidase</i>	LINF_150019000	Cromossomo 33 1 sequência	100%	84%	$2^{-162}$

(a) Valor obtido através da ferramenta BLASTn local com base nas sequências de nucleotídeos de *L. infantum* ou *C. fasciculata* contra o genoma de *Crithidia* sp. LVH60A.

Foram identificadas quatro sequências que codificam a proteína KMP-11, com porcentagem de identidade de 90% no cromossomo 38. Apesar de não ter função bem esclarecida, essa proteína está envolvida na interação com a célula hospedeira e sua

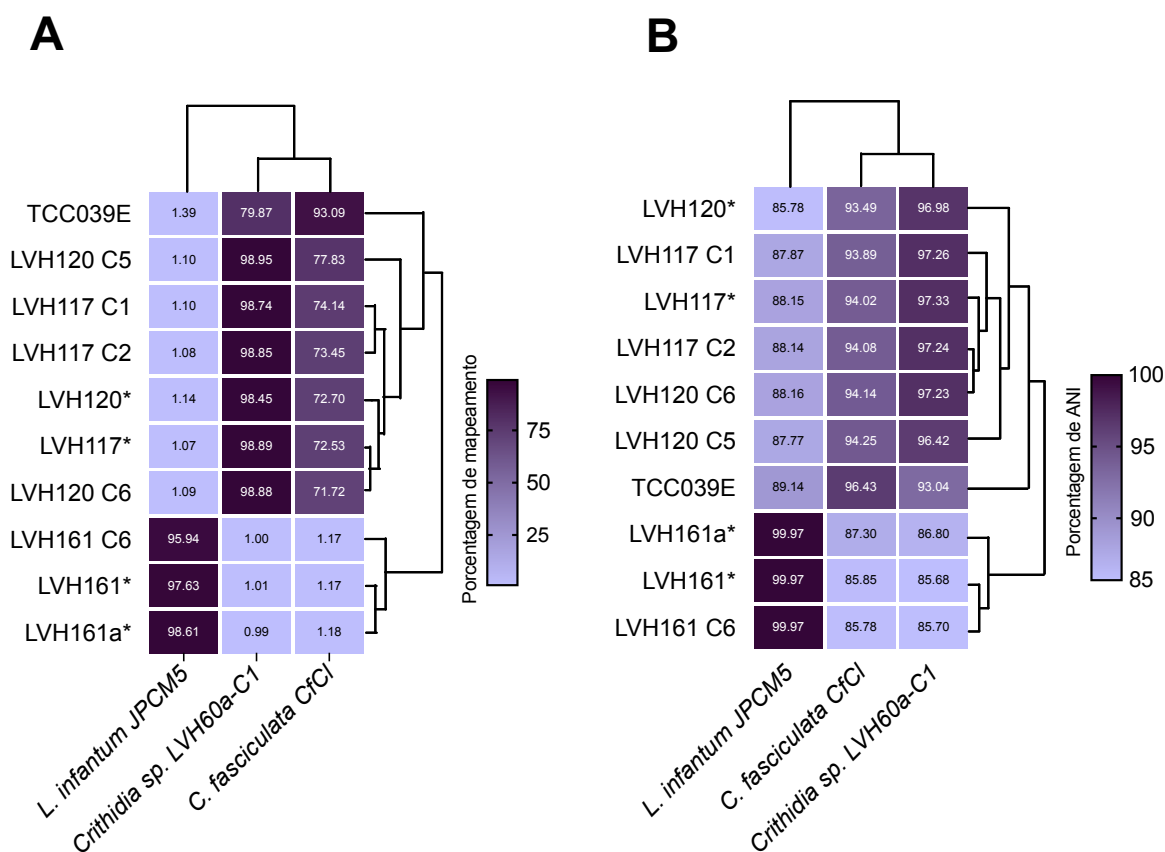
expressão é aumentada nas formas amastigotas, que foram descritas associadas ao LPG (*Lipophosphoglycan*) (JARDIM et al., 1995). Também foi identificada no genoma, uma sequência do gene *Lpg2*, apresentando uma cobertura de alinhamento de 100% e identidade 98%.

Já para o gene que codifica a proteína Metalloprotease GP63, foram identificadas três sequências no cromossomo 15 que apresentam identidade  $\geq 73\%$  e cobertura de  $\geq 47,5\%$ . Por fim, foi identificada uma sequência do gene Tryparedoxin peroxidase presente no cromossomo 33, com identidade de 84% e cobertura de 100%.

#### **4.2.6 Mapeamento no genoma e Análise da Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) entre genomas**

As *reads* sequenciadas de cada isolado clínico foram mapeadas nos genomas de referência *Leishmania infantum* JPCM5, *Crithidia fasciculata* Cf-CI e *Crithidia* sp. LVH60A usando Bowtie2. A porcentagem de mapeamento dos isolados clínicos e da cepa TCC039E (*C. fasciculata*) em relação aos genomas de referência estão representados na forma de *heatmap* (Figura 21A).

**Figura 21.** *Heatmap* mostrando a análise de mapeamento e identidade média de nucleotídeos.



(A) porcentagem de mapeamento de *reads* e, (B) porcentagem de identidade média de nucleotídeos dos isolados clínicos provenientes do paciente BASF em relação aos genomas de referência *Leishmania infantum* JPCM5, *Crithidia fasciculata* CfCl e *Crithidia* sp. LVH60A. “\*\*” representam culturas policlonais. A clusterização hierárquica dos dados de expressão foi realizada com o pacote *heatmaply* no R, utilizando a medida de Distância Euclidiana e a função de ligação média e foram representadas na forma de *heatmap*. Fonte: Adaptado de Rogério et al., 2023.

Como podemos observar, as culturas policlonais LVH117, LVH120 e seus clones exibem uma porcentagem de alinhamento superior a 98% quando comparados com o genoma de referência *Crithidia* sp. LVH60A. Esta porcentagem diminuiu consideravelmente quando estas cepas foram mapeadas no genoma de *C. fasciculata*, atingindo em média 73,72%. O mesmo padrão é observado para a cepa TCC039E, que apresentou porcentagem de mapeamento de 93,09% em relação ao genoma de *C. fasciculata* CfCl, e cerca de 79% quando alinhado ao genoma de *Crithidia* sp. LVH60A. Ademais, os isolados LVH161 e LVH161a N1 apresentaram porcentagem de mapeamento superior a 95% com o genoma de *L. infantum*, indicando claramente que estes isolados são desta mesma espécie (Figura 21A).

Neste trabalho, os valores de ANI foram obtidos através de comparação aos pares dos isolados clínicos, e diversas espécies da subfamília *Leishmaniinae* (Tabela 13). Como resultados, os valores de ANI entre os isolados clínicos de *L. infantum* (LVH161 e LVH161a) e o genoma de referência JPCM5, foram consistentemente altos, com uma média 98,52%. De

forma similar, a ANI entre TCC039E e *C. fasciculata* CfCI foi a 96,43%. Ademais, ao comparar os isolados clínicos LVH117, LVH120 e seus clones com a cepa de referência LVH60a-C1, a porcentagem média de ANI foi de 97,08%. No entanto, esta porcentagem diminuiu consideravelmente quando estes mesmos isolados clínicos foram comparados com cepas de *C. fasciculata* (TCC039E e CfCI) e os isolados de *L. infantum* (LVH161, LVH161a e JPCM5), chegando a uma média de 93,98% e 87,61%, respectivamente (Tabela 13 e Figura 21 B).

Para fins de comparação, também foi realizada a busca na literatura, assim como a análise dos valores de ANI de diferentes espécies de *Leishmania* e *Crithidia*. Conforme pode se observar na tabela 13, os valores de ANI para diferentes espécies de *Leishmania* dentro do mesmo complexo podem variar de 96,50% (*Leishmania major*, *L. turanica*, *L. arabica* e *L. gerbilli*) a 99,42% (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. archibaldi*) (FERNÁNDEZ-ARÉVALO et al., 2020). A porcentagem de ANI entre espécies causadoras de leishmaniose cutânea do Velho Mundo em comparação com o Novo Mundo foi de 85,63%, enquanto o ANI entre *L. infantum* e espécies causadoras de leishmaniose cutânea variou de 85,69% a 90,29% (Tabela 13). Em relação aos valores de ANI de *L. infantum* JPCM5 versus *Crithidia* sp. foi em média 87,71%, um resultado semelhante ao obtido quando comparamos as espécies *C. fasciculata* e *C. mellificae* - 85,88% (Tabela 13).

**Tabela 12.** Comparação da identidade média de nucleotídeos (ANI) entre genomas de espécies de *Leishmaniinae*

Espécies	ANI (%)	Referência	Algoritmo
<i>L. infantum</i> (n=4) vs <i>L. donovani</i> (n=8)	99,42 ± 0,56	Fernández-Arévalo et al., 2020	MUMmer/JSpeciesWS
<i>L. tropica</i> (n=3) vs <i>L. aethioplastica</i> (n=2)	97,55 ± 1,62	Fernández-Arévalo et al., 2020	MUMmer/JSpeciesWS
<i>L. major</i> complex *	96,50 ± 3,015	Fernández-Arévalo et al., 2020	MUMmer/JSpeciesWS
<i>L. major</i> vs <i>L. infantum</i>	94,00	Peacock et al., 2007	ND
<i>L. major</i> vs <i>L. braziliensis</i>	81,00	Peacock et al., 2007	ND
<i>L. infantum</i> vs <i>L. braziliensis</i>	81,00	Peacock et al., 2007	ND
<i>L. major</i> Friedlin vs <i>L. infantum</i> JPCM5	90,29	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/JSpeciesWS
<i>L. major</i> Friedlin vs <i>L. braziliensis</i> M2903	85,63	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/JSpeciesWS
<i>L. infantum</i> JPCM5 vs <i>L. braziliensis</i> M2903	85,69	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/JSpeciesWS
<i>L. infantum</i> JPCM5 vs <i>L. donovani</i> BPK282A1	99,14	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/JSpeciesWS
<i>L. infantum</i> JPCM5 vs <i>L. infantum</i> C.I. 2020 (n=3)	98,52 ± 0,15	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
<i>L. infantum</i> JPCM5 vs <i>C. fasciculata</i> (n=2)	87,81 ± 1,89	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
<i>L. infantum</i> JPCM5 vs <i>Crithidia</i> -like C.I. (n=7)	87,61 ± 0,85	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
<i>C. fasciculata</i> CfCl vs <i>C. mellificae</i>	85,88	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
<i>C. fasciculata</i> CfCl vs TCC039E	96,43	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
<i>C. fasciculata</i> CfCl vs LVH60a C1	93,22	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
<i>C. fasciculata</i> CfCl vs LVH60a C1	94,43	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/JSpeciesWS
<i>C. fasciculata</i> CfCl vs LVH60a C1	94,09	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	ANI Calculator
<i>C. fasciculata</i> CfCl vs <i>Crithidia</i> -like C.I. (n=6)	93,98 ± 0,27	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
LVH60a C1 vs TCC039E	93,04	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer
LVH60a C1 vs <i>Crithidia</i> -like C.I. (n=6)	97,08 ± 0,34	Este estudo (Rogerio et al., 2021)	MUMmer/Nucmer

ND – Não disponível; Fonte: Adaptado de Rogerio et al., 2023.

*Leishmania* sp.

*Crithidia* sp.



#### 4.2.7 Identificação de aneuploidias por meio de determinação de somia cromossômica

As estimativas de somia dos genomas dos isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A e *L. infantum* foram realizados utilizando os genomas de referências LVH60A e JPCM5, respectivamente, e o número de cópias dos cromossomos foram inferidos através da profundidade de mapeamento das *reads* por cromossomos.

De acordo com a análise, os isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A, LVH117 e LVH120 (policlonais e clones) exibiram perfis de somia semelhantes à cepa de referência LVH60a C1. Os cromossomos 12, 13 e 32 foram identificados como trissômicos, enquanto o cromossomo 35 foi considerado tetrassômico, com exceção da cepa LVH60a C1, que apresentou duas cópias para o cromossomo 13 (Figura 22).

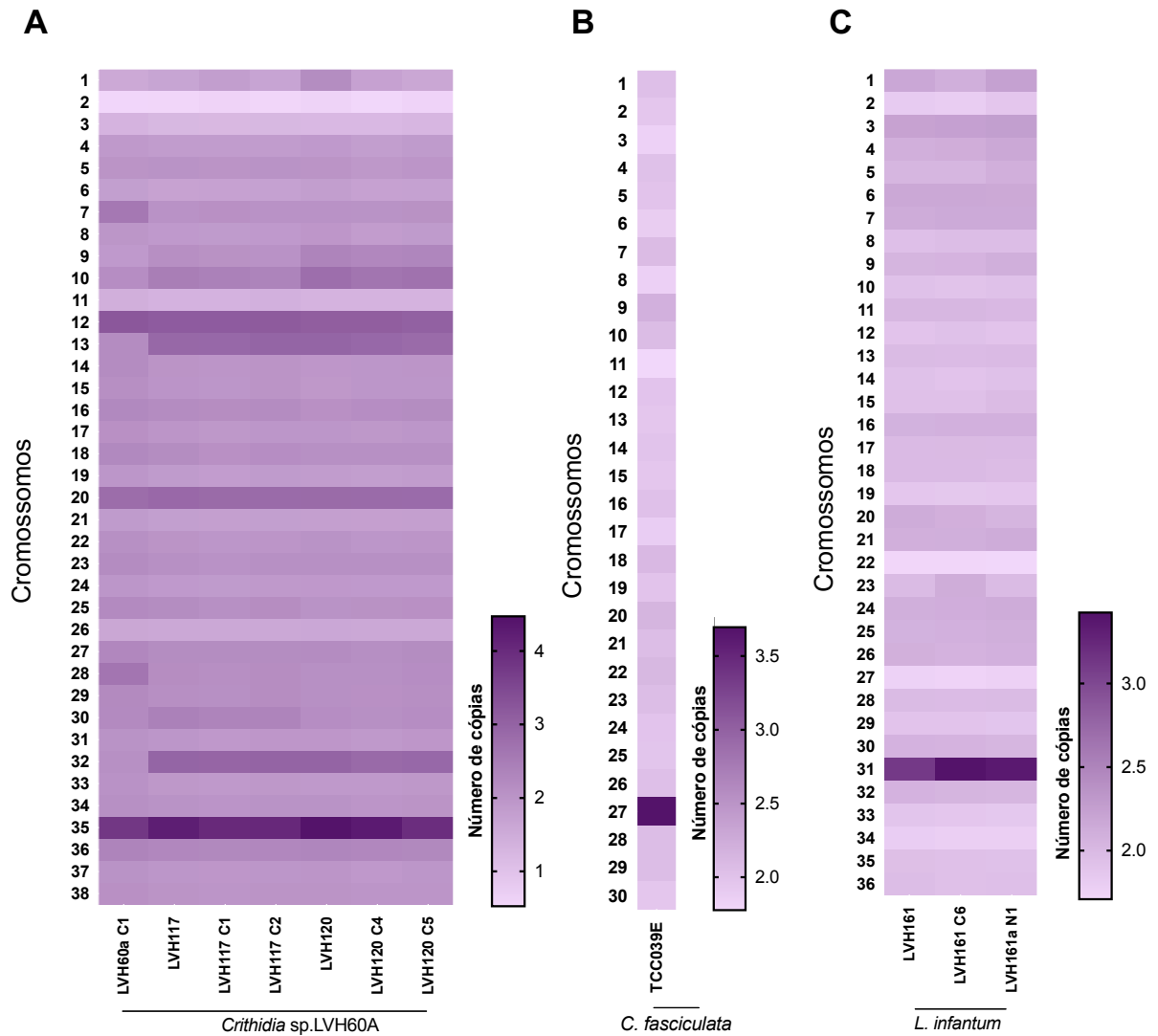
Em relação a *C. fasciculata* TCC039E, os cromossomos 8, 1 e 25, sintênicos aos cromossomos 12, 13 e 32 de *Crithidia* sp. LVH60A respectivamente (Figura 23), foram identificados como diploides. Por outro lado, o cromossomo 27, sintênico ao cromossomo 35 de *Crithidia* sp. LVH60A (Figura 22), foi classificado como triploide. Isso indica que os isolados de *Crithidia* sp. LVH60A possuem uma cópia adicional para cada um desses cromossomos em comparação com *C. fasciculata* TCC039E.

No que diz respeito ao cromossomo 8 de *C. fasciculata*, ele codifica 151 proteínas, incluindo 6 proteínas quinases, 5 acetylornithine deacetylase e 4 Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain. O cromossomo 1 de *C. fasciculata*, codifica 116 proteínas, algumas das quais estão associadas a resistência de antimoniato em *L. donovani*, como *ABC transporter* e *ornithine decarboxylase* (MUKHERJEE et al., 2007).

Já o cromossomo 25 de *C. fasciculata* codifica 438 proteínas, incluindo 2 amastina, 2 proteínas do fator de alongação 2 e 7 proteínas fructose-1,6-bisphosphate aldolase. Por fim, o cromossomo 27 de *C. fasciculata* codifica 474 proteínas, das quais 15 são proteínas quinases, 5 proteínas GP63, 3 proteínas *tryparedoxin*. Essas informações destacam diferenças significativas no número de cópias de genes relacionados à resistência a fármacos, fatores de virulência e a outras funções celulares.

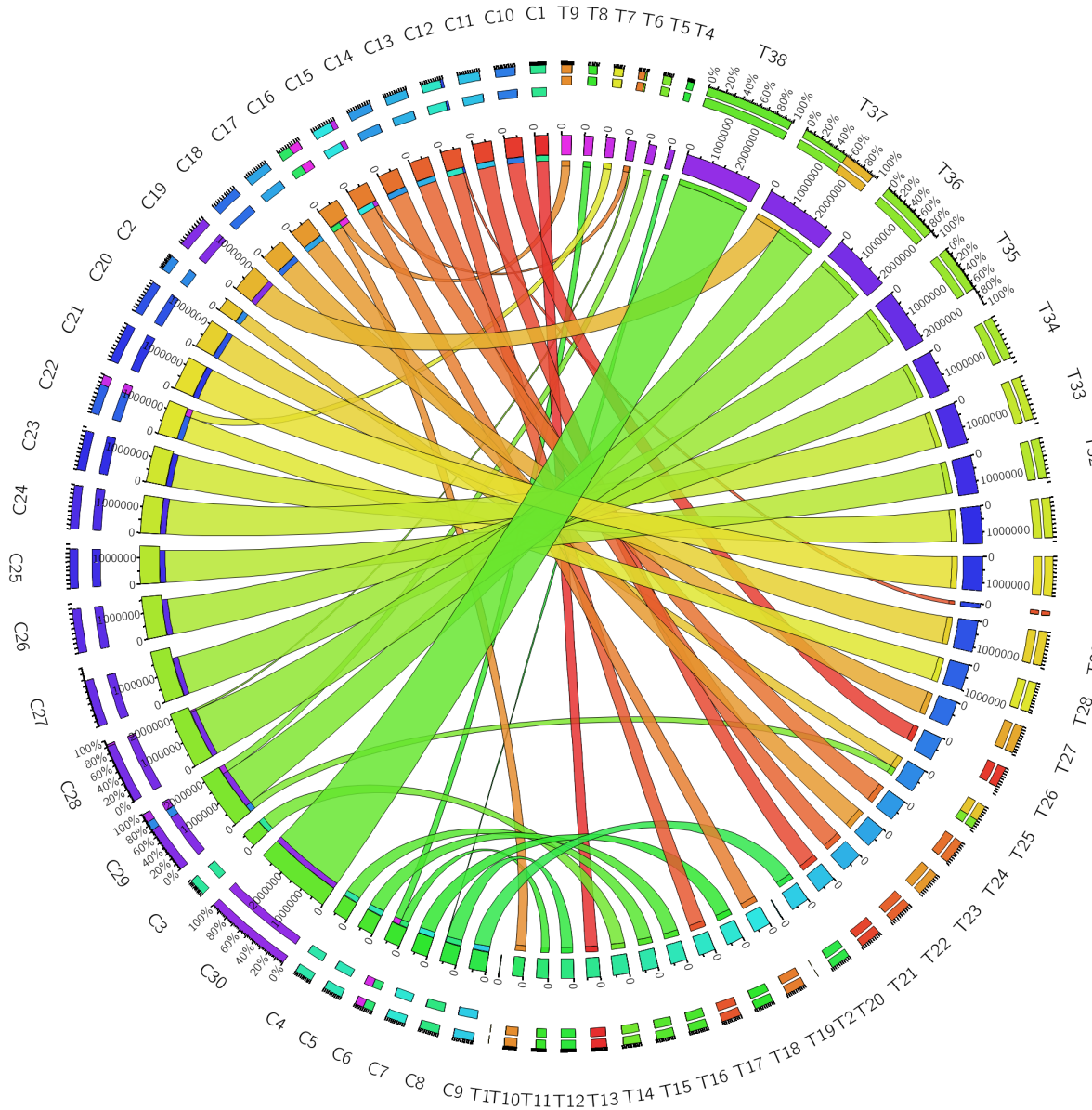
Quanto aos isolados LVH161, LVH161 C6 e LVH161a N1, estes também apresentaram perfis semelhantes de ploidia e a maioria dos cromossomos foram considerados diploides. No entanto, o cromossomo 31 de todas as cepas, foi observado em nível superior, sendo considerado trissômico (Figura 22), como observado anteriormente para outras espécies de *Leishmania* (COTTON et al., 2020; ROGERS et al., 2011) e cepas de *L. infantum* (TEIXEIRA et al., 2017).

**Figura 22.** Estimativa do número de cópias cromossômicas (somia) dos isolados clínicos obtidos do paciente BASF.



O *heatmap* representa a dinâmica do cariótipo dos isolados clínicos de (A) *Crithidia sp. LVH60A* (LVH117 e LVH120 policlonais e clones), *C. fasciculata* (TCC039E) e (C) *L. infantum* (LVH 161 e LVH161a N1 policlonais e clone) obtidos através da normalização dos dados de profundidade de mapeamento das *reads* por cromossomo.

**Figura 23.** Sintenia entre os genomas de *Crithidia* sp. LVH60A e *Crithidia fasciculata*.



*Circos plot* representando a sintenia entre os 30 cromossomos de *Crithidia fasciculata* (identificados pela inicial "C", C1 a C30) e os cromossomos de *Crithidia* sp. LVH60A (identificados pela inicial "T", T1 a T38). O alinhamento das sequências de nucleotídeos dos cromossomos foi realizado utilizando o programa NUCmer (NUCleotide MUMmer) e o arquivo gerado foi utilizado para criar uma matriz contendo o tamanho de cada cromossomo de sua respectiva espécie e o tamanho em pares de bases que estes cromossomos se alinham. Esta matriz foi utilizada como arquivo de entrada para a criação deste *Circos plot* utilizando a ferramenta online disponível em: <http://www.circos.ca>. As faixas de diferentes cores dispostas no eixo central conectam as regiões homólogas entre os cromossomos das duas espécies, representando graficamente a sintenia. A espessura da faixa está diretamente relacionada ao tamanho do cromossomo e a proporção da região sintênica (cobertura do cromossomo). Por exemplo: o cromossomo 30 de *C. fasciculata* (C30) é completamente sintênico ao cromossomo 38 (T38) de *Crithidia* sp. LVH60A, já o cromossomo 37 (T37) de *Crithidia* sp. LVH60A apresenta uma porção menor que é completamente sintênica ao cromossomo 19 (C19) e uma porção maior que é sintênica a uma grande porção do cromossomo 29 (C29) de *C. fasciculata*.

#### 4.2.8 Anotação dos genomas, detecção e anotação de variantes

Os cromossomos de *Crithidia* sp. LVH60A previamente montados foram utilizados para a realização da anotação através do servidor *web Companion*. O tamanho do genoma, quantidade de cromossomos, número de genes foram comparados com as sequências de *C. fasciculata* Cf-Cf já descritas e disponíveis no banco de dados *TriTrypdb* e se encontram disponíveis na tabela 14.

**Tabela 14.** Características gerais dos genomas de cepas de *Crithidia*.

	<i>C.fasciculata</i> Cf-Cf	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A
Tamanho do genoma (Mb)	32,63	34,0
Conteúdo GC (%)	57	57,23
Cromossomos	30	38
Genes codificadores	9.055	9.368
Pseudogenes	434	824
ncRNA	130	250

A análise entre espécies de *Crithidia* mostrou uma diferença de 1,37 Mb entre os genomas, refletindo em um aumento no número de genes, pseudogenes e ncRNAs na espécie *Crithidia* sp. LVH60A. Uma análise mais profunda de identificação da variação do número de cópias entre os genes compartilhados e genes exclusivos entre as duas espécies fornecerão *insights* importantes na evolução do parasitismo em Trypanosomatidae.

As análises genômicas de detecção de variantes entre os isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A e entre os isolados de *L. infantum* obtidos do paciente BASF geraram em média um total de 385.066 e 66.884 variantes, dos quais 272.569 (70,8%) e 53.931 (80,64%) correspondem a variantes de nucleotídeo único (SNP), respectivamente (Figura 24; Tabela 15). Os demais tipos de variantes encontram-se detalhadas na tabela 15.

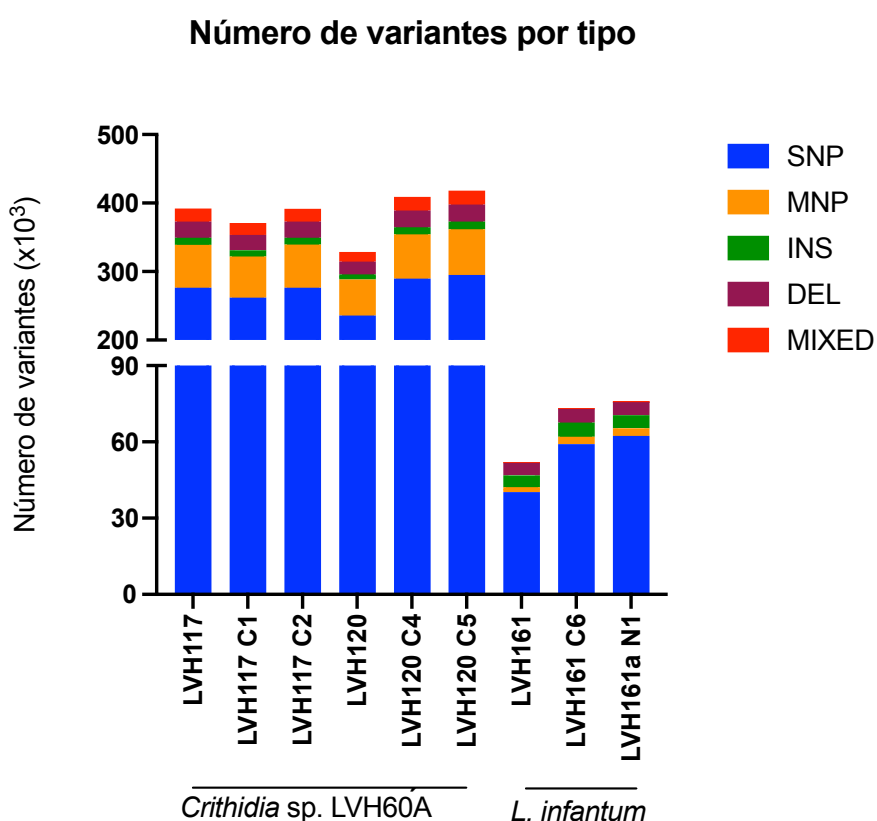
**Tabela 15.** Número de variantes por tipo dos isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A e *Leishmania infantum*.

Isolado	Espécie	SNP	MNP	INS	DEL	MIXED
LVH117	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	276301	62791	10230	23565	19002
LVH117 C1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	261788	60085	9348	22283	17467
LVH117 C2	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	276647	62609	10092	23557	18735
LVH120	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	235792	52772	7301	18811	13910
LVH120 C4	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	289739	64419	10740	24373	19743
LVH120 C5	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	295151	66498	11185	24922	20542

LVH161	<i>L. infantum</i>	40275	1835	4752	4926	62
LVH161 C6	<i>L. infantum</i>	59125	2941	5518	5369	107
LVH161a N1	<i>L. infantum</i>	62394	3005	5116	5115	85
Porcentagem isolados 2017	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	70,8%	16,0%	2,5%	6,0%	4,7%
Porcentagem isolados 2020	<i>L. infantum</i>	80,6%	3,9%	7,7%	7,7%	0,1%

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; MNP: Polimorfismo de múltiplos nucleotídeos; INS: Inserções; DEL: Deleções; MIXED: Múltiplas inserções e deleções de nucleotídeos.

**Figura 24.** Número de variantes por tipo nos genomas de isolados clínicos de *Crithidia* sp LVH60A e *L. infantum*.

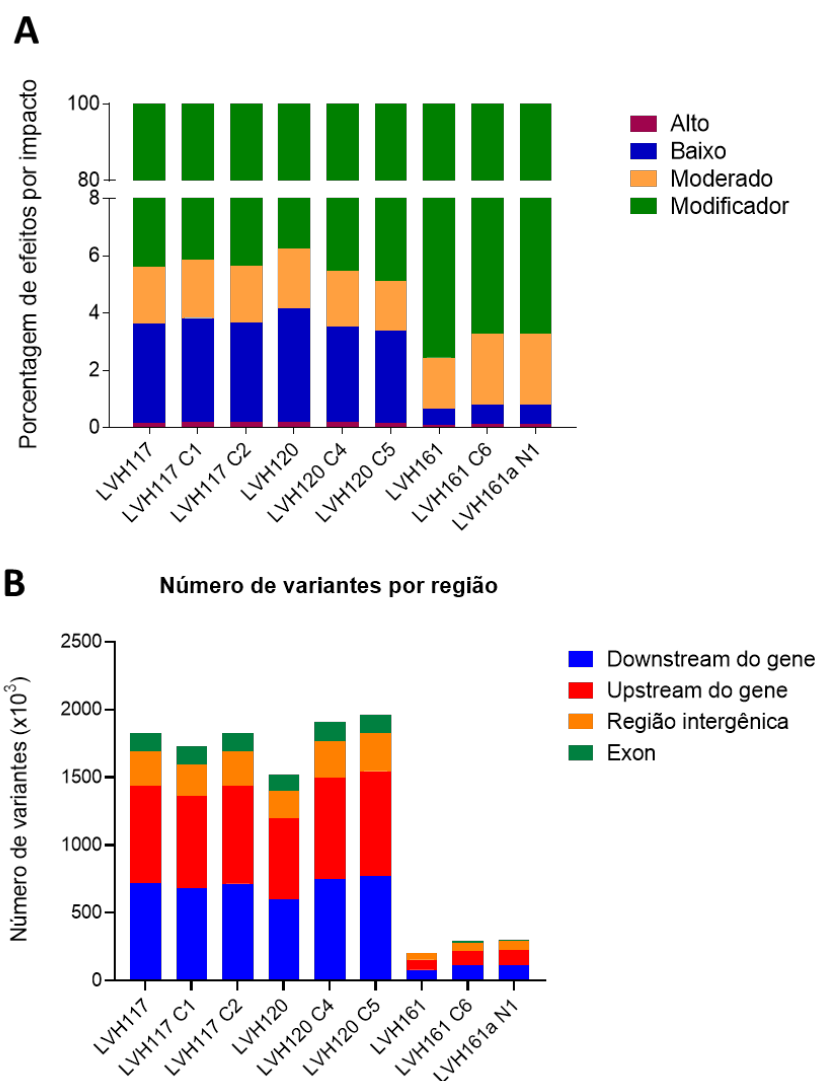


As amostras “LVH” correspondem a isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A e *Leishmania infantum* obtidas do paciente BASF nos anos de 2017 e 2020 respectivamente. SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; MNP: Polimorfismo de múltiplos nucleotídeos; INS: Inserções; DEL: Deleções; MIXED: Múltiplas inserções e deleções de nucleotídeos.

As variantes encontradas nos genomas foram categorizadas de acordo com seu impacto. As categorias de impacto são classificadas em: alto (variante disruptiva, por exemplo: truncamento da proteína, perda de função, entre outros), moderado (variante não disruptiva que pode alterar a eficiência da proteína), baixo (variante que não causa a mudança de função da proteína) e modificador (variantes que afetam genes não codificadores de proteínas) (CINGOLANI et al., 2012). A porcentagem de variações modificadoras foi significativamente maior do que aquelas com impacto alto, baixo e moderado, sendo o isolado LVH161 com

maior porcentagem (97,558%). O isolado LVH120 teve a maior porcentagem de variações de alto e baixo impacto (0,198% e 3,973%, respectivamente), enquanto o isolado LVH161a N1 obteve a maior porcentagem de variações de impactos moderados (2,469%) (Figura 25A).

**Figura 25.** Análise da Distribuição de Variantes Genômicas nos genomas de isolados clínicos de *Crithidia sp* LVH60A e *L. infantum* por Impacto e Região.



(A) Distribuição percentual das variantes de acordo com seu impacto nos genes, classificadas como alto, baixo, moderado e modificador. Uma variante com alto impacto indica uma alteração significativa na proteína, causada por um truncamento ou perda de função (por exemplo *stop gain* e *frameshift*). Variante de baixo impacto não altera o comportamento das proteínas (mutação sinônima). A variante de impacto moderado é classificado por uma mutação não disruptiva que pode alterar a eficácia da proteína (mutação *missense* e deleção *in frame*). Por fim, variante de impacto modificador são aquelas que afetam genes não codificantes; (B) Distribuição das variantes de acordo com as regiões do genoma.

As variações de nucleotídeos também foram avaliadas de acordo com a localização no genoma. Observou-se que a maioria das mutações estava situada nas regiões *downstream* e *upstream* dos genes, seguidas pelas regiões intergênicas. Notavelmente, os isolados

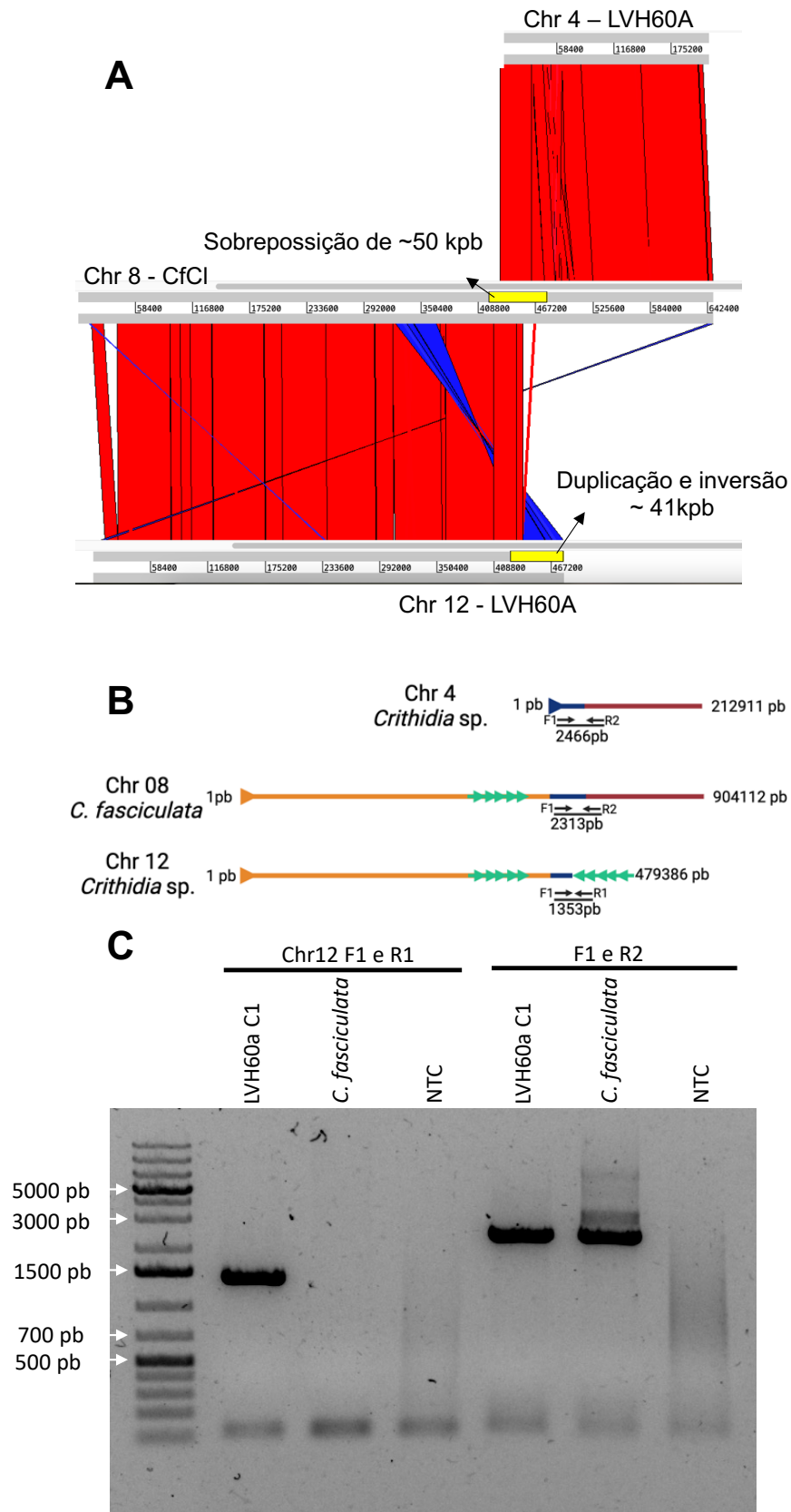
LVH161, LVH161 C6 e LVH161a N1, se destacaram por apresentar menos variantes que os demais isolados *Crithidia* sp. LVH60A (Figura 25B).

#### **4.2.9 Validação da montagem de *Crithidia* sp. LVH60A**

A análise do alinhamento entre os genomas e a verificação de sintenia entre *C. fasciculata* CfCl e *Crithidia* sp. LVH60A foram previamente conduzidas por Takahasi, 2020. Os resultados que demonstram a sintenia entre os genomas pode ser observado na tabela 1 e na figura 22.

Foi possível identificar diversos rearranjos cromossômicos de *Crithidia* sp. LVH60A em comparação com *C. fasciculata* CfCl. Uma observação em relação às variações na estrutura cromossômica é a divisão do cromossomo 8 de *C. fasciculata*, que resultou em dois cromossomos em LVH60A (Figura 22, Tabela 1). Como podemos observar na figura 26, há uma sobreposição de 50 mil pares de bases entre os cromossomos 4 e 12 de *Crithidia* sp. LVH60A, o que infelizmente impossibilita a validação por meio de PCR. Além disso, é possível identificar a duplicação e inversão de uma região de *C. fasciculata* no final do cromossomo 12 de LVH60A (Figura 26A).

**Figura 26.** Alinhamento entre cromossomos das duas espécies de *Crithidia* mostra a sintonia dos cromossomos 4 e 12 de *Crithidia* sp. LVH60A ao cromossomo 8 de *C. fasciculata* CfCI.





(A) Alinhamento entre os cromossomos usando o *software Artemis Comparison Tool (ACT)*; (B) Regiões alvo dos *primers* empregados para validação da duplicação e inversão da região destacada com setas verdes. Cor azul presente na representação dos cromossomos 4 e 12 de *Crithidia* sp. LVH60A representam a sobreposição de 50 mil pares de base entre eles; (C) Gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* desenhados em B, confirmando a inversão e duplicação da região do cromossomo 8 de *C. fasciculata* em *Crithidia* sp. LVH60A (realizado com *primers* F1 e R1) e o controle da reação (realizado com *primers* F1 e R2).

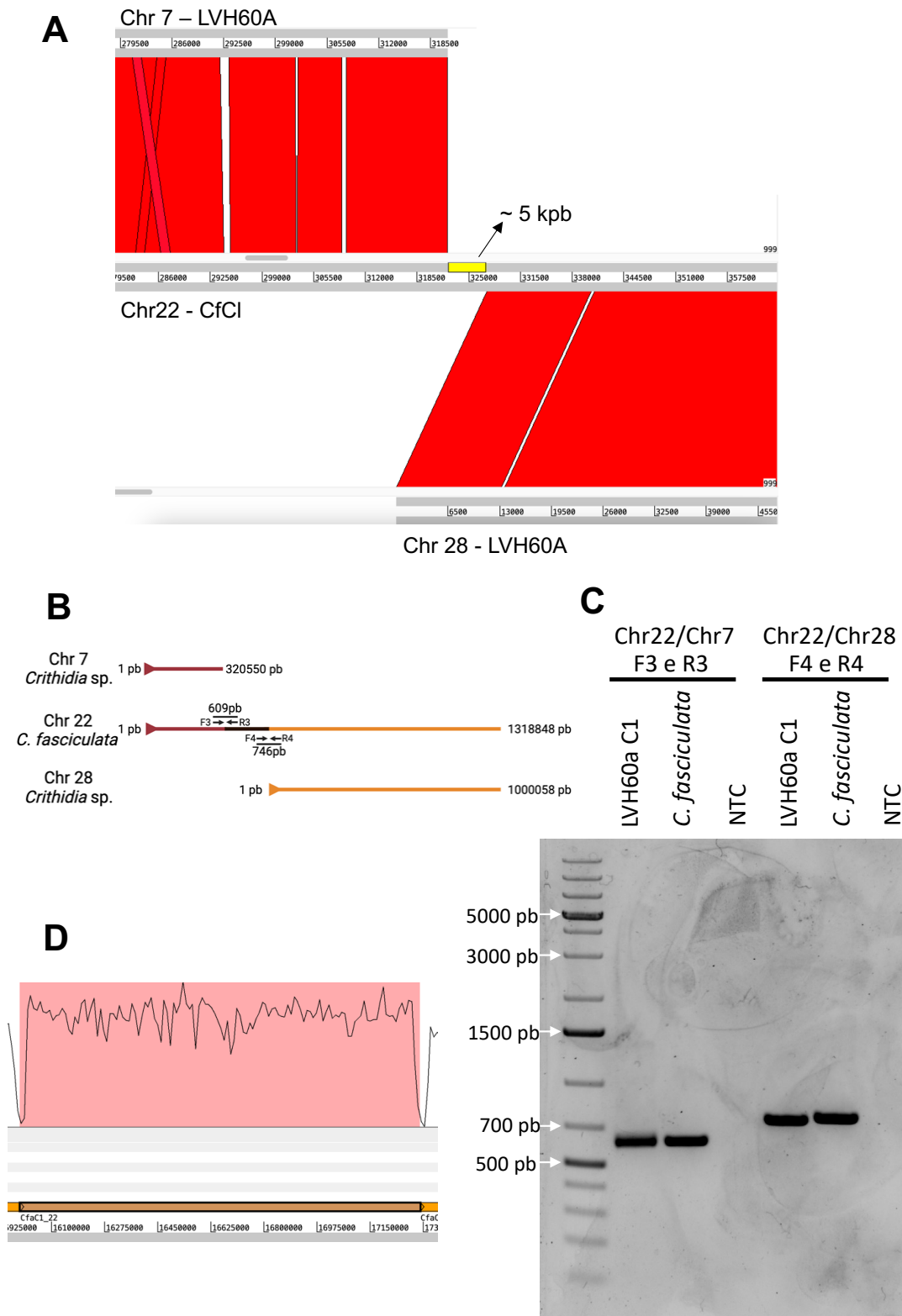
Para confirmar a existência desta duplicação e inversão, foram projetados *primers* que abrangem a região antes e depois do local de início da região de inversão e duplicação (Figura 26B). Como controle positivo, empregamos o mesmo *primer* forward e desenhamos o *primer* reverse com base no cromossomo 8 de *C. fasciculata* e no cromossomo 4 de *Crithidia* sp. LVH60A (Figura 26B).

Como podemos observar na imagem do gel de agarose (Figura 26C), a inversão e duplicação foi confirmada, pois obtivemos a presença do produto de PCR esperado de 1353 pares de base e o sequenciamento do *amplicon* mostrou 97% de identidade com a sequência alvo. O controle positivo para os cromossomos 4 e 8 também resultou na amplificação com tamanho de banda esperado. Esta região de duplicação e inversão engloba sete genes que codificam as seguintes proteínas: 2 *P-type ATPase*, 2 proteínas hipotéticas; *Calcineurin-like phosphoesterase*, *Qa-SNARE protein* e *105 ribossomal protein S4*.

Outra observação relevante foi a montagem dos cromossomos 7 e 28, que corresponde ao cromossomo 22 de *C. fasciculata*. O alinhamento dessas 3 sequências produziu uma lacuna de aproximadamente 5 mil pares de bases (Figura 27A). Foi verificada a existência desta sequência através de *Blast* contra o genoma de *Crithidia* sp. LVH60A e não foi observada correspondência desta sequência no genoma. Diante disto, foi realizado o desenho de *primers* para abranger os pontos de quebra dos cromossomos 7 e 8 (Figura 27B).

Foi observado no gel de agarose ampliações de ambos os *primers* nas duas espécies testadas (Figura 27C). Além disso, foi verificado também o mapeamento das *reads* de *Crithidia* sp. LVH60A no genoma de *C. fasciculata*, e como esperado, as *reads* foram uniformemente distribuídas por todo o cromossomo 22 (Figura 27D). Diante destas evidências, é possível que os cromossomos 7 (320 Kb) e 28 (1000 Kb) de *Crithidia* sp. LVH60A sejam partes de um mesmo cromossomo de 1320 Kb, indicando que os programas de montagem genômica não obtiveram êxito no agrupamento dos cromossomos 7 e 28 em um único cromossomo.

**Figura 27.** Alinhamento entre cromossomos de duas espécies de *Crithidia* mostra a sintonia dos cromossomos 7 e 28 de *Crithidia* sp. LVH60A ao cromossomo 22 de *C. fasciculata* CfCl.



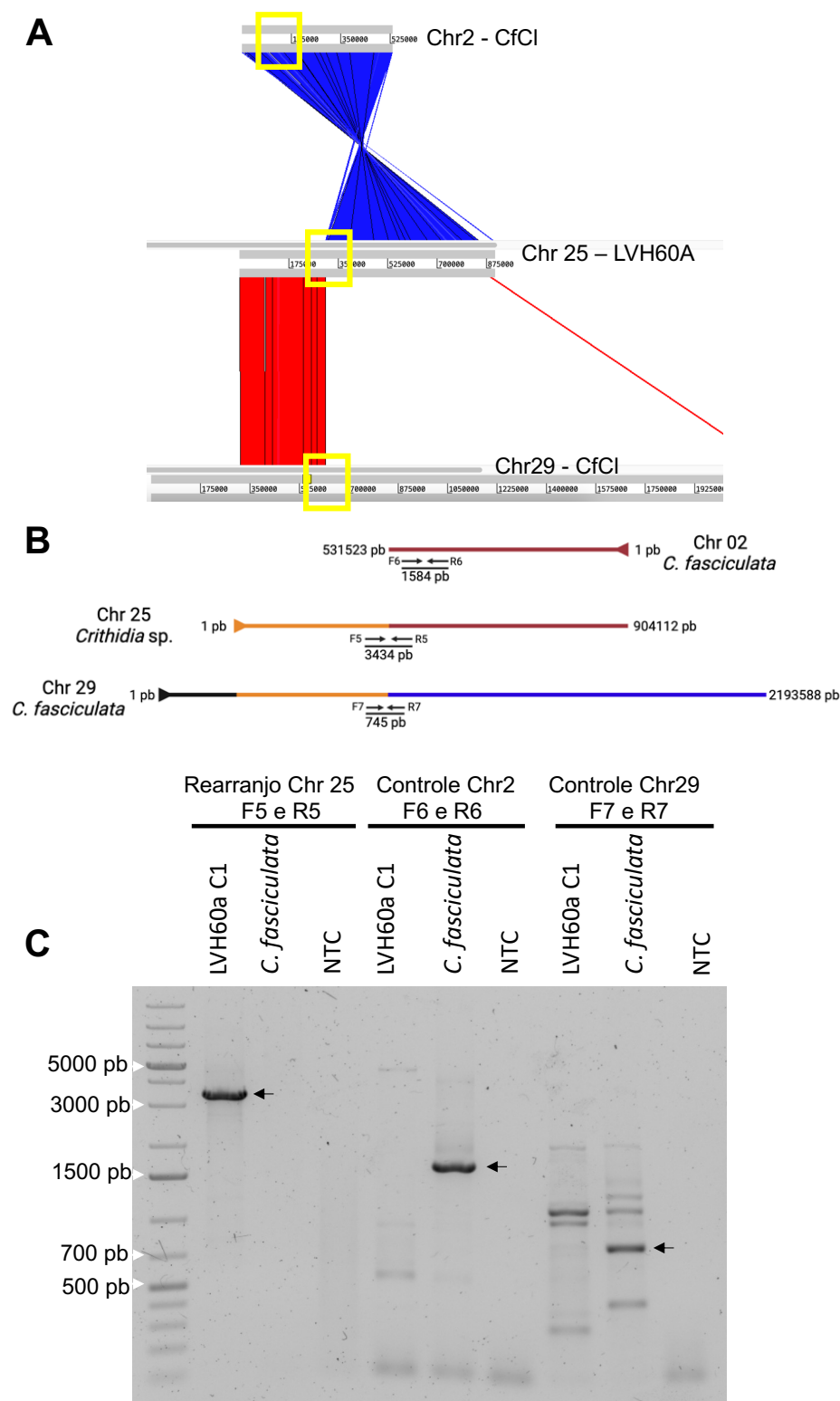
(A) Alinhamento entre os cromossomos usando o software *Artemis Comparison Tool* (ACT); (B) Regiões alvo dos *primers* empregados para validação da divisão do cromossomo 22 de *C. fasciculata* resultando em dois cromossomos em *Crithidia* sp. LVH60A; (C) Gel de agarose dos produtos de PCR realizado com os primers desenhado em B, mostrando que os cromossomos 7 e 28 de *Crithidia*

sp. LVH60A não são resultantes de uma quebra e representam um único cromossomo; (D) Mapeamento das *reads* de *Crithidia* sp. LVH60A no cromossomo 22 de *C. fasciculata*.

Outra observação foi o rearranjo do cromossomo 25 de *Crithidia* sp. LVH60A, o qual compreende o cromossomo 2 em inversão (531 Kb) e uma porção do cromossomo 29 (2193 Kb) de *C. fasciculata* (Figura 28A). Para confirmar este rearranjo, foram desenhados *primers* direcionados à região de junção dos cromossomos 2 e 29 em *Crithidia* sp. LVH60A. Adicionalmente, foram desenhados *primers* para amplificar as sequências dos cromossomos 29 e 2 de *C. fasciculata* para serem usados como controles de amplificação, conforme ilustrado na figura 28B.

Como podemos observar na figura 28C, apenas a amostra LVH60a C1 apresentou amplificação quando usado o primer do cromossomo 25, evidenciando o rearranjo juncional. O controle do cromossomo 2 de *C. fasciculata* também foi amplificado apenas para a amostra da espécie correspondente, confirmando que o segmento sintênico está invertido e duplicado no cromossomo 25 de *Crithidia* sp. LVH60A. No entanto, em relação ao controle de amplificação do cromossomo 29 de *C. fasciculata*, foi possível observar várias bandas de amplificação para ambas as amostras, indicando a necessidade de desenhar novos primers para amplificar esta região. O *amplicon* referente ao cromossomo 25 de *Crithidia* sp. LVH60A foi confirmado através da digestão utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*, como pode ser observado na figura 29.

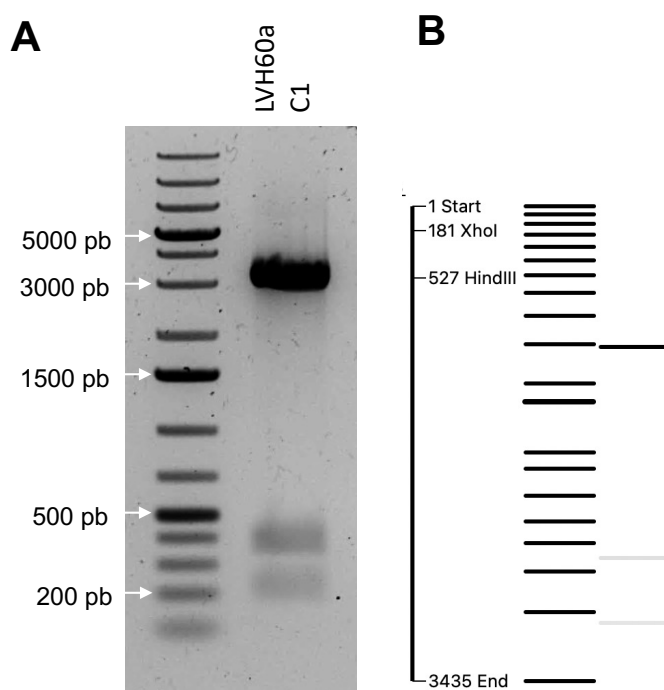
**Figura 28.** Alinhamento entre cromossomos de duas espécies de *Crithidia* mostra a sintonia do cromossomo 25 de *Crithidia* sp. LVH60A ao cromossomo 2 e parte do cromossomo 29 de *C. fasciculata* CfCl.



(A) Alinhamento entre os cromossomos usando o software *Artemis Comparison Tool* (ACT) – As caixas amarelas indicam as regiões onde os *primers* foram desenhados; (B) Regiões alvo dos *primers* empregados para validação do rearranjo cromossômico. Cor azul presente na representação do cromossomo 29 de *C. fasciculata* representa a sintonia com outro cromossomo *Crithidia* sp. LVH60A; (C) Gel de agarose dos produtos de PCR realizado com os *primers* desenhados em B,

mostrando o rearranjo cromossômico em *Crithidia* sp. LVH60A (união do cromossomo 2 com uma parte do cromossomo 29 de *C. fasciculata*).

**Figura 29.** Confirmação do *amplicon* referente a região do rearranjo do cromossomo 25 (junção de dois cromossomos) de *Crithidia* sp. LVH60A.



(A) Gel de agarose mostrando o ensaio de digestão *in vitro* do amplicon da região do rearranjo do cromossomo 25 usado as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*; (B) Fragmentos esperados da digestão *in silico* do amplicon de acordo com o software ApE.

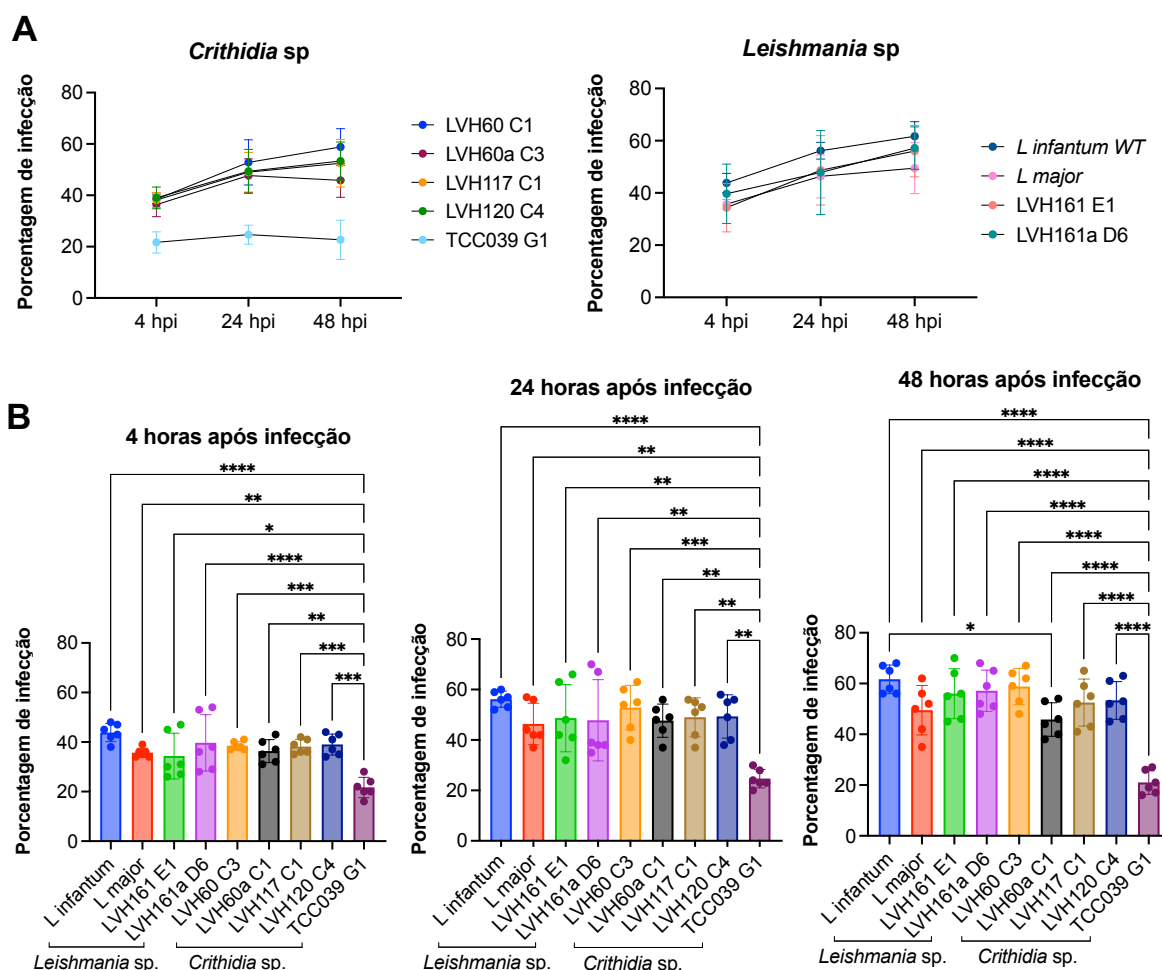
#### 4.2.10 Dual RNA-seq

Para obtenção do *dual* transcriptoma de células infectadas por diferentes cepas de parasitas da subfamília Leishmaniinae, macrófagos diferenciados da linhagem celular U937 foram infectados com isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A, bem como isolados clínicos de *L. infantum*, com MOI de 10:1. Foram utilizadas cepas de *L. infantum* e *L. major* como controles positivos de infecção, enquanto a cepa *C. fasciculata* TCC039E foi empregada como controle negativo. As análises incluíram a avaliação da porcentagem de infecção, o número médio de amastigotas intracelulares por célula infectada e o índice de infecção, determinados em 4, 24 e 48 hpi.

Podemos observar que os isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A foram capazes de infectar uma maior porcentagem de macrófagos em todos os tempos de infecção, em comparação com a cepa TCC039E (Figura 30). A porcentagem de células infectadas após 4 horas aumentou de aproximadamente 38% para 49% e manteve-se em crescimento ou permaneceu estável até 48 horas pós-infecção a depender da cepa de *Crithidia* sp. LVH60A utilizada, obtendo em média 52% de células infectadas, apresentando um perfil semelhante ao dos macrófagos infectados com parasitas *Leishmania* sp. Por outro lado, na cepa

TCC039E, a porcentagem de células infectadas diminuiu de 25% para 21% após 24 horas (Figura 30).

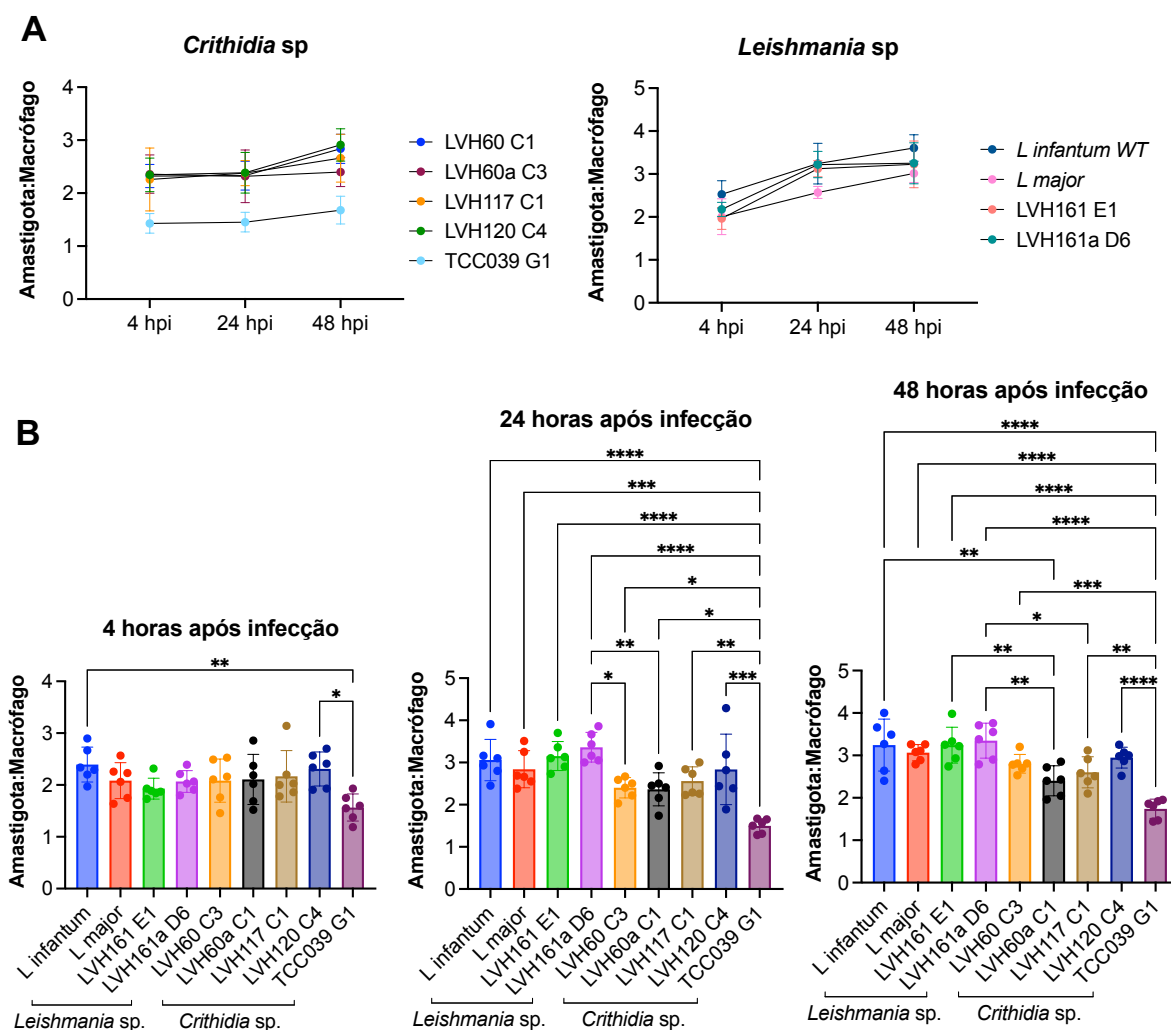
**Figura 30.** Porcentagem de infecção de macrófagos U937 infectados com espécies de *Leishmania* e *Crithidia*.



(A) Cinética de infecção de macrófagos infectados com *Crithidia* sp. e *Leishmania* sp.; (B) Porcentagem de macrófagos infectados após 4, 24 e 48 horas. Os resultados foram analisados utilizando *One-way ANOVA* com teste de comparações múltiplas de *Tukey* realizado no *GraphPad Prism* Versão 9.5.1. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Os valores foram representados pela média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata experimental.

Além disso, todas as cepas utilizadas neste estudo mostraram uma diferença significativa em comparação com a cepa TCC039E de acordo com o teste estatístico *One-way ANOVA* acrescido do teste de comparações múltiplas de *Tukey* (Figura 30B). A cepa que apresentou maior infectividade em 4 hpi foi *L. infantum* (43,83%), seguida pelos isolados clínicos LVH161a D6 (*L. infantum*) e LVH120 C4 (*Crithidia* sp LVH60A), correspondendo a 39,67% e 39% de células infectadas, respectivamente. Da mesma forma, em 24 e 48 hpi, a cepa de *L. infantum* manteve o maior percentual de infecção em macrófagos, correspondendo a 56,17% e 51,17% das células infectadas, respectivamente (Figura 30B; Tabela 16).

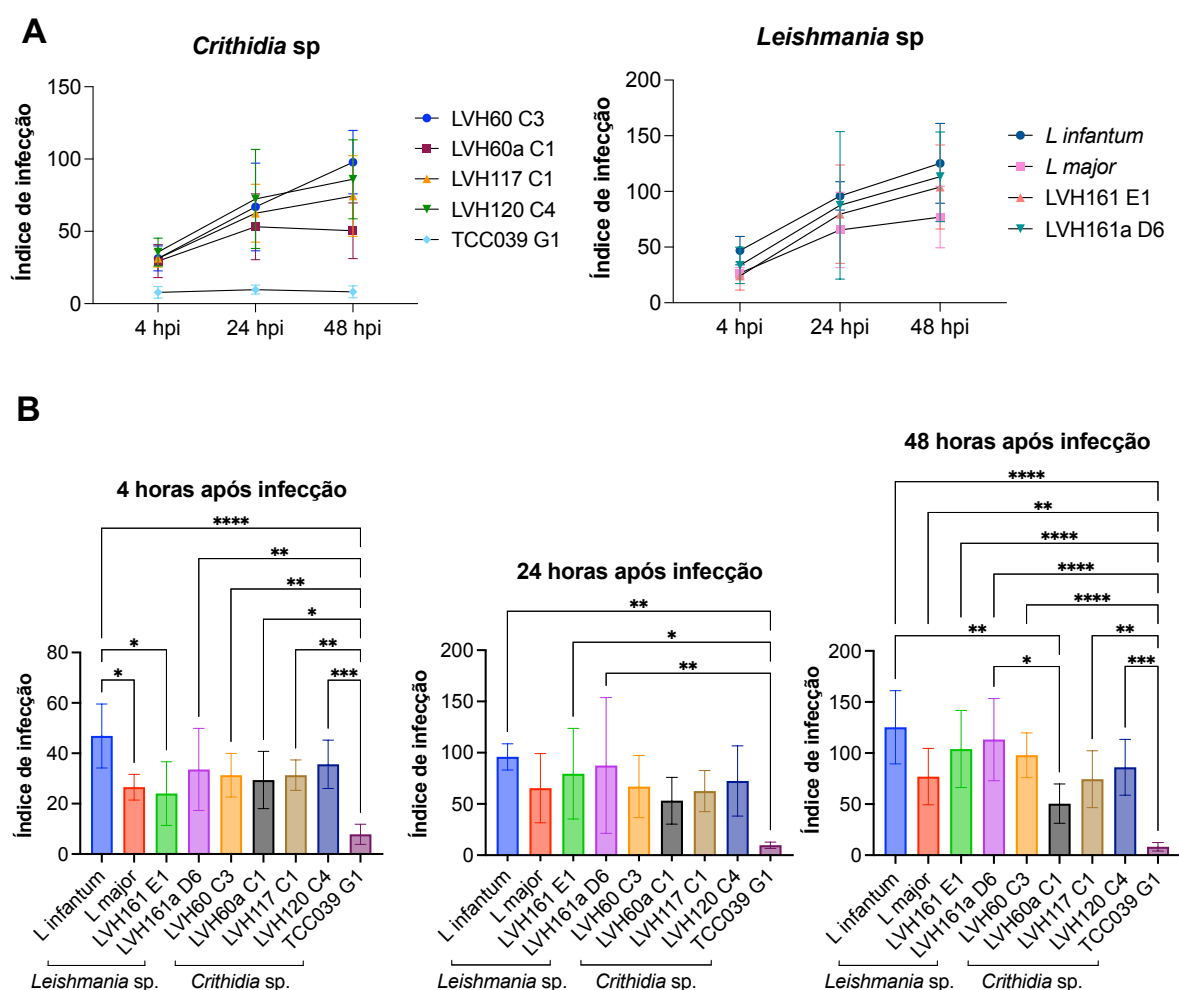
**Figura 31.** Razão Amastigota: macrófagos U937 infectados com espécies de *Leishmania* e *Crithidia*.



(A) Cinética de amastigota: macrófagos infectados com *Crithidia* sp. e *Leishmania* sp.; (B) Razão amastigota: macrófagos infectados após 4, 24 e 48 horas. Os resultados foram analisados utilizando *One-way ANOVA*, acrescido do teste de comparações múltiplas de *Tukey* realizado no *GraphPad Prism* Versão 9.5.1. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 e \*\*\*\*P<0,0001. Os valores foram representados pela média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata experimental.

A relação amastigota: macrófago após 4 horas de infecção foi maior para *L. infantum*, seguida pela cepa LVH120 C4. Da mesma forma, em 24 e 48 hpi, o isolado clínico LVH161a (*L. infantum*) apresentou o maior número de parasitas por macrófago, seguido pelo isolado clínico LVH161 (*L. infantum*). Como esperado, a cepa TCC039E demonstrou o menor número de estruturas intracelulares em relação aos macrófagos infectados em todos os tempos avaliados (Figura 31; Tabela 16).

**Figura 32.** Índice de infecção de diferentes cepas de macrófagos infectados com cepas *Crithidia* sp. LVH60A, *L. infantum*, *L. major* e *C. fasciculata*.



(A) Cinética do índice de infecção de macrófagos infectados com *Crithidia* sp. e *Leishmania* sp.; (B) Índice de infecção de macrófagos infectados após 4, 24 e 48 horas. Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico *One-way ANOVA*, acrescido do teste de comparações múltiplas de *Tukey* realizado no *GraphPad Prism Versão 9.5.1*. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  e \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Os valores foram representados pela média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata experimental.

O índice de infecção variou nos diferentes tempos de infecção avaliados, indo de um mínimo de 7,83 (*C. fasciculata* TCC039E - 4 hpi) a um máximo de 125,26 (*L. infantum* - 48 hpi) (Tabela 16). A cepa *L. infantum* apresentou a maior índice de infecção em todos os tempos avaliados, seguida por LVH120 C4 em 4 hpi (35,64) e LVH161 em 24 e 48 hpi (87,55 e 113,20, respectivamente). Em todos os momentos, o menor índice de infecção foi observado para a cepa *C. fasciculata* TCC039E (Figura 32; Tabela 16). Esses dados refletem a capacidade das diferentes cepas de parasitas em estabelecer e manter a infecção nos macrófagos, com *L. infantum* demonstrando a maior eficiência nesse aspecto.



**Tabela 16.** Porcentagem de infecção, razão amastigota: macrófagos e índice de infecção de macrófagos U937 infectados com cepas de parasitas *Crithidia* sp. LVH60A, *Leishmania infantum*, *L. major* e *C. fasciculata*.

Cepa	Porcentagem de infecção (± DP)		
	4h p.i.	24h p.i.	48h p.i.
<i>L. infantum</i>	43,83 (± 3,66)	56,17 (± 3,19)	61,67 (± 5,61)
<i>L. major</i>	35,67 (± 1,86)	46,33 (± 7,09)	49,50 (± 9,71)
LVH161 E1	34,33 (± 9,24)	48,67 (± 13,32)	56,00 (± 9,82)
LVH161a D6	39,67 (± 11,40)	47,83 (± 16,09)	57,17 (± 8,13)
LVH60 C3	38,50 (± 1,64)	51,17 (± 11,20)	58,83 (± 7,14)
LVH60a C1	36,67 (± 5,01)	46,00 (± 8,65)	45,17 (± 7,00)
LVH117 C1	38,17 (± 2,93)	49,00 (± 7,72)	52,50 (± 9,25)
LVH120 C4	39,00 (± 4,24)	49,00 (± 9,03)	53,33 (± 7,45)
TCC039E	21,67 (± 4,08)	25,33 (± 3,56)	21,00 (± 4,60)
<b>Amastigota: Macrófago (± DP)</b>			
<i>L. infantum</i>	2,40 (± 0,33)	3,06 (± 0,49)	3,24 (± 0,61)
<i>L. major</i>	2,09 (± 0,35)	2,84 (± 0,44)	3,07 (± 0,19)
LVH161 E1	1,93 (± 0,20)	3,15 (± 0,34)	3,24 (± 0,42)
LVH161a D6	2,07 (± 0,21)	3,36 (± 0,35)	3,35 (± 0,41)
LVH60 C3	2,08 (± 0,41)	2,40 (± 0,24)	2,80 (± 0,22)
LVH60a C1	2,11 (± 0,48)	2,36 (± 0,39)	2,40 (± 0,35)
LVH117 C1	2,17 (± 0,50)	2,56 (± 0,34)	2,60 (± 0,36)
LVH120 C4	2,31 (± 0,33)	2,84 (± 0,83)	2,95 (± 0,24)
TCC039E	1,56 (± 0,26)	1,49 (± 0,17)	1,74 (± 0,23)
<b>Índice de infecção (± DP)</b>			
<i>L. infantum</i>	46,87 (± 12,73)	95,94 (± 12,76)	125,26 (± 35,79)
<i>L. major</i>	26,56 (± 5,10)	65,39 (± 33,79)	76,96 (± 27,62)
LVH161 E1	24,01 (± 12,66)	79,52 (± 44,15)	103,96 (± 37,73)
LVH161a D6	33,59 (± 16,31)	87,55 (± 66,27)	113,20 (± 40,25)
LVH60 C3	31,30 (± 8,66)	66,93 (± 30,31)	97,86 (± 21,96)
LVH60a C1	29,40 (± 11,38)	53,14 (± 22,77)	50,44 (± 19,26)
LVH117 C1	31,32 (± 6,05)	62,55 (± 20,05)	74,39 (± 27,87)
LVH120 C4	35,64 (± 9,61)	72,39 (± 34,26)	86,03 (± 27,34)
TCC039E	7,83 (± 3,97)	9,75 (± 3,08)	8,23 (± 4,14)

Foram geradas *paired-end reads* de 150 pares de base usando a plataforma NovaSeq Illumina. O total de dados produzidos pelo sequenciamento foi de 1.292,9 gigabytes (Gb), o que equivale a uma média de aproximadamente 14,3 Gb por amostra. A quantidade de *reads* brutas variou entre 87.612.768 e 148.024.022, e, após a filtragem, cerca de 96% das *reads* foram mantidas. A estatística descritiva referente à qualidade dos dados de sequenciamento e as *reads* após a etapa de filtragem podem ser encontradas na Tabela 2 do apêndice.

Com objetivo de realizar a montagem *de novo* do transcriptoma, foram utilizados diferentes comprimentos *k-mer* para determinar o comprimento ideal a ser utilizado nas análises. A tabela 17 apresenta o tamanho de cada montagem do transcriptoma realizada com os *softwares* Trinity e ABySS.

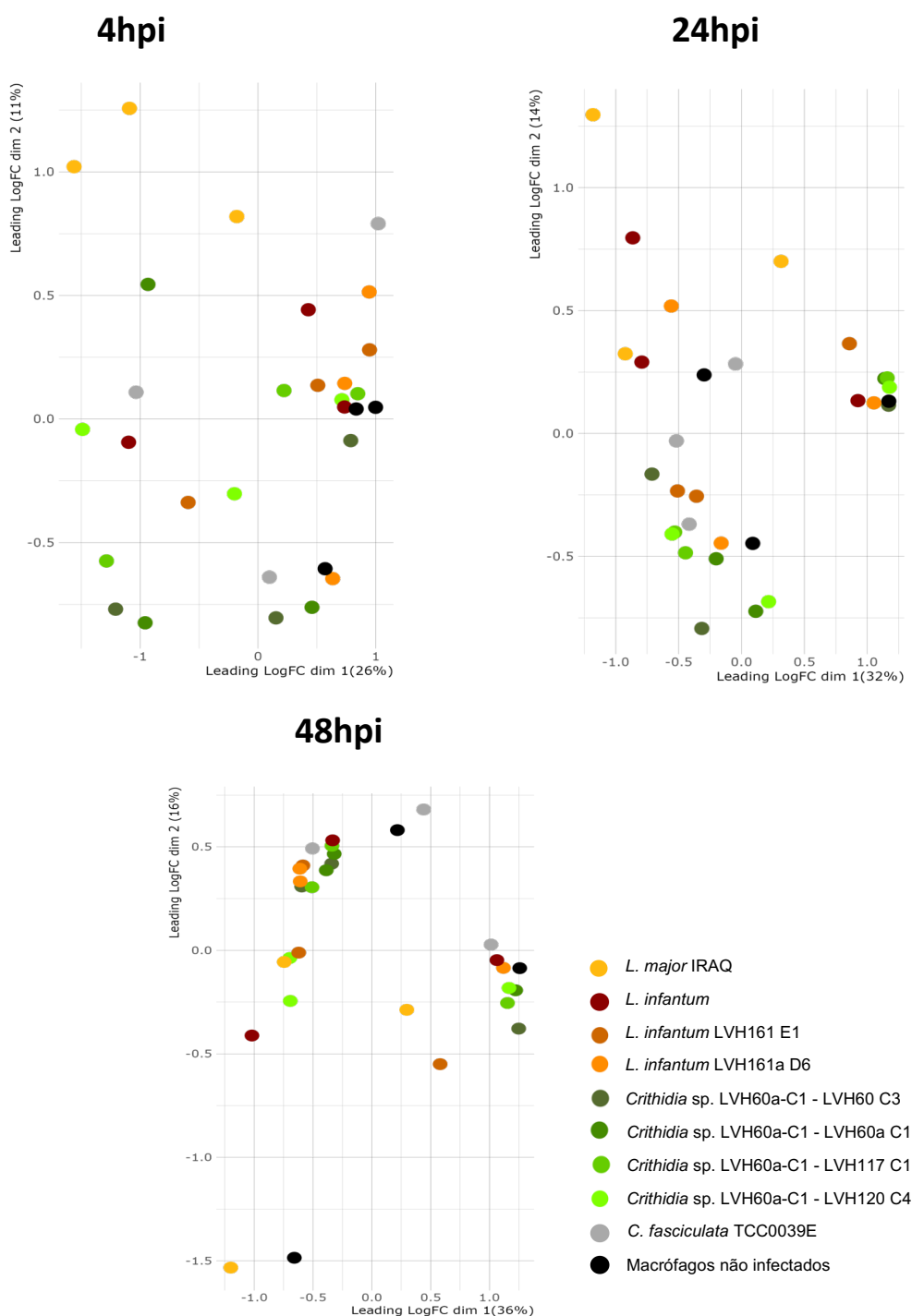
**Tabela 17.** Quantidade de *contigs* obtidos de cada montagem utilizando diversos comprimentos *k-mer*.

<b>Software</b>	<b>k-mer</b>	<b>Número de <i>contigs</i></b>
Trinity	25	519.568.152
ABySS	25	148.622.321
ABySS	35	132.803.874
ABySS	45	117.345.226
ABySS	55	95.743.145
ABySS	65	68.799.405
ABySS	85	12.720.302
ABySS	95	199.421.049

O conjunto final de dados resultou em 224.986 *contigs*, compostos por transcritos que codificam proteínas de células humanas e de parasitas. Posteriormente, foi realizado o mapeamento das *reads* utilizando o *software* RSEM e o arquivo gerado foi submetido a uma filtragem para remover transcritos com TPM (Transcritos por milhão) inferior a 2. O conjunto de dados resultante foi então utilizado como arquivo de entrada no pacote edgeR, para avaliar a variância entre amostras com base em todos os seus perfis de expressão gênica, utilizando gráficos de análise do componente principal (PCA) (Figura 33 e 34). Além disso, foi realizada a análise de expressão diferencial entre os grupos experimentais.

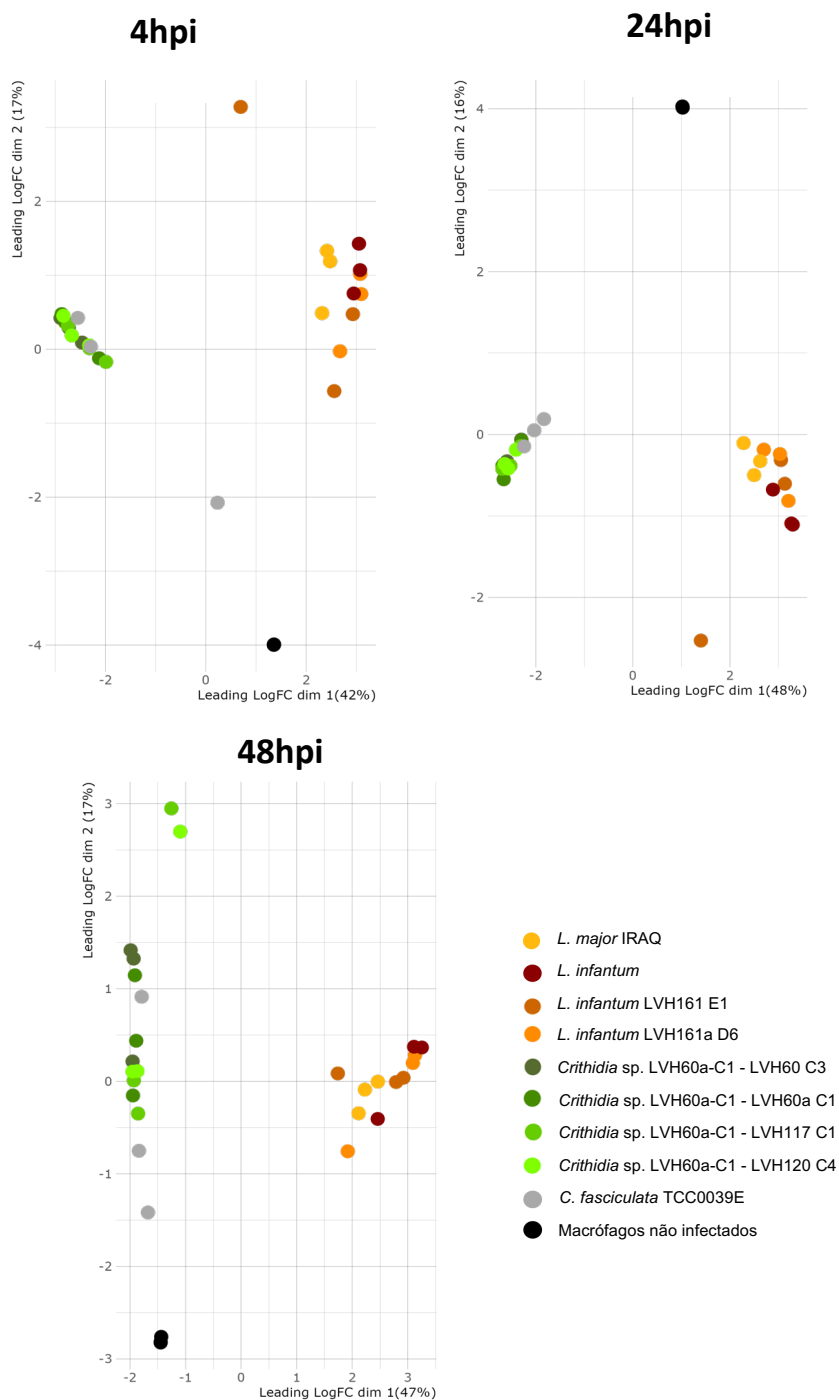
Por meio da análise de PCA, foi possível observar uma distribuição heterogênea das amostras, independentemente do tempo de infecção (Figura 33). Em geral, os resultados obtidos utilizando nossa abordagem experimental, sugerem que o perfil transcricional das células hospedeiras não muda consideravelmente após a infecção, nem especificamente em resposta a uma determinada espécie de parasita. No entanto, é possível notar a formação de agrupamentos distintos em relação aos transcritos dos tripanossomatídeos, como indicado na figura 34. Nos tempos de 4, 24 e 48 hpi, há uma separação clara dos parasitas dixênicos verdadeiros *Leishmania* sp. e dos parasitas monoxênicos *Crithidia* sp (Figura 34).

**Figura 33.** Perfil transcricional de macrófagos infectados com diferentes cepas de parasitos durante a infeção *in vitro*.



Análise de PCA de transcritos humanos provenientes de macrófagos infectados com diferentes cepas de tripanossomatídeos. A variância entre as amostras correspondem às principais alterações de *log-fold-change* dos transcritos entre cada par de amostras. A principal mudança logarítmica é a média das maiores mudanças logarítmicas absolutas dos transcritos entre cada par de amostras. Os gráficos foram realizados com valores de TPM inferiores a 2 e normalizados para correção de efeito de lote. O componente principal 1 apresentou uma variação média de 31%, que se deve pela diferença entre macrófagos não infectados em comparação com macrófagos infectados. O componente principal 2 apresentou variação menor com valor médio de 13%, que representa as réplicas experimentais.

**Figura 34.** Perfil transcricional de tripanossomatídeos durante a infecção *in vitro* de macrófagos infectados com diferentes cepas de parasitos.

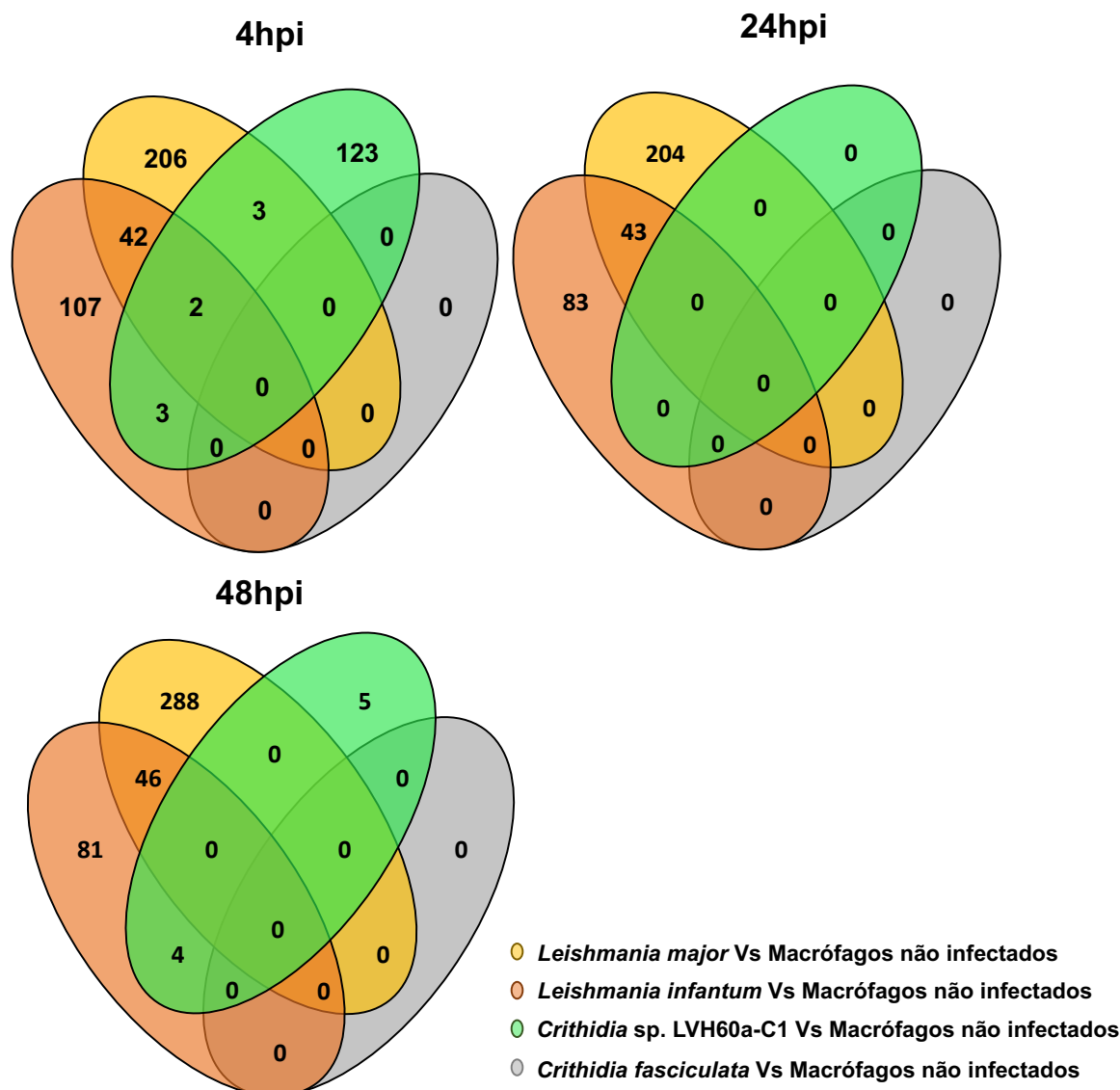


Análise de PCA de transcritos de tripanossomatídeos provenientes da infecção *in vitro* de macrófagos infectados com diferentes cepas de parasitos. A variância entre as amostras correspondem às principais alterações de *log-fold-change* dos transcritos entre cada par de amostras. A principal mudança logarítmica é a média das maiores mudanças logarítmicas absolutas dos transcritos entre cada par de amostras. Os gráficos foram realizados com valores de TPM inferiores a 2 e normalizados para correção de efeito de lote. O componente principal 1 apresenta uma variação média de 45%, que se deve pela diferença entre parasitas patogênicos (*C. fasciculata* em comparação com *Crithidia* sp. LVH60A, *L. infantum* e *L. major*). A variação do componente principal 2 apresentou variação menor com valor médio de 17%, que representa as réplicas experimentais.

A análise de expressão diferencial foi realizada utilizando um FDR (taxa de descoberta falsa) inferior a 0,05 para os transcritos humanos nas seguintes comparações: i) macrófagos não infectados *versus* *Crithidia* sp. LVH60A, ii) macrófago não infectado *versus* *C. fasciculata*, iii) macrófago não infectado *versus* *L. infantum* e iv) macrófago não infectado *versus* *L. major*.

Como demonstrado na figura 35, não foram observadas diferenças na expressão de genes humanos em macrófagos infectados com *C. fasciculata* em comparação com o controle (macrófago não infectado) nos tempos avaliados. Este resultado era esperado, uma vez que esta espécie apresentou baixa porcentagem de infecção e é considerada uma espécie não patogênica. Por outro lado, a comparação entre o controle e macrófagos infectados com *Crithidia* sp. LVH60A resultou na identificação de 131 genes diferencialmente expressos em 4 horas após a infecção e apenas 7 em 48 horas após infecção, resultando em uma resposta de expressão gênica mais significativa apenas nas primeiras horas após infecção.

**Figura 35.** Diagrama de Venn evidenciando o número de transcritos humanos diferencialmente expressos de macrófagos infectados com diferentes parasitos compartilhados entre comparações ou exclusivos de cada comparação.



Transcritos humanos diferencialmente expressos foram obtidos através da comparação de macrófagos não infectados em comparação a macrófagos infectados com diversas espécies de tripanossomatídeos nos tempos de 4, 24 e 48 horas após infecção.

Foram identificados 4 horas após infecção com cepas de *L. infantum* e *L. major*, 154 e 253 genes humanos diferencialmente expressos, respectivamente. Essa tendência se manteve nos tempos de 24 e 48 horas. Em relação a *L. infantum*, foram encontrados 126 e 127 genes diferencialmente expressos nas análises realizadas após 24 e 48 horas de infecção, respectivamente. Para *L. major*, nos tempos de 24 e 48 horas após infecção, os resultados mostraram 247 e 334 genes diferencialmente expressos, respectivamente.

A fim de identificar os transcritos diferencialmente expressos em comum entre as espécies patogênicas *L. infantum* e *L. major* e os isolados *Crithidia* sp. LVH60A que possam fornecer *insights* sobre a possível patogenicidade deste último, foi realizado o diagrama de

Venn dos transcritos diferencialmente expressos de todas as espécies, conforme mostrado na Figura 35.

Em 4 horas após infecção, somente oito transcritos foram compartilhados entre *Crithidia* sp. LVH60A e as espécies de *Leishmania* utilizadas, como indicado na Tabela 18. Este número diminuiu para quatro transcritos após 48 horas de infecção. Dentre estes doze transcritos, não há descrições na literatura que os relacionem ao contexto das leishmanioses.

**Tabela 18.** Transcritos humanos diferencialmente expressos compartilhados entre os grupos de macrófagos infectados com as espécies *L. infantum*, *L. major* e *Crithidia* sp. LVH60A.

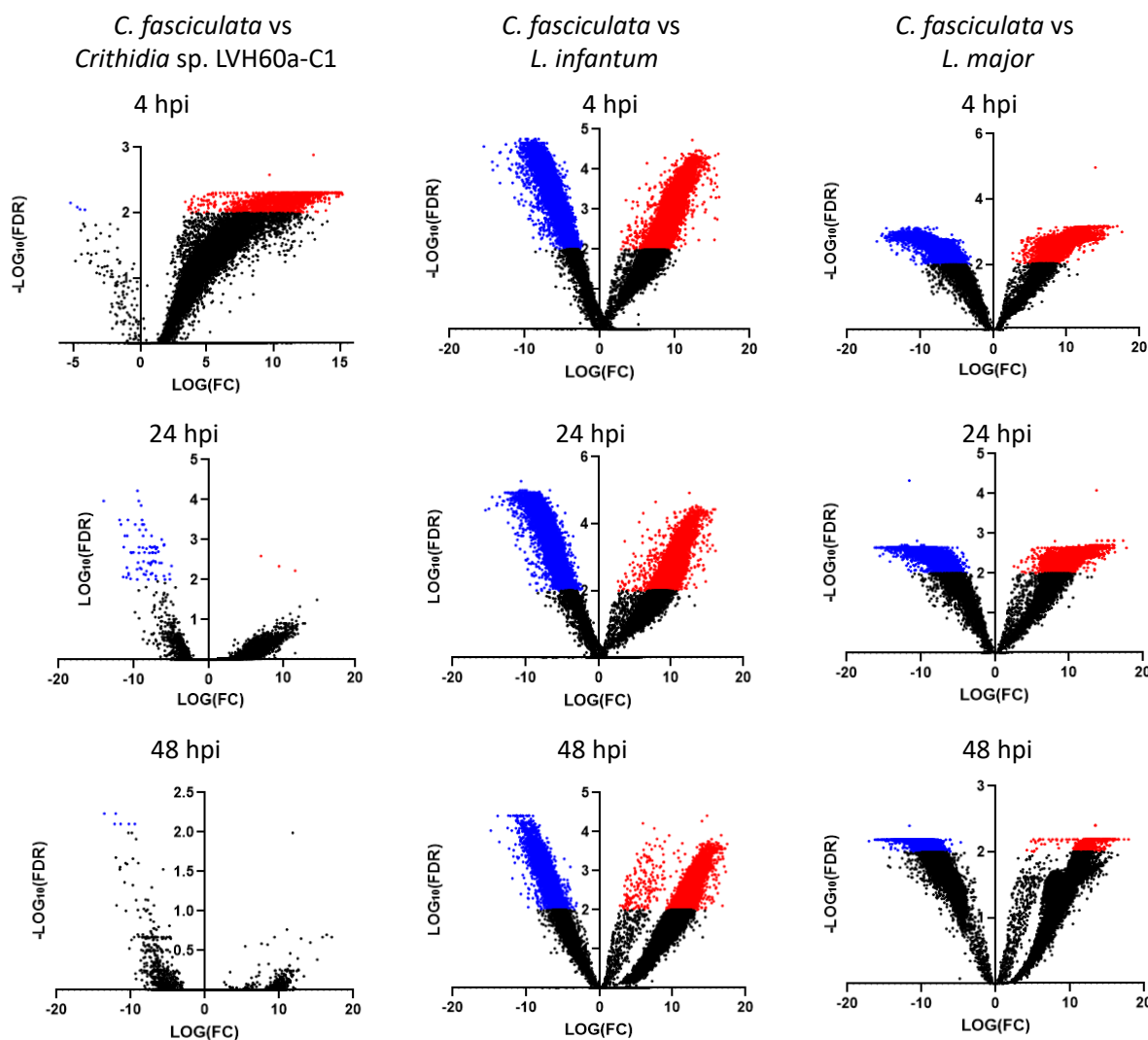
Tempo	Log2FC de macrófagos não infectados versus:			Gene ID
	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania major</i>	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	
4h	10,706	10,532	11,233	<i>SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2</i>
	8,397	8,020	8,177	<i>Long-chain fatty acid transport protein 1</i>
		-5,809	-3,737	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
		1,640	1,538	<i>Ubiquitin</i>
		-2,950	-2,180	<i>Cytochrome b</i>
		-9,958	-7,420	<i>PABIR family member 2</i>
		0,538	0,552	<i>Proheparin-binding EGF-like growth factor</i>
		-10,663	-9,584	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit A</i>
48h	-4,003		-3,900	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>
	-5,183		-5,215	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6</i>
	-5,484		-5,484	<i>Cytochrome b</i>
	-8,301		-7,616	<i>Protein LSM14 homolog A</i>

A análise de expressão diferencial de transcritos de cinetoplastídeos foi realizada utilizando um FDR inferior a 0,01 para as seguintes comparações: i) *Crithidia* sp. LVH60A versus *C. fasciculata*, ii) *L. infantum* versus *C. fasciculata* e iii) *L. major* versus *C. fasciculata*.

A comparação entre macrófagos infectados com *C. fasciculata* e *Crithidia* sp. LVH60A revelou a presença de 1.622 transcritos de tripanossomatídeos diferencialmente expressos em 4 horas após a infecção, dentre estes 1.618 transcritos estão regulados positivamente e 4 regulados negativamente (Figura 36). Esse número aumenta consideravelmente para 42.691 quando realizamos a comparação entre *C. fasciculata* e *L. infantum* (24.571 transcritos regulados positivamente e 18.120 transcritos regulados negativamente), e para 55.407

transcritos quando comparamos *C. fasciculata* e *L. major*, dentre estes 38.324 transcritos regulados positivamente e 17.983 transcritos regulados negativamente (Figura 36).

**Figura 36.** Volcano plot dos transcritos diferencialmente expressos de tripanossomatídeos em comparação com *C. fasciculata*.



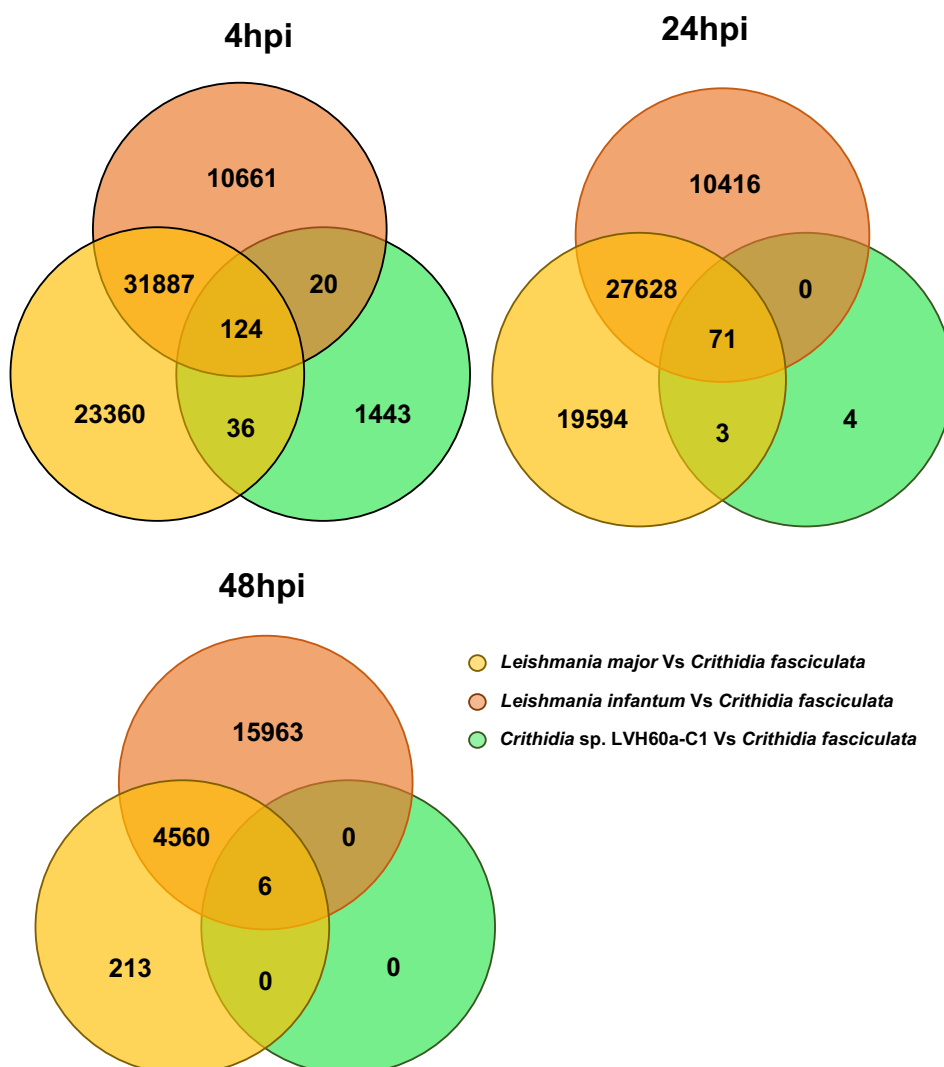
Resumo do teste de expressão diferencial com os valores de  $\text{Log}_2\text{FC}$  – regulação da expressão (eixo x),  $\text{Log}_{10}$  da taxa de descoberta falsa - FDR (eixo y) para cada amostra analisada. Cada ponto corresponde a um transcrito, sendo os pontos azuis transcritos significativamente regulados negativamente, e em vermelho, transcritos significativamente regulados positivamente.

Em 24 horas após a infecção, observamos uma redução na quantidade de transcritos diferencialmente expressos, com 78 na comparação entre *C. fasciculata* e *Crithidia* sp. LVH60A (3 transcritos regulados positivamente e 75 transcritos regulados negativamente), 38.113 na comparação com *L. infantum* (19.977 transcritos regulados positivamente e 18.136 transcritos regulados negativamente) e 47.294 na comparação com *L. major* (30.900 transcritos regulados positivamente e 16.394 transcritos regulados negativamente). Esses



valores se mantiveram em 48 horas após infecção, resultando em 6 genes diferencialmente expressos na comparação entre *C. fasciculata* e *Crithidia* sp. LVH60A, todos regulados negativamente, e 20.742 na comparação entre *C. fasciculata* e *L. infantum* (11.721 transcritos regulados positivamente e 9.210 transcritos regulados negativamente). Notavelmente, o número de transcritos diferencialmente expressos diminuiu para 4.779 na comparação *C. fasciculata* e *L. major*, dentre estes 774 transcritos regulados positivamente e 4.005 transcritos regulados negativamente (Figura 36).

**Figura 37.** Diagrama de Venn dos transcritos diferencialmente expressos de tripanossomatídeos *L. major*, *L. infantum* e *Crithidia* sp LVH60A em comparação com *C. fasciculata*.

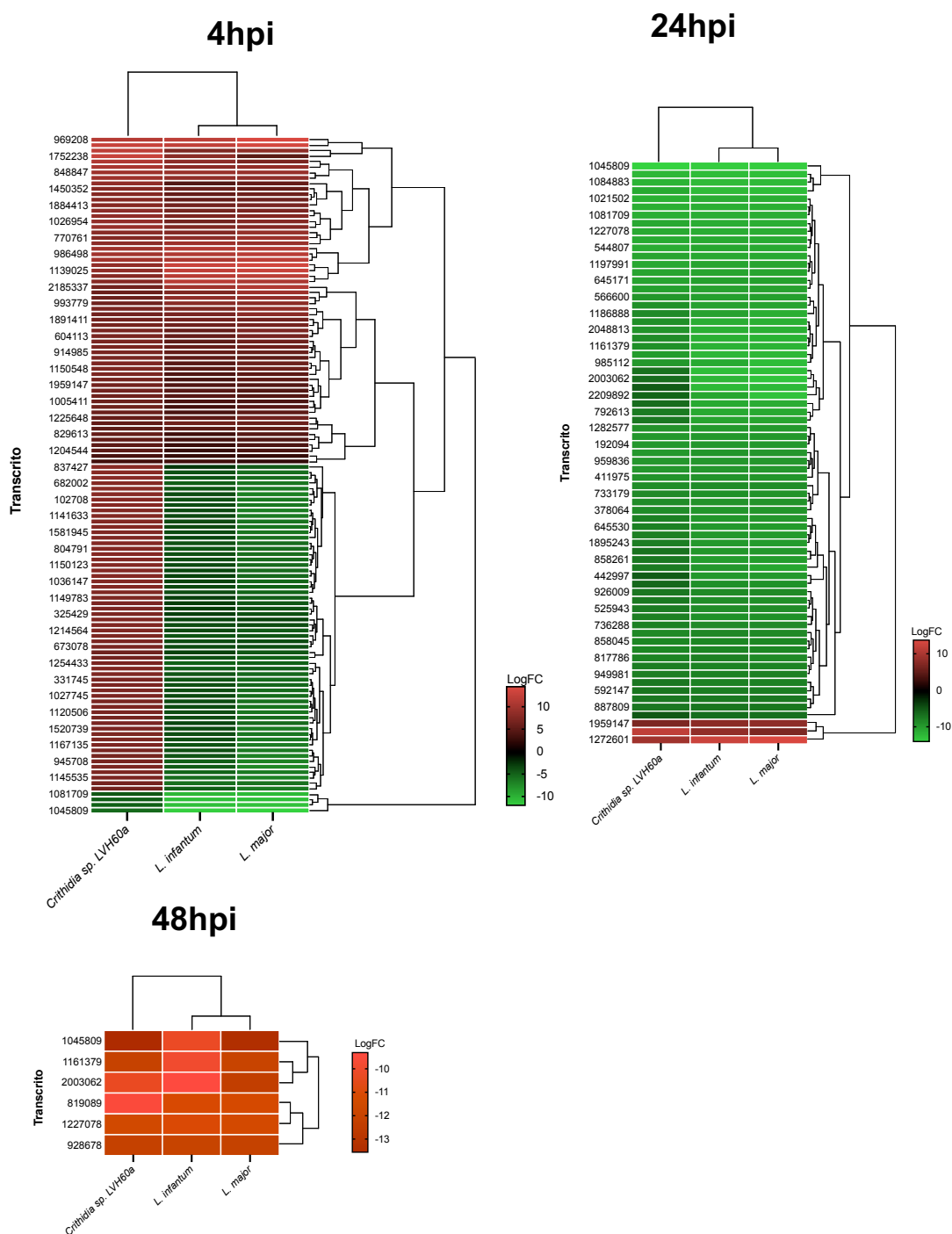


Os transcritos diferencialmente expressos foram obtidos através da comparação de macrófagos infectados com diversas espécies de tripanossomatídeos nos tempos de 4, 24 e 48 horas após infecção.

Realizamos o diagrama de Venn para verificar os transcritos diferencialmente expressos comuns entre *Crithidia* sp. LVH60A, *L. infantum* e *L. major* em comparação com o

controle (*C. fasciculata*), conforme demonstrado na figura 37. Foram identificados 124 genes compartilhados entre estas 3 espécies. Dentre estes, 61 transcritos tiveram regulação em sentido contrário, 59 transcritos regulados positivamente, e somente 4 transcritos foram regulados negativamente (Figura 38).

**Figura 38.** Heatmap dos diferentes transcritos de tripanossomatídeos diferencialmente expressos em relação a *C. fasciculata*.



Transcritos em gradação verde representam os genes regulados negativamente e transcritos em gradação vermelha representam os transcritos regulados positivamente em 4, 24 e 48 horas após infecção em comparação a *C. fasciculata*. A clusterização hierárquica dos dados

de expressão foi realizada com o pacote *heatmaply* no R, utilizando a medida de Distância Euclidiana e a função de ligação média e foram representadas na forma de *heatmap*.

Dentre os transcritos comuns regulados positivamente, destacam-se o transcrito que codifica a *Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial*; 2 transcritos que codificam a proteína HSP83-1; 4 transcritos que codificam a proteína HSP83; 1 transcrito que codifica a proteína *Prefoldin subunit 3* e 4 transcritos que codificam a proteína *Elongation factor 1-alpha* (Tabela 19).

**Tabela 19.** Transcritos regulados positivamente durante a infecção de macrófagos U397 infectados com *Crithidia* sp. LVH60A, *L. infantum* e *L. major*.

Tempo	Transcrito	Log2FC de macrófagos não infectados versus:			Gene
		<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania major</i>	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	
4h	993779	8,16	8,33	6,40	<i>HSP 70-related protein 1, mitochondrial</i>
	1204544	2,84	3,9	5,10	HSP 83-1
	1611287	3,97	5,19	6,02	
	1445851	3,80	5,23	6,81	HSP 83
	1466883	3,72	4,33	5,35	
	1345560	5,66	7,26	6,98	
	1288729	4,29	5,20	7,28	
	604113	5,67	6,77	7,00	<i>Prefoldin subunit 3</i>
	1374022	4,76	4,47	6,62	<i>Elongation factor 1-alpha</i>
	1752238	8,26	4,93	13,00	
	1884413	6,67	7,00	7,94	
	1959147	4,31	4,64	6,60	
	36012	-	-	10,08	<i>Ornithine decarboxylase</i>
	260376	8,23	9,16	-	
	403527	9,31	10,72	-	
	580438	8,95	-	-	
	72105	7,25	-	-	
	177954	-	7,11	-	
	1304452	-	-	14,97	<i>Tryparedoxin peroxidase</i>
	1304158	10,31	12,15	-	
1667462	14,06	16,96	-		
1506045	-	12,50	-		
1673990	-	14,19	-		
24h	1959147	7,91	8,11	6,91	<i>Elongation factor 1-alpha</i>

Além de analisarmos os transcritos comuns para estas três espécies, também examinamos os produtos dos transcritos, visto que, ao utilizar a metodologia de montagem *de novo* com base nas *reads* do RNA-seq, vários transcritos montados podem codificar a mesma proteína. Neste sentido, identificamos transcritos regulados positivamente que codificam as proteínas *Ornithine decarboxylase* e *Tryparedoxin peroxidase* (Tabela 19), proteínas essenciais para a sobrevivência dos parasitas nos hospedeiros vertebrados (BOITZ et al., 2009; IYER et al., 2008; ROMAO et al., 2009).

## ***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

Diante da presença de vários isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A provenientes de baço, pele e medula óssea de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral em Sergipe, Brasil, conforme observado anteriormente por Maruyama et al., 2019, Rogerio et al., 2023 e Takamiya et al., 2023, este estudo teve como objetivo principal realizar uma caracterização abrangente dos isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60A a fim de compreender as possíveis adaptações deste parasita ao ciclo de vida dixênico. Essa caracterização envolveu a análise do fenótipo desses isolados, sequenciamento completo do genoma desses parasitas e análises de *dual* transcriptoma de macrófagos infectados por parasitas *Crithidia* sp. LVH60A, a partir de infecção *in vitro*. Os isolados clínicos utilizados neste presente estudo foram obtidos de um paciente diagnosticado com leishmaniose visceral no ano de 2017 (caso recidivante), juntamente com os isolados LVH60 e LVH60a, que foram previamente descritos em Maruyama et al., 2019.

A termotolerância, resultante da mudança de temperatura durante a transmissão de protozoários do inseto vetor para mamíferos, é um fator fundamental para o parasitismo. Os tripanossomatídeos monoxênicos, que normalmente residem no intestino dos insetos, são sensíveis à temperatura e geralmente não conseguem sobreviver em vertebrados de sangue quente (KRAEVA et al., 2015). Um estudo realizado Roitman *et al.*, 1977, envolvendo as espécies *Crithidia hutneri* e *Crithidia luciliae thermophila*, demonstraram que estes organismos podem ser cultivados a 37 °C, desde que sejam fornecidos aminoácidos, purinas e hemina.

Um estudo envolvendo a tolerância de *C. thermophila* mostrou que essa espécie apresentou um aumento na taxa de divisão quando cultivada a 34°C em comparação com 25°C. Além disso, os pesquisadores investigaram os mecanismos moleculares subjacentes à resistência térmica dessa espécie por meio da análise do transcriptoma de *C. thermophila* cultivada nestas temperaturas. Como resultado, observou-se uma significativa regulação positiva na transcrição de genes relacionados ao metabolismo do açúcar e à proteção contra o estresse mitocondrial em parasitas cultivados em 34 °C (ISHEMGULOVA et al., 2017).

A fim de avaliar a termotolerância de parasitas *Crithidia* sp. LVH60A, estes parasitas foram cultivados em 25 °C e 35 °C. Os resultados revelaram que os isolados clínicos de *Crithidia* sp. LVH60a C1 apresentaram altas taxas de duplicação a 25 °C, semelhantes a taxa de duplicação de *C. fasciculata* TCC039E (Figura 9A). Em 35 °C, a duplicação dos isolados *Crithidia* sp. LVH60A assemelham a dos isolados *L. infantum*, tendo maior crescimento em comparação à amostra de *C. fasciculata*, no qual não foi capaz de se replicar nesta temperatura (Figura 9B). Dessa forma, a espécie *Crithidia* sp. LVH60A apresentou maior termotolerância em relação a *C. fasciculata*, característica essencial para a adaptação ao ciclo dixênico nos tripanossomatídeos de importância médica-veterinária.

É importante mencionar que isolados de *Leptomonas seymouri*, obtidos de dois pacientes com LV co-infectados com *L. donovani* também foram capazes de se multiplicar a temperaturas elevadas, alcançando em média  $2 \times 10^7$  células/mL (KRAEVA et al., 2015), valores similares ao dos apresentados neste trabalho para os isolados de *L. infantum* e *Crithidia* sp. LVH60A. Essas descobertas ressaltam a capacidade de adaptação desses parasitas a diferentes condições de temperatura, o que pode ser interpretado como uma pré-adaptação ao ciclo de vida dixênico.

O gênero *Crithidia* é definido pela forma celular de coanomastigota (flagelada, móvel e livre no lúmen intestinal de insetos) e amastigota (sem flagelo e fixa no epitélio intestinal de insetos) (ALCOLEA et al., 2014). As formas coanomastigotas são remanescentes de promastigotas encurtadas e infladas, arredondada na parte posterior e possuem uma extremidade apical truncada devido a presença de um bolso flagelar em formato de funil próximo ao cinetoplasto, que está ligeiramente anterior ao núcleo (ALCOLEA et al., 2014; YURCHENKO et al., 2008).

Nossas análises morfológicas mostraram que isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A se assemelham à *C. fasciculata*. No entanto, *C. fasciculata* apresenta uma considerável heterogeneidade nas formas celulares cultivadas, possuindo uma maior área do corpo celular e maior estrutura do reservatório flagelar quando comparados aos isolados *Crithidia* sp. LVH60A e *L. infantum* (Figuras 10 e 12). Além disso, durante as análises morfológicas foram observados a presença de várias vesículas extracelulares (VEs) no corpo celular das formas promastigotas, especialmente do isolado clínico LVH117 C1 (Figura 11).

As VEs são partículas formadas por uma bicamada lipídica contendo proteínas e ácidos nucleicos. Uma vez liberadas, essas VEs desempenham um papel fundamental na fisiologia e nas funções das células hospedeiras (DONG; FILHO; OLIVIER, 2019). Em uma recente revisão de literatura sobre as vesículas extracelulares de *Leishmania* sp. e *Trypanosoma* sp., realizada por Torrecilhas e colaboradores (2020), foi demonstrado que a liberação de exossomos de *Leishmania* produzidos *in vitro* desempenha um papel significativo no enriquecimento da população de parasitas.

Além disso, a liberação de VEs é de extrema importância para os eventos de imunomodulação desencadeados pelos parasitas durante a infecção. Um estudo recente publicado por (DOUANNE et al., 2022) mostraram que os parasitas do gênero *Leishmania* utilizam VEs para realizar a troca genética horizontal de genes de resistência a medicamentos, além de modularem a aptidão das promastigotas ao reduzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, garantindo ainda mais a sobrevivência e propagação de populações resistentes a medicamentos. Apesar de diversos estudos envolvendo VEs em espécies de *Leishmania*, ainda não há relatos sobre a composição de tais vesículas e sua função para espécies monoxênicas, como *Crithidia*.

Diversos estudos apontam uma ampla variação morfológica dentro do mesmo gênero, e em alguns casos, até mesmo dentro da mesma espécie. Esta diversidade morfológica tornou a distinção de espécies com base apenas em características morfológicas inviável (VOTÝPKA et al., 2015; YURCHENKO et al., 2008). Com o advento das tecnologias moleculares, como a PCR e sequenciamento de regiões conservadas, essas abordagens têm sido amplamente empregadas na caracterização e genotipagem de tripanossomatídeos (GHOBAKHLOO et al., 2019; MARCILI et al., 2014; MARUYAMA et al., 2019; YURCHENKO et al., 2008).

As culturas celulares dos isolados clínicos obtidos do paciente BASF foram sequenciadas para detecção do marcador taxonômico de RNA ribossomal da subunidade menor (SSU rRNA). Análises filogenéticas indicaram que parasitas isolados em 2017 (LVH117 e LVH120) estão mais intimamente relacionados com *Crithidia fasciculata*. No entanto, sequências SSU detectadas em amostras de medula óssea do paciente coletadas em 2017, e dos isolados clínicos LVH161 e LVH161a, se agruparam com *L. infantum* (Figura 18).

A fim de tentarmos identificar *L. infantum* nas culturas isoladas da medula óssea (LVH117) e baço (LVH120), bem como quantificar a carga parasitária de amostras clínicas, realizamos a quantificação destas amostras por PCR quantitativo, seguindo o protocolo descrito por Takamiya et al., 2023. Neste ensaio, *L. infantum* foi detectado em amostras de medula óssea e biópsia de pele coletadas durante a quinta recidiva (2020), conforme já esperado (Figura 19). Embora nenhuma amostra de tecido tenha sido coletada durante a primeira e segunda internações hospitalares (2016), as culturas de primeira e terceira passagem amplificaram para a espécie *Crithidia* sp. LVH60A. A cultura original do isolado clínico LVH117 continha ambos os parasitas (Figura 19).

Com base nesses achados, juntamente com os resultados da análise do marcador SSU rRNA, podemos concluir que o paciente estava co-infectado em 2017 com parasitas *Crithidia* sp. LVH60A e *L. infantum*. Na cultura do isolado LVH120, foram detectados apenas parasitas *Crithidia* sp. LVH60A. Estes parasitas crescem de maneira mais acelerada, se sobrepondo a *Leishmania* em cultura, portanto não devemos descartar a possibilidade de coinfeção do baço por ambos os parasitas.

A ocorrência de mais de um caso de coinfeção entre *Crithidia* sp. LVH60A e *L. infantum* foi recentemente documentada por Takamiya e colaboradores (2023). Neste estudo, os pesquisadores utilizaram a técnica de PCR quantitativo e conseguiram detectar o DNA destes em aspirados de medula óssea de dois novos pacientes com LV e confirmaram a suspeita de coinfeção em de um caso de LV fatal relatado pela primeira vez em 2019 (MARUYAMA et al., 2019). Todos estes pacientes são residentes da região de Sergipe, Brasil.

As diversas espécies pertencentes ao gênero *Crithidia* apresentam uma notável adaptabilidade a uma variedade de hospedeiros, sendo capazes de parasitar uma ampla gama de espécies pertencentes às ordens Diptera, Hemiptera e Hymenoptera (ALCOLEA et

al., 2014). Embora as rotas de transmissão e os possíveis vetores responsáveis pela disseminação de *Crithidia* sp. LVH60A ainda sejam desconhecidos, estudos anteriores realizados na China identificaram a presença de *Crithidia* sp. em flebotomíneos, os quais são vetores conhecidos de uma variedade de patógenos, incluindo espécies de *Leishmania* (WANG et al., 2022). Recentemente, pesquisadores também co-detectaram DNA de *Crithidia* e *Leishmania* em culicídeos na região sudeste da Tailândia (SONGUMPAI et al., 2022).

Até o momento, não temos conhecimento de estudos abordando a epidemiologia dos vetores e a detecção dos parasitas que eles carregam na região do nordeste brasileiro. Entretanto, em Casa Branca, Minas Gerais, foi constatada a presença de DNA de *Herpetomonas* e *Crithidia* em espécies de flebotomíneos (TANURE et al., 2020). Essa detecção de tripanossomatídeos não pertencentes ao gênero *Leishmania* suscita uma questão de grande relevância que tem sido subestimada, que é a circulação desses parasitas entre os flebotomíneos.

Análises baseadas em filogenômica visam reconstruir as histórias evolutivas dos organismos levando em consideração genomas inteiros ou grandes partes dos genomas (PATANÉ; MARTINS; SETUBAL, 2018). Os resultados obtidos por meio da abordagem filogenômica foram consistentes com os obtidos na análise do marcador SSU rRNA. Os isolados LVH117 C1 e LVH120 C4 foram agrupados com LVH60, LVH60a (primeiramente descritos no estudo de Maruyama et al., 2019) e *C. fasciculata*, enquanto os isolados LVH161 e LVH161a foram colocados no mesmo agrupamento com *L. infantum* e *L. donovani* (Figura 20).

Com o objetivo de determinar se os isolados *Crithidia* sp. LVH60A pertencem à espécie *C. fasciculata*, procedemos com a anotação do genoma *Crithidia* sp. LVH60A e conduzimos diversas análises comparativas, dentre elas o mapeamento entre os genomas, avaliação da identidade média de nucleotídeos e verificação de rearranjos cromossômicos de *Crithidia* sp. LVH60A em relação à *C. fasciculata*.

As porcentagens de mapeamento entre isolados *Crithidia* sp. LVH60A e *C. fasciculata* mostraram-se inferiores a 79%, o que também refletiu no resultado da identidade de nucleotídeos (ANI) entre estes genomas (Figura 21). A análise ANI é uma ferramenta utilizada para avaliar identidades taxonômicas em genomas procarióticos (CIUFO et al., 2018) e tem sido usada em diversos estudos de genômica comparativa de *Leishmania* sp. (FERNÁNDEZ-ARÉVALO et al., 2020; PEACOCK et al., 2007).

Em comparação, os genomas de isolados do complexo *L. donovani* exibiram valores de ANI superiores a 99% (FERNÁNDEZ-ARÉVALO et al., 2020). Quando observamos a comparação entre espécies dermatrópicas e viscerotrópicas de *Leishmania*, os valores de ANI foram aproximadamente 94%. Por outro lado, os isolados *Crithidia* sp. LVH60A apresentam



valores de ANI variando entre 85,8% e 97,3%. Os valores de ANI dentro de isolados da mesma espécie são > 96, 43%, enquanto entre *Crithidia* e *Leishmania* foi de ~ 87%.

Embora não exista um valor limite de ANI estabelecido para a classificação dos tripanossomatídeos em níveis de espécie, os resultados de ANI observados sugerem que isolados de *Crithidia* sp. LVH60A representam uma espécie distinta, não pertencente à espécie *C. fasciculata*. No entanto, são necessárias análises genômicas populacionais adicionais para determinar se essas diferenças são devidas a variação dentro de uma espécie ou se realmente representam diferentes espécies.

A análise comparativa dos genomas de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* revelou uma notável conservação de 99% na sintonia entre eles e se entende em uma porcentagem menor para outras espécies da subfamília Leishmaniinae. Essa alta conservação é explicada em parte pela ausência de grandes regiões subteloméricas nos genomas dos tripanossomatídeos, o que resulta em um baixo número de genes específicos para cada espécie (PEACOCK et al., 2007). A heterogeneidade genética entre espécies de *Leishmania*, que por sua vez contribui para as diferentes manifestações clínicas da leishmaniose, pode ser atribuída à amplificação gênica e variação no número de cópias dos cromossomos (AIT MAATALLAH; AKARID; LEMRANI, 2022; ROGERS et al., 2011).

A estimativa de aneuploidia dos isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A, inferidos através da profundidade de mapeamento das *reads* por cromossomos mostraram resultados interessantes. Houve um aumento no número de cópias em 4 cromossomos quando comparados com *C. fasciculata* (Figura 22A). Estes cromossomos codificam proteínas relacionadas à resistência a fármacos, fatores de virulência e reguladores do ciclo celular. Entre estas proteínas estão quinases, amastina, GP63 e *tryparedoxin*, *acetylornithine deacetylase*, *Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain*, *ABC transporter*, *ornithine decarboxylase* e *fructose-1,6-bisphosphate aldolase*.

Quanto aos isolados LVH161 e LVH161a N1, isolados de diferentes tecidos (medula óssea e pele, respectivamente) apresentaram perfis de ploidia semelhantes (Figura 22B). A maioria dos cromossomos foram considerados diploides, com exceção do cromossomo 31. Dada a manifestação clínica diferente ocasionada pelo mesmo parasita (*L. infantum*), era esperado que estes isolados tivessem perfis diferentes no número de cópias dos cromossomos, como observado no estudo publicado por Zhang et al., (2014). Neste estudo, os pesquisadores realizaram análises de bioinformática proveniente do sequenciamento do genoma completo de cepas de *L. donovani* isoladas de pacientes com LC e LV. A análise do genoma correlacionou diversas variações genéticas com a diferença no tropismo, incluindo variação no número de cópias dos cromossomos e polimorfismos.

A causa dos rearranjos cromossômicos geralmente envolve a quebra do DNA em dois locais distintos. Essas extremidades quebradas são posteriormente reunidas, resultando em

um novo rearranjo cromossômico. Embora algumas variações estruturais desempenhem um papel na diversidade de fenótipos e doenças, outras podem não ter efeitos fenotípicos (JILANI; HASPEL, 2021). Atualmente, métodos computacionais baseados em sequenciamento estão sendo usados para identificar variações estruturais e a realização de ensaios envolvendo PCR e hibridização fluorescente *in situ* são comumente usados para validar tais observações (JILANI; HASPEL, 2021).

Utilizando sequenciamento de *long reads*, um estudo publicado por Davey e colaboradores (2021) confirmou uma inversão e translocação entre dois cromossomos de *Angomonas deanei*, desconhecidas até o momento, através de PCR. Essa abordagem demonstrou eficácia na validação das características observadas na montagem do genoma (DAVEY et al., 2021).

Até o momento validamos dois arranjos observados no genoma LVH60A por PCR considerando *C. fasciculata* como referência: 1) Cromossomo 25: 0,90 Mb sintênico ao cromossomo 2 de *C. fasciculata* (0,53 Mb), fundido com um fragmento de 0,30 Mb do cromossomo 29 de *C. fasciculata* (2,19 Mb); 2) Cromossomo 12: duplicação e inversão parcial (0,04 Kb) do cromossomo 8 de *C. fasciculata* (Figuras 26 e 28). Estes eventos relacionados a rearranjos de cromossomos podem estar relacionados à especiação de espécies, conforme observado em *Leishmania* (BRITTO et al., 1998; SAMARAS; SPITHILL, 1987).

A capacidade dos parasitas de infectar e persistir no interior das células do sistema imunológico de seus hospedeiros mamíferos depende da interação entre as moléculas nas células de ambos os organismos, da habilidade de sobreviver no ambiente celular e da capacidade de suprimir ou escapar dos mecanismos de resposta do sistema imunológico de seus hospedeiros (BIFELD; CLOS, 2015).

De modo geral, os resultados das infecções *in vitro* sugerem que as cepas *Crithidia* sp. LVH60A apresentam maior capacidade de infectividade em comparação a *C. fasciculata* TCC039E, resultando em maior porcentagem de infecção e carga parasitária em todos os tempos avaliados (Tabelas 8 e 16). Ainda, infecções realizadas com BMDM e PBMC, mostraram uma melhor sensibilidade de macrófagos recém diferenciados, quando comparados com as infecções utilizando linhagens celulares de camundongos (J774) e humana (THP-1) (Figuras 14, 15 e 17), corroborando que as células primárias podem ser biologicamente mais adequadas para uso em ensaios de infecção do que células de linhagem (PROMOCELL, 2019).

Os resultados deste estudo mostraram semelhanças com as descobertas de Ghobakhloo e colaboradores (2019), que investigaram isolados *Crithidia* sp. obtidos de lesões de leishmaniose cutânea de pacientes imunocompetentes co-infectados com *L. major*. Os autores demonstraram que isolados *Crithidia* sp. foram capazes de infectar macrófagos J774 e THP-1 em um período de 72 horas. No entanto, é importante notar que o controle com *C.*

*fasciculata* utilizado pelo grupo, também não foi capaz de infectar as diferentes linhagens de macrófagos testadas (GHOBAKHLOO et al., 2019). Estes isolados clínicos *Crithidia* spp. apresentaram formas mais graves e crônicas da doença em comparação com casos infectados apenas por *Leishmania* spp., o mesmo observado neste estudo e em Maruyama et al., 2019.

Já o estudo realizado por Kraeva et al., 2015 utilizando isolados de *Leptomonas seymouri*, obtidos de dois pacientes com LV co-infectados com *L. donovani*, não foram capazes de infectar macrófagos das linhagens celulares J774 e BMDM. Importante ressaltar que, até o momento, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura contendo informações sobre infecções in vitro com a espécie *C. fasciculata* utilizando macrófagos de cultura primária (camundongo e/ou humano).

Uma hipótese para esse fenótipo observado em ambos os casos é que estes parasitas, originalmente não patogênicos, tenham desenvolvido adaptações biológicas e habilidades para sobreviver em hospedeiros vertebrados. No entanto, a obtenção de evidências conclusivas que confirmem *Crithidia* sp. como agente patogênico demandará análises experimentais e clínicas mais abrangentes (GHOBAKHLOO et al., 2019).

Diversas proteínas relacionadas a fatores de virulência foram identificadas no genoma de *Crithidia* sp. LVH60A (Tabela 12). Dentre elas, destacam-se a *14-3-3 protein-like protein*. Esta proteína com propriedades anti-apoptótica já foi associada ao processo de prolongamento da vida da célula hospedeira infectada (DA FONSECA PIRES et al., 2014).

A proteína KMP-1, identificada no genoma de *Crithidia* sp. LVH60A atua como um fator de virulência em infecções por *Leishmania*. Um estudo envolvendo infecção de macrófagos murinos com *L. amazonensis* com e sem a proteína recombinante KMP-11, identificou esta proteína exacerba a infecção em macrófagos através do aumento da secreção de interleucina 10 e a atividade da arginase, ao mesmo tempo que reduz a produção de óxido nítrico (LACERDA et al., 2012). Além disso, o uso de anticorpos anti-KMP-11 inibiu o aumento da carga parasitária, sugerindo que a KMP-11 desempenha um papel na sobrevivência e proliferação do parasita (DA FONSECA PIRES et al., 2014; LACERDA et al., 2012). Além disso, o aumento da expressão de KMP-11 foi associado à melhoria da eficiência da interação parasita-hospedeiro e ao aumento da sobrevivência do parasita, o que pode contribuir para a virulência (DA FONSECA PIRES et al., 2014).

Outro gene identificado no genoma de *Crithidia* sp. LVH60A foi o *Lpg2*. Esta molécula pode participar da resistência ao ataque do sistema complemento, adesão e absorção de macrófagos, proteção contra produtos tóxicos gerados pelos macrófagos, visto que mutantes deficientes em *LPG* (*lpg2*) são incapazes de estabelecer infecções bem-sucedidas em camundongos ou flebotomíneos (MCCONVILLE; HOMANS, 1992; SACKS et al., 2000).

Ademais, também foram identificadas três sequências que codificam a proteína GP63. Esta protease é considerada um importante fator de virulência, contribuindo para a sobrevivência de *Leishmania* spp. durante o momento inicial da infecção, degradando rapidamente em uma ampla gama de substratos de células hospedeiras envolvidas nas vias de sinalização celular e regulação funcional (OLIVIER et al., 2012).

Além destes experimentos, realizamos análises de *dual-RNAseq* em macrófagos U937 infectados com parasitas *Crithidia* sp. LVH60A, isolados de paciente com leishmaniose visceral, isolados clínicos de *L. infantum*, *L. major* e *C. fasciculata* como controle negativo de infecção. Estes resultados ainda estão sob análise para avaliar as respostas específicas em relação aos protozoários, bem como as respostas relacionadas ao desenvolvimento da leishmaniose visceral. Resultados preliminares indicam que os parasitas, independentemente da espécie, não pareceram ter um impacto considerável no perfil transcricional dos macrófagos hospedeiros, em nosso contexto de infecção *in vitro* (Figuras 33 e 35). O número transcritos diferencialmente expressos detectados em nosso estudo tendeu a ser menor do que aqueles relatados anteriormente (DILLON et al., 2015; FERNANDES et al., 2016).

A análise da similaridade do perfil transcricional entre amostras no contexto de infecção *in vitro* mostrou agrupamentos distintos entre as espécies de *Leishmania* e *Crithidia* (Figura 34). Todavia, conseguimos identificar transcritos comuns modulados diferencialmente em *Leishmania* sp. e *Crithidia* sp. em comparação com *C. fasciculata* (Figura 37). Entre esses transcritos, a maioria codifica proteínas de função desconhecida. Entretanto, é relevante notar que genes que codificam proteínas classificadas como componentes cruciais da maquinaria de síntese proteica foram positivamente regulados 4 horas após a infecção, sugerindo uma adaptação do parasita ao ambiente intracelular, tal como diferenciação e/ou replicação. Dentre estes transcritos diferencialmente expressos destacam-se os genes HSPs, *prefoldina*, *ornithine decarboxylase*, *tryparedoxin peroxidase*, e *elongation factor 1-alpha*.

Dentre estes, destacam-se os genes *HSPs*, *prefoldin*, *ornithine decarboxylase*, *tryparedoxin peroxidase*, e *elongation factor 1-alpha*, todos regulados positivamente em 4 horas após a infecção. Os genes comuns regulados positivamente (*prefoldin subunit 3* e *elongation factor 1-alpha*), codificam mediadores de resposta a tolerância ao estresse oxidativo, diferenciação celular, resistência, virulência e imunogenicidade (CODONHO et al., 2016; KALESH et al., 2021; PRASANNA; UPADHYAY, 2021; VAINBERG et al., 1998).

Ademais, as HSPs (HSP70, HSP83-1, HSP83) desempenham diversas funções, incluindo a montagem, dobramento e translocação de outras proteínas (BROCHU; HALMEUR; OUELLETTE, 2004). Estas proteínas estão associadas ao início e à duração da tolerância à temperatura, uma vez que os parasitas sofrem mudança em sua morfologia durante a infecção em mamíferos (MAYER; BUKAU, 2005). Esta proteína também auxilia na proteção do parasita contra o estresse oxidativo da célula do hospedeiro, uma vez que durante

a infecção, a célula hospedeira produz uma grande quantidade de intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico, criando ambientes desfavoráveis para patógenos intracelulares (IYER et al., 2008; ROMAO et al., 2009; SILVERMAN et al., 2010).

Um estudo transcriptômico recente conduzido por Filosa et al. (2019) investigou as diferenças moleculares e celulares de células coanomastigotas livres e aderentes cultivadas *in vitro*, assim como a análise de *dual RNA-seq* de mosquitos *Aedes aegypti* infectados com *C. fasciculata*. As análises comparativas revelaram uma resposta do mosquito aos parasitas, embora tenha sido observado um baixo número de genes regulados diferencialmente após a infecção por *C. fasciculata*. Já o perfil de expressão de *C. fasciculata*, tanto em culturas *in vitro* quanto *in vivo*, sugere que as formas aderentes possam estar mais bem adaptadas para sobreviver e proliferar no hospedeiro do mosquito, enquanto as formas livres podem ser mais propícias para a dispersão e sobrevivência enquanto aguardam a oportunidade de infectar outros mosquitos.

Apesar de existir estudos utilizando abordagens transcriptômicas envolvendo parasitas monoxênicos, até o momento, não temos conhecimento de estudos usando o transcriptoma que avaliem a infecção *in vitro* de parasitas tripanossomatídeos monoxênicos *versus* dixênicos. Esperamos que análises mais profundas destes resultados possam fornecer *insights* que contribuirão para a compreensão da interação parasita-hospedeiro durante a infecção desses tripanossomatídeos.

## **CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

Os isolados clínicos *Crithidia* sp. LVH60A demonstraram a capacidade de se multiplicar a uma temperatura de 35 °C, um atributo que pode ser fundamental para sua adaptação a um estilo de vida dixênico. Esses parasitas também exibiram a capacidade de infectar diversas linhagens de macrófagos, um passo crucial para sua adaptação ao ambiente intracelular, característico desse tipo de parasitismo.

Além disso, em nosso contexto, a infecção por diferentes cepas de parasitas não parece alterar significativamente o perfil transcricional dos genes de macrófagos. No entanto, é importante destacar que existe uma diferença no perfil transcricional compartilhado entre *Leishmania* sp. e *Crithidia* sp. LVH60A. Entre os genes diferencialmente expressos em comum, encontram-se mediadores da resposta ao estresse e fatores de virulência, que desempenham um papel crucial na adaptação ao ambiente intracelular.

Os resultados de genômica comparativa indicaram que parasitas *Crithidia* sp. LVH60A constituem uma espécie distinta de *C. fasciculata*. No entanto, é fundamental ressaltar que, embora essas descobertas sejam promissoras, análises genômicas populacionais mais abrangentes são essenciais para uma avaliação mais completa e definitiva sobre se as discrepâncias observadas refletem variações dentro de uma única espécie ou se, de fato, representam diferentes espécies. Essa investigação mais aprofundada é crucial para a compreensão da diversidade genética e da taxonomia desses tripanossomatídeos, contribuindo para um conhecimento mais amplo de sua evolução e biologia.

Concluindo, este trabalho abre uma série de rotas para investigação mais aprofundada sobre o isolamento de parasitos *Crithidia* em pacientes com leishmaniose visceral e seu impacto na epidemiologia e implicações clínicas da doença.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIT MAATALLAH, I.; AKARID, K.; LEMRANI, M. Tissue tropism: Is it an intrinsic characteristic of *Leishmania* species? **Acta Tropica**, v. 232, p. 106512, 1 ago. 2022.
- ALCOLEA, P. J. et al. An Insight into the Proteome of *Crithidia fasciculata* Choanoflagellates as a Comparative Approach to Axenic Growth, Peanut Lectin Agglutination and Differentiation of *Leishmania* spp. Promastigotes. **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, p. e113837, de dez de 2014.
- BHOR, R.; RAFATI, S.; PAI, K. Cytokine saga in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, Cytokines in Parasitic Infections, Pathogenesis and Immunity: Metachromatic display of cytokine functions - Part 2. v. 147, p. 155322, 1 nov. 2021.
- BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 204, n. 6, p. 619–634, 1 dez. 2015.
- BOITZ, J. M. et al. *Leishmania donovani* Ornithine Decarboxylase Is Indispensable for Parasite Survival in the Mammalian Host. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 756–763, fev. 2009.
- BORGES, M. S. et al. Factors associated with the expansion of leishmaniasis in urban areas: a systematic and bibliometric review (1959–2021). **Journal of Public Health Research**, v. 11, n. 3, p. 22799036221115775, 1 jul. 2022.
- BORGHESAN, T. C. et al. Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies. **Protist**, v. 164, n. 1, p. 129–152, jan. 2013.
- BOUCINHA, C. et al. A Stroll Through the History of Monoxenous Trypanosomatids Infection in Vertebrate Hosts. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, 2022.
- 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.
- BROCHU, C.; HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, n. 3, p. 294–303, jul. 2004.
- BROCHU, C.; HALMEUR, A.; OUELLETTE, M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 9, n. 3, p. 294–303, 2004.
- BROOKER, B. E. The fine structure of *Crithidia fasciculata* with special reference to the organelles involved in the ingestion and digestion of protein. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 116, n. 4, p. 532–563, 1971.
- CANTACESSI, C. et al. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 100–108, 1 mar. 2015.
- CARVER, T. J. et al. ACT: the Artemis comparison tool. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3422–3423, 15 ago. 2005.

- CASTRO, H. et al. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1552–1562, 1 dez. 2002.
- CHEN, Y. et al. edgeR: differential analysis of sequence read count data User's Guide. 2008.
- CINGOLANI, P. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w11118; iso-2; iso-3. **Fly**, v. 6, n. 2, p. 80–92, 2012.
- CIUFO, S. et al. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 2386–2392, jul. 2018.
- CODONHO, B. S. et al. HSP70 of *Leishmania amazonensis* alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 7, p. 460–468, jul. 2016.
- COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, abr. 2022.
- CRUZ, A. K.; FREITAS-CASTRO, F. Genome and transcriptome analyses of *Leishmania* spp.: opening Pandora's box. **Current Opinion in Microbiology**, Host Microbe Interactions: Fungi • Host-Microbe Interactions: Parasitology. v. 52, p. 64–69, 1 dez. 2019.
- DA FONSECA PIRES, S. et al. Identification of Virulence Factors in *Leishmania infantum* Strains by a Proteomic Approach. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 1860–1872, 4 abr. 2014.
- DAGA, M. K.; ROHATGI, I.; MISHRA, R. Leishmaniasis. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 25, n. S2, p. S166–S170, 1 maio 2021.
- DAMASCENO, J. D. et al. Read, Write, Adapt: Challenges and Opportunities during Kinetoplastid Genome Replication. **Trends in Genetics**, Microbial Genetics: Stress Management. v. 37, n. 1, p. 21–34, 1 jan. 2021.
- DAS, A.; BANDAY, M.; BELLOFATTO, V. RNA Polymerase Transcription Machinery in Trypanosomes. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 3, p. 429–434, mar. 2008.
- DAVEY, J. W. et al. Chromosomal assembly of the nuclear genome of the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Angomonas deanei*. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 11, n. 1, p. jkaa018, 1 jan. 2021.
- DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 31, 17 jun. 2015.
- DILLON, L. A. L. et al. Simultaneous transcriptional profiling of *Leishmania major* and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1108, 29 dez. 2015.
- DONG, G.; FILHO, A. L.; OLIVIER, M. Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite *Leishmania*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 2019.

- DOUANNE, N. et al. Leishmania parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles. **Cell Reports**, v. 40, n. 3, p. 111121, 19 jul. 2022.
- DUCHÊNE, D. A. Phylogenomics. **Current Biology**, v. 31, n. 19, p. R1177–R1181, 11 out. 2021.
- FERNANDES, M. C. et al. Dual Transcriptome Profiling of Leishmania-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. **mBio**, v. 7, n. 3, p. e00027-16, 10 maio 2016.
- 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. doi:10.1016/j.ijpara.2020.06.013, nov. 2020.
- FILOSA, J. N. et al. Dramatic changes in gene expression in different forms of Crithidia fasciculata reveal potential mechanisms for insect-specific adhesion in kinetoplastid parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007570, 29 jul. 2019.
- FORRESTER, S. et al. Tissue Specific Dual RNA-Seq Defines Host–Parasite Interplay in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by Leishmania donovani and Leishmania infantum. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e00679-22, 6 abr. 2022.
- FROLOV, A. O.; KOSTYGOV, A. Y.; YURCHENKO, V. Development of Monoxenous Trypanosomatids and Phytomonads in Insects. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 538–551, 1 jun. 2021.
- GALILI, T. et al. heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. **Bioinformatics**, v. 34, n. 9, p. 1600–1602, 1 maio 2018.
- GÁLVEZ, R. et al. Latest trends in Leishmania infantum infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 204, 21 abr. 2020.
- GARRISON, E.; MARTH, G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. p. 1–9, 2012.
- GHOBAKHLOO, N. et al. Isolation of Crithidia spp. from lesions of immunocompetent patients with suspected cutaneous leishmaniasis in Iran. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 1, p. 116–126, 2019.
- GHOSH, S. et al. Coinfection of Leptomonas seymouri and Leishmania donovani in Indian Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2774–2778, 2012.
- GLUENZ, E. et al. Chapter 24 - Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of Trypanosoma brucei and Leishmania mexicana flagella. Em: BASTO, R.; MARSHALL, W. F. (Eds.). **Methods in Cell Biology**. Methods in Cilia & Flagella. [s.l.] Academic Press, 2015. v. 127p. 509–542.
- GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473–479, 2010.
- GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, jul. 2011.

- IMAMURA, H.; DUJARDIN, J.-C. A Guide to Next Generation Sequence Analysis of Leishmania Genomes. Em: CLOS, J. (Ed.). **Leishmania**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2019. v. 1971p. 69–94.
- ISHEMGULOVA, A. et al. Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0174165, 22 mar. 2017.
- IYER, J. P. et al. Crucial role of cytosolic trypanedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 372–391, 2008.
- JARDIM, A. et al. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. **Biochemical Journal**, v. 305, n. 1, p. 307–313, 1995.
- JASKOWSKA, E. et al. Phytomonas: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004484, 21 jan. 2015.
- JILANI, M.; HASPEL, N. Computational Methods for Detecting Large-Scale Structural Rearrangements in Chromosomes. **Exon Publications**, p. 37–51, 20 mar. 2021.
- JOHNSON, M. et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl\_2, p. W5–W9, 1 jul. 2008.
- JOSHI; FASS. **Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)**. , 2011. Disponível em: <<https://github.com/najoshi/sickle>>
- KALESH, K. et al. Quantitative Proteomics Reveals that Hsp90 Inhibition Dynamically Regulates Global Protein Synthesis in *Leishmania mexicana*. **mSystems**, v. 6, n. 3, p. e00089-21, 11 maio 2021.
- KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, 8 jun. 2017.
- KRAEVA, N. et al. *Leptomonas seymouri*: Adaptations to the Dikinetid Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with *Leishmania donovani*. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 8, p. e1005127, de ago de 2015.
- KRUEGER, F. **Trim Galore**. , 7 mar. 2023. Disponível em: <<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>>. Acesso em: 9 mar. 2023
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018.
- KUSEL, J. P.; MOORE, T K. E.; WEBER, M. M. The Ultrastructure of *Crithidia fasciculata* and Morphological Changes Induced by Growth in Acriflavin. **J. PROTOZO**, v. 14, n. 2, p. 298–298, 1967.
- LACERDA, D. I. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 238–245, mar. 2012.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, abr. 2012.

- LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 4 ago. 2011.
- LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 15 ago. 2009.
- LI, H. **lh3/seqtk**, 9 mar. 2023. Disponível em: <<https://github.com/lh3/seqtk>>. Acesso em: 9 mar. 2023
- LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 25, n. 14, p. 1754–1760, 2009.
- LI, W.; GODZIK, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics**, v. 22, n. 13, p. 1658–1659, 1 jul. 2006.
- LUKEŠ, J. et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Special Issue on the 35th Anniversary of Molecular and Biochemical Parasitology. v. 195, n. 2, p. 115–122, 1 jul. 2014.
- LYPACZEWSKI, P. et al. A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16549, 8 nov. 2018.
- MARÇAIS, G. et al. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. **PLOS Computational Biology**, v. 14, n. 1, p. e1005944. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005944, 26 jan. 2018.
- MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 44–51, 1 jul. 2014.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10–12, 2 maio 2011.
- MARUYAMA, S. R. et al. Non-*Leishmania* Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil. v. 25, p. 2088– 2092. doi:10.3201/eid2511.181548, 2019.
- MARUYAMA, S. R. et al. Total Ortholog Median Matrix as an alternative unsupervised approach for phylogenomics based on evolutionary distance between protein coding genes. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3791. doi:10.1038/s41598-021-81926-w, 15 fev. 2021.
- MASLOV, D. A. et al. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**, v. 146, n. 1, p. 1–27, 2018.
- MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670–684, 2005.
- MCCALL, L.-I.; MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 518–530, 2010.

- MCCONVILLE, M. J.; HOMANS, S. W. Identification of the defect in lipophosphoglycan biosynthesis in a non-pathogenic strain of *Leishmania major*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 5855–5861, 1992.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 5 jun. 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022>>. Acesso em: 1 ago. 2023.
- MUKHERJEE, A. et al. Role of ABC transporter MRPA,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 204–211, 1 fev. 2007.
- MÜLLNER, D. fastcluster: Fast Hierarchical, Agglomerative Clustering Routines for R and Python. **Journal of Statistical Software**, v. 53, p. 1–18, 29 maio 2013.
- NOYES, H. A. et al. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2877–2881, out. 1998.
- OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.
- PATANÉ, J. S. L.; MARTINS, J.; SETUBAL, J. C. Phylogenomics. Em: SETUBAL, J. C.; STOYE, J.; STADLER, P. F. (Eds.). **Comparative Genomics: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2018. p. 103–187.
- PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–847, jul. 2007.
- PISANI, D. et al. Phylogenomics: Is less more when using large-scale datasets? **Current Biology**, v. 32, n. 24, p. R1340–R1342, 19 dez. 2022.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, dez. de 2017.
- PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516–521, 1 mar. 2022.
- PRASANNA, P.; UPADHYAY, A. Heat Shock Proteins as the Druggable Targets in Leishmaniasis: Promises and Perils. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 2, p. 10.1128/iai.00559-20, 19 jan. 2021.
- PRJIBELSKI, A. et al. Using SPAdes De Novo Assembler. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 70, n. 1, p. e102, 2020.
- PROMOCELL. **Human primary cells and immortal cell lines: differences and advantages**. Disponível em: <<https://promocell.com/in-the-lab/human-primary-cells-and-immortal-cell-lines/>>. Acesso em: 30 set. 2023.

- RIBEIRO, C. J. N. et al. Space-time risk cluster of visceral leishmaniasis in Brazilian endemic region with high social vulnerability: An ecological time series study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. e0009006, 19 jan. 2021.
- RICHTER, M. et al. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929–931, 15 mar. 2016.
- RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, dez. 2016.
- RODRIGUEZ, A. E. et al. Leishmania. Em: **Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets**. Cham: Springer International Publishing, 2018a. p. 289–311.
- RODRIGUEZ, A. E. et al. Leishmania. **Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets**, p. 1–438, 2018b.
- RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. **The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes**. [s.l.] PeerJ Inc., 27 mar. 2016. Disponível em: <<https://peerj.com/preprints/1900>>. Acesso em: 27 jan. 2023.
- ROGERIO, L. A. et al. Co-infection of Leishmania infantum and a Crithidia-related species in a case of refractory relapsed visceral leishmaniasis with non-ulcerated cutaneous manifestation in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 133, p. 85–88, 1 ago. 2023.
- ROGERS, M. et al. Proteophosphoglycans Regurgitated by Leishmania-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000555, de ago. de 2009.
- ROGERS, M. 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, 2011.
- ROITMAN, I. et al. Growth of Crithidia at High Temperature: Crithidia hutneri sp. n. and Crithidia luciliae thermophila s. sp. n.\*. **The Journal of Protozoology**, v. 24, n. 4, p. 553–556, nov. 1977.
- ROMAO, S. et al. The cytosolic trypanothione of Leishmania infantum is essential for parasite survival. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 6, p. 703–711, 2009.
- ROTH, V. **Doubling Time Computing**. Disponível em: <<http://www.doubling-time.com/compute.php>>. Acesso em: 14 ago. 2023.
- SACKS, D. L. et al. The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 1, p. 406–411, 2000.
- SALLOUM, T.; TOKAJIAN, S.; HIRT, R. P. Advances in Understanding Leishmania Pathobiology: What Does RNA-Seq Tell Us? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2021.
- SAMARAS, N.; SPITHILL, T. W. Molecular karyotype of five species of Leishmania and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 279–291, 1 out. 1987.

- SCARPINI, S. et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, out. 2022.
- SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. Leishmania infantum. **Trends Parasitol.**, v. 36, n. 1, p. 80- 81. doi:10.1016/j.pt.2019.10.006, 1 jan. 2020.
- SHEN, W. et al. SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0163962, de out de 2016.
- SILVERMAN, J. M. et al. Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. **Genome Biology**, v. 9, n. 2, p. R35, 18 fev. 2008.
- SILVERMAN, J. M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 6, p. 842–852, 2010.
- SIMPSON, J. T. et al. ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. **Genome Research**, v. 19, n. 6, p. 1117–1123, 1 jun. 2009.
- SINGH, N.; CHIKARA, S.; SUNDAR, S. SOLiD™ Sequencing of Genomes of Clinical Isolates of Leishmania donovani from India Confirm Leptomonas Co-Infection and Raise Some Key Questions. **PLOS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55738, de fev de 2013.
- SONGUMPAL, N. et al. First Evidence of Co-Circulation of Emerging Leishmania martiniquensis, Leishmania orientalis, and Crithidia sp. in Culicoides Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae), the Putative Vectors for Autochthonous Transmission in Southern Thailand. **Trop Med Infect Dis**, v. 7, n. 11, p. 379. doi:10.3390/tropicalmed7110379, nov. 2022.
- SRIVASTAVA, P. et al. Detection of Leptomonas sp. parasites in clinical isolates of Kala-azar patients from India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 1145–1150, 1 out. 2010.
- STEINBISS, S. et al. Companion: a web server for annotation and analysis of parasite genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W29–W34, 8 jul. 2016.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 fev. 2017.
- SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics**, v. 22, n. 12, p. 1540–1542, 15 jun. 2006.
- TAKAHASHI, T. **Triagem de isolados clínicos de Leishmania sp. para sequenciamento genômico**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 22 jun. 2020.
- TAKAMIYA, N. T. et al. Parasite Detection in Visceral Leishmaniasis Samples by Dye-Based qPCR Using New Gene Targets of Leishmania infantum and Crithidia. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 8, p. 405, ago. 2023.
- TANURE, A. et al. Diversity of phlebotomine sand flies and molecular detection of trypanosomatids in Brumadinho, Minas Gerais, Brazil. **PLOS ONE**, v. 15, n. 6, p. e0234445, 24 jun. 2020.



- 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, p. 655–665, 1 set. 2017.
- THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 253–272, jun. 2020.
- TORRECILHAS, A. C. et al. Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: Host Cell Communication. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.
- VAINBERG, I. E. et al. Prefoldin, a Chaperone that Delivers Unfolded Proteins to Cytosolic Chaperonin. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 863–873, 29 maio 1998.
- VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Tropical Diseases. v. 26, n. 2, p. 309–322, 1 jun. 2012.
- VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, Updates in Tropical Medicine. v. 33, n. 1, p. 79–99, 1 mar. 2019.
- VOTÝPKA, J. et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460–469, 1 out. 2015.
- VOTÝPKA, J.; RAY, D. S.; LUKES, J. *Crithidia fasciculata*: A Test For Genetic Exchange. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 104–107, 1 out. 2001.
- WALL, D. P.; DELUCA, T. Ortholog Detection Using the Reciprocal Smallest Distance Algorithm. Em: BERGMAN, N. H. (Ed.). **Comparative Genomics**. Methods In Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. p. 95–110.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 124–193, 1 fev. 1966.
- WANG, J. et al. Total RNA sequencing of *Phlebotomus chinensis* sandflies in China revealed viral, bacterial, and eukaryotic microbes potentially pathogenic to humans. **Emerg Microbes Infect**, v. 11, n. 1, p. 2080–2092. doi:10.1080/22221751.2022.2109516, 31 dez. 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>.
- YURCHENKO, V. Y. et al. Morphological Discordance of the New Trypanosomatid Species Phylogenetically Associated with the Genus *Crithidia*. **Protist**, v. 159, n. 1, p. 99–114, 2008.
- ZAMBONI, D. S.; RABINOVITCH, M. Nitric Oxide Partially Controls *Coxiella burnetii* Phase II Infection in Mouse Primary Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1225–1233, mar. 2003.
- ZHANG, W. W. et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35508–35515, 2003.

ZHANG, W. W. et al. Genetic Analysis of *Leishmania donovani* Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004244, 3 jul. 2014.

***APÊNDICE***

## 8 APÊNDICE

**Tabela 1.** Informações gerais dos isolados clínicos

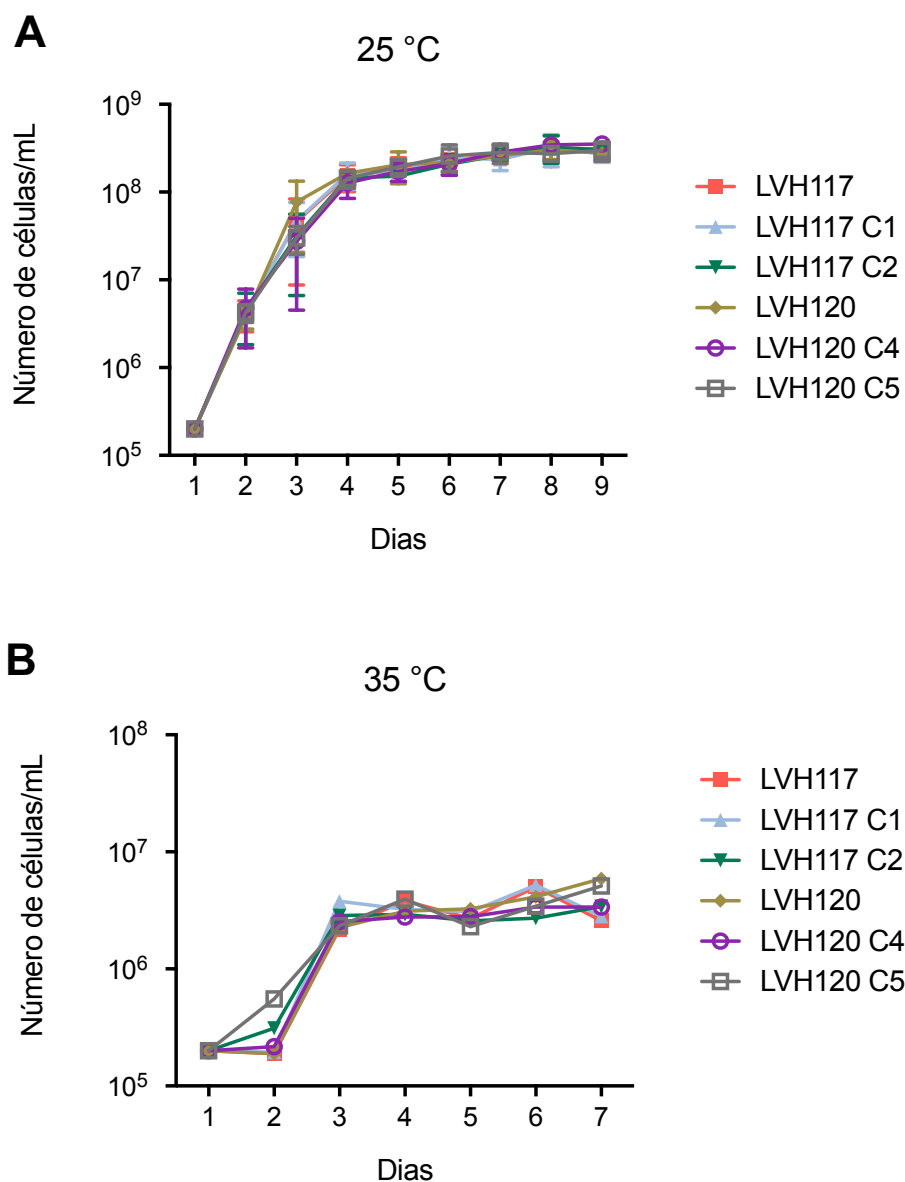
Isolado clínico	Espécie	Clonado de	Tecido	Data de isolamento	Experimentos realizados
LVH117	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	-	Medula óssea	Março 2017	Proliferação celular; Detecção e quantificação da carga parasitária; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes.
LVH117 Clone 1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	LVH117	Medula óssea	Dezembro 2018	Proliferação celular; Microscopia de luz; Microscopia eletrônica de varredura; Microscopia eletrônica de transmissão; Ensaio de infecção <i>in vitro</i> ; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise filogenômica; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes; Experimento de <i>Dual RNA-seq</i> .
LVH117 Clone 2	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	LVH117	Medula óssea	Dezembro 2018	Proliferação celular; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes.
LVH120	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	-	Baço	Mai 2017	Proliferação celular; Análise filogenética de sequências de SSU; Detecção e

					quantificação da carga parasitária; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes.
LVH120 Clone 4	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	LVH120	Baço	Dezembro 2018	Proliferação celular; Microscopia de luz; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise filogenômica; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes; Experimento de <i>Dual</i> RNA-seq.
LVH120 Clone 5	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	LVH120	Baço	Dezembro 2018	Proliferação celular; Microscopia de varredura; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes.
LVH161	<i>Leishmania infantum</i>	-	Medula óssea	Janeiro 2020	Proliferação celular; Microscopia de luz; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise filogenômica; Análise de detecção e anotação de variantes; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia).
LVH161 Clone 6	<i>Leishmania infantum</i>	LVH161	Medula óssea	Março 2020	Proliferação celular; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes.
LVH161 E1	<i>Leishmania infantum</i>	LVH161	Medula óssea	Setembro 2022	Experimento de <i>Dual</i> RNA-seq.

LVH161a	<i>Leishmania infantum</i>	-	Pele	Janeiro 2020	Proliferação celular; Microscopia de luz; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise filogenômica; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Análise de detecção e anotação de variantes.
LVH161a D6	<i>Leishmania infantum</i>	LVH161a	Pele	Setembro 2022	Experimento de <i>Dual</i> RNA-seq.
LVH60	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	-	Medula óssea	2011	Análise filogenômica;
LVH60 C3	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	LVH60A	Medula óssea	Dezembro 2018	Microscopia de varredura; Análise filogenética de sequências de SSU; Experimento de <i>Dual</i> RNA-seq.
LVH60a	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	-	Pele	2012	Análise filogenômica;
LVH60a C1	<i>Crithidia</i> sp. LVH60A	LVH60A	Pele	Dezembro 2018	Proliferação celular; Microscopia de varredura; Análise morfométrica; Microscopia eletrônica de transmissão; Ensaio de infecção <i>in vitro</i> ; Análise filogenética de sequências de SSU; Análise filogenômica; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Ensaio de PCR para validação de rearranjos cromossômicos; Experimento de <i>Dual</i> RNA-seq.
TCC039E	<i>Crithidia fasciculata</i>	-	Inseto	-	Proliferação celular; Microscopia de luz; Microscopia de varredura; Análise morfométrica; Microscopia eletrônica de transmissão; Ensaio de infecção <i>in vitro</i> ; Análise filogenômica; Análise da Identidade Média de Nucleotídeos e mapeamento; Análise da estimativa do número de cópias cromossômicas (somia); Ensaio de PCR

					para validação de rearranjos cromossômicos.
TCC039E G1	<i>Crithidia fasciculata</i>	TCC039E	Inseto	Setembro 2022	Experimento de <i>Dual RNA-seq</i> .
HUUFS14	<i>Leishmania infantum</i>	-	Medula óssea	2009	Proliferação celular; Microscopia de luz; Microscopia de varredura; Ensaio de infecção <i>in vitro</i> .
PP75	<i>Leishmania infantum</i>	-	Medula óssea	1974	Proliferação celular; Microscopia de luz; Microscopia de varredura; Análise morfométrica; Microscopia eletrônica de transmissão; Ensaio de infecção <i>in vitro</i>
IRAQ	<i>Leishmania major</i>	-	Pele	-	Experimento de <i>Dual RNA-seq</i> .

**Figura 1.** Curvas de crescimento celular de parasitos *in vitro*.



(A) Curva de crescimento celular a 25 °C. Houve diferença estatística entre os dias 1 e 4 de crescimento dentro de cada amostra ( $p < 0,0001$ ); (B) Curva de crescimento celular a 35 °C. Houve diferença estatística entre os dias 1 e 3 de crescimento dentro de cada amostra ( $p < 0,001$ ). As células foram contadas em câmara de Neubauer e microscópio de luz diariamente, em que a concentração inicial de parasitos na cultura foi de  $2 \times 10^5$  células/mL. As contagens foram realizadas em triplicata em três experimentos independentes.



Tabela 2. Resumo de qualidade das *reads* sequenciadas

Amostra	Cepa	Horas após infecção	Número total de reads	Dados brutos (Gb)	Reads mantidas após a filtragem (%)	Q20(%)	GC(%)
B1_04	LVH60 C3	4	87612768	13.1	94.52	96.76	52.25
B2_04	LVH60a C1	4	86490802	13.0	98.48	98.11	54.04
B3_04	LVH117 C1	4	88999438	13.3	93.05	96.51	51.65
B4_04	LVH120 C4	4	99329550	14.9	96.27	96.86	51.55
B5_04	LVH161 E1	4	87741722	13.2	96.52	96.36	53.33
B6_04	LVH161a D6	4	83898744	12.6	96.92	96.32	53.91
B7_04	<i>L. infantum</i>	4	89484212	13.4	95.07	96.26	55.61
B8_04	<i>L. major</i>	4	87475286	13.1	94.61	96.41	53.38
B9_04	TCC039E	4	88110216	13.2	96.22	96.46	52.31
B10_04	Macrófago*	4	84687768	12.7	94.45	96.58	51.71
C1_04	LVH60 C3	4	105334030	15.8	96.72	97.53	54.12
C2_04	LVH60a C1	4	91324884	13.7	95.81	97.39	53.71
C3_04	LVH117 C1	4	80677644	12.1	94.83	97.57	53.47
C4_04	LVH120 C4	4	99142734	14.9	94.11	97.68	52.65
C5_04	LVH161 E1	4	90777396	13.6	95.15	97.64	51.80
C6_04	LVH161a D6	4	92759508	13.9	95.53	96.99	52.59
C7_04	<i>L. infantum</i>	4	85602162	12.8	95.78	97.64	52.61
C8_04	<i>L. major</i>	4	100486120	15.1	95.11	97.60	52.90
C9_04	TCC039E	4	90850000	13.6	96.18	97.47	53.00
C10_04	Macrófago*	4	136494134	20.5	95.85	97.37	52.43
D1_04	LVH60 C3	4	82359370	12.4	96.60	97.03	52.78
D2_04	LVH60a C1	4	90007380	13.5	95.99	96.91	52.58
D3_04	LVH117 C1	4	97323712	14.6	97.28	96.83	51.12
D4_04	LVH120 C4	4	103302920	15.5	97.92	97.47	51.77
D5_04	LVH161 E1	4	93879710	14.1	97.25	96.53	52.03
D6_04	LVH161a D6	4	84454992	12.7	97.84	96.42	51.15
D7_04	<i>L. infantum</i>	4	108504304	16.3	97.82	96.49	51.23
D8_04	<i>L. major</i>	4	105787346	15.9	98.10	96.76	52.51
D9_04	TCC039E	4	84387814	12.7	98.30	96.45	53.02
D10_04	Macrófago*	4	84721074	12.7	97.67	96.68	50.76
B1_24	LVH60 C3	24	91465636	13.7	96.07	97.61	53.33
B2_24	LVH60a C1	24	100362950	15.1	95.46	97.17	54.13
B3_24	LVH117 C1	24	93317306	14.0	95.82	97.61	53.47
B4_24	LVH120 C4	24	90909042	13.6	95.23	97.20	53.10
B5_24	LVH161 E1	24	91208994	13.7	95.91	97.57	52.99
B6_24	LVH161a D6	24	108990528	16.3	95.04	97.52	51.91
B7_24	<i>L. infantum</i>	24	103397396	15.5	96.15	97.53	52.92
B8_24	<i>L. major</i>	24	136390846	20.5	96.70	97.48	53.99
B9_24	TCC039E	24	108318350	16.2	98.70	97.67	53.13

B10_24	Macrófago*	24	79286314	11.9	96.46	97.49	52.74
C1_24	LVH60 C3	24	105059278	15.8	96.16	97.19	54.01
C2_24	LVH60a C1	24	91141952	13.7	95.21	97.46	52.57
C3_24	LVH117 C1	24	112702444	16.9	95.47	97.50	52.86
C4_24	LVH120 C4	24	81808446	12.3	96.08	97.48	53.21
C5_24	LVH161 E1	24	102698556	15.4	96.36	97.64	53.18
C6_24	LVH161a D6	24	85086466	12.8	95.76	97.54	52.95
C7_24	<i>L. infantum</i>	24	80010436	12.0	96.39	97.46	53.39
C8_24	<i>L. major</i>	24	91891856	13.8	95.75	97.50	53.84
C9_24	TCC039E	24	88566222	13.3	95.81	97.61	52.36
C10_24	Macrófago*	24	114936320	17.2	95.67	97.73	51.11
D1_24	LVH60 C3	24	85848166	12.9	97.55	96.58	50.87
D2_24	LVH60a C1	24	94167334	14.1	97.44	96.78	51.23
D3_24	LVH117 C1	24	117629342	17.6	96.23	96.67	51.21
D4_24	LVH120 C4	24	88177462	13.2	98.44	96.65	50.67
D5_24	LVH161 E1	24	93076928	14.0	98.29	96.71	51.64
D6_24	LVH161a D6	24	114149428	17.1	98.12	96.34	51.79
D7_24	<i>L. infantum</i>	24	125955560	18.9	98.50	96.49	52.41
D8_24	<i>L. major</i>	24	89738920	13.5	97.67	96.43	52.52
D9_24	TCC039E	24	80529456	12.1	98.09	96.34	52.53
D10_24	Macrófago*	24	123248570	18.5	98.88	96.65	51.20
B1_48	LVH60 C3	48	101809244	15.3	96.04	97.63	52.60
B2_48	LVH60a C1	48	148024022	22.2	95.56	97.50	52.44
B3_48	LVH117 C1	48	84956378	12.7	95.62	97.48	52.76
B4_48	LVH120 C4	48	85570202	12.8	95.23	97.69	52.28
B5_48	LVH161 E1	48	88943680	13.3	96.00	97.46	53.53
B6_48	LVH161a D6	48	84607532	12.7	96.23	97.38	53.53
B7_48	<i>L. infantum</i>	48	119843592	18.0	95.67	97.46	53.47
B8_48	<i>L. major</i>	48	81111060	12.2	94.43	97.47	52.69
B9_48	TCC039E	48	81345870	12.2	96.52	97.56	53.33
B10_48	Macrófago*	48	88181448	13.2	95.21	97.88	50.29
C1_48	LVH60 C3	48	86097468	12.9	95.36	97.50	53.16
C2_48	LVH60a C1	48	123578362	18.5	96.68	97.57	52.86
C3_48	LVH117 C1	48	87867294	13.2	96.01	97.60	53.00
C4_48	LVH120 C4	48	97647572	14.6	96.05	97.75	52.37
C5_48	LVH161 E1	48	92089604	13.8	94.69	97.60	52.10
C6_48	LVH161a D6	48	85772430	12.9	96.67	97.59	52.54
C7_48	<i>L. infantum</i>	48	129500696	19.4	96.73	97.01	53.85
C8_48	<i>L. major</i>	48	83800886	12.6	96.79	96.89	53.92
C9_48	TCC039E	48	88845884	13.3	96.60	96.92	53.50
C10_48	Macrófago*	48	80550528	12.1	96.37	97.18	52.36
D1_48	LVH60 C3	48	90641060	13.6	97.43	96.51	50.28
D2_48	LVH60a C1	48	94246150	14.1	98.45	96.65	51.02

D3_48	LVH117 C1	48	92704238	13.9	98.17	96.61	50.73
D4_48	LVH120 C4	48	86413366	13.0	98.24	96.53	50.90
D5_48	LVH161 E1	48	98694252	14.8	97.70	96.84	51.43
D6_48	LVH161a D6	48	85272480	12.8	98.68	96.26	51.27
D7_48	<i>L. infantum</i>	48	95888728	14.4	98.77	96.59	52.11
D8_48	<i>L. major</i>	48	92604058	13.9	98.72	96.08	53.37
D9_48	TCC039E	48	87834624	13.2	98.81	96.68	51.56
D10_48	Macrófago*	48	112668380	16.9	98.73	96.34	51.65

\* Macrófago não infectado; **Q20**: índice de qualidade de 20; **GC**: porcentagem de conteúdo de guanina e citocina presente nas sequências;