

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Modalidade: Licenciatura)**



MONOGRAFIA

**Caracterização e genômica comparativa de isolados de *Leishmania (Leishmania)*
infantum com diferentes perfis de resistência**

Aluno(a): Anna Clara Vieira Pinto

**SÃO LUÍS/MA
2026**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Modalidade: Licenciatura)**



MONOGRAFIA

**Caracterização e genômica comparativa de isolados de *Leishmania (Leishmania)*
infantum com diferentes perfis de resistência**

Orientada: Anna Clara Vieira Pinto

Orientador(a): Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima

Co-orientador: Dr. Tiago Rodrigues Ferreira

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

SÃO LUÍS/MA

2026

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Vieira Pinto, Anna Clara.

Caracterização e genômica comparativa de isolados de
Leishmania L. infantum com diferentes perfis de
resistência / Anna Clara Vieira Pinto. - 2026.
57 f.

Coorientador(a) 1: Tiago Rodrigues Ferreira.

Orientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas -
Licenciatura, Universidade Federal do Maranhão, São Luís -
Ma, 2026.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Resistência A Fármacos.
3. Bioinformática. I. Sousa Lima, Mayara Ingrid. II.
Rodrigues Ferreira, Tiago. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COORDENADORIA DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Modalidade: Licenciatura)

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANNA CLARA VIEIRA PINTO

**Caracterização e genômica comparativa de isolados de *Leishmania (Leishmania)*
infantum com diferentes perfis de resistência**

Banca examinadora

Profª. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima - Orientadora
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Dr. Tiago Rodrigues Ferreira - Coorientador
National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall Agnol – 1º Examinador
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Hivana Patricia Melo Barbosa Dall Agnol – 2ª Examinadora
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

*Dedico este trabalho a Jesus Cristo, meu
Senhor, e à memória de meu pai, **Carlos
André**, meu maior fã e incentivador.*

In memoriam

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, o criador de todas as coisas, sem o qual nenhuma ciência ou filosofia existiriam. Pela salvação em primeiro lugar. Pela força e sabedoria para chegar até aqui. Pela paz que excede todo o entendimento, da qual aqueles que têm a **Jesus** desfrutam.

Ao meu marido, **Pedro Arthur**, o homem mais generoso que já conheci, que ama sem esperar nada em troca. Agradeço pela paciência comigo, mesmo eu sendo uma pessoa difícil de conviver, principalmente durante o desenvolvimento dessa monografia kkkk. Ele é meu grande amor da adolescência, que me apoia todos os dias desde os meus 17 anos. Minha alma gêmea, que nasceu no mesmo ano que eu, quase no mesmo mês, muitas vezes confundido como meu irmão de tão parecido. Obrigada por se esforçar em me fazer acreditar que consigo fazer coisas que eu mesma não acredito. Como disse um personagem cujo filme não deve ser mencionado aqui *"É uma coisa extraordinária quando conhecemos alguém com quem podemos dividir a nossa alma. Quem nos aceita como somos... eu tenho tentado pelo o que parece um tempo muito longo superar o que eu sou, e com você, sinto que finalmente posso começar. Nenhum espaço de tempo com você seria suficiente... comecemos com o para sempre."*

Ao meu pai, **Carlos André**, ou, como muitos o conheciam, "Sargento Torres", que deixou a vida protegendo a de outras pessoas, como um bom bombeiro. Agradeço pelo privilégio de ser sua filha. Nada neste mundo pode me fazer esquecer do ótimo pai que eu tive, que não me viu casar nem entrar na faculdade, mas que sonhava com isso e fazia planos para todos esses dias. Minha inspiração de vida. Dedico todas as minhas conquistas a ele.

À minha mãe, **Idalina**, a mulher mais forte, amorosa e bondosa que eu conheço. Que nunca reclama dos pesos da vida, mas segura cada um deles para aliviar os ombros dos outros. Obrigada por me ensinar tudo o que eu sei, por moldar o meu olhar e por me fazer, todos os dias, acreditar na bondade das pessoas. Este trabalho não é só meu, é seu também, por me incentivar em todos os momentos de dificuldade, desde o meu nascimento até aqui. Obrigada por me sustentar para que eu pudesse entrar na faculdade, não apenas financeiramente, mas também por proporcionar um ambiente saudável, que em muito favoreceu o meu amadurecimento. Não seria nada sem você, mamãe!

À minha irmã, **Nayna Sabrina**, em quem eu me espelho desde que nasci. A pessoa mais inteligente e talentosa que eu conheço. Que pinta um quadro sem nunca ter feito aula de pintura, que sabe tocar música “de ouvido”, que fala inglês e francês mesmo sem ter tido privilégios, e que guarda um mundo de conhecimento dentro de si. Obrigada por ser minha parceira de vida desde criança, por passar poucas e boas junto comigo, mas sempre se mantendo plena. Minha inspiração no mundo acadêmico, cujo potencial ainda não foi totalmente alcançado. Como disse Benjamin Disraeli, “a vida é muito curta para ser pequena”, e o mundo é pequeno demais para você, minha irmã!

À minha segunda família, minha sogra **Elane**, meu “sogro” **Marcelo**, meu cunhado **João**, aos avós de Pedro, **Elasir Freitas** e **Antônio Freitas**, obrigada por também serem os meus, pois eu nunca tinha sabido o que era ter avós até conhecer vocês, e aos tios **Paulo** e **César**. Obrigada por me acolherem desde sempre e por serem meu segundo lar. Vocês também são a minha família.

Às minhas irmãs de criação, **Marília** e **Gabi**, por toda a parceria, cuidado e por estarem presentes na minha vida desde que me entendo por gente.

Aos meus irmãos em Cristo e amigos da igreja, por todas as orações e carinho. Às amigas do **IPCLindas**, KKKK, por estarem comigo em mais uma etapa da vida. Agradeço aos meus pastores, **Alan Renne** e **Saul**, e aos meus presbíteros, por toda a dedicação e cuidado com a minha alma. Também agradeço ao meu irmão da Bléia e amigo para todas as horas, **Thiago Wallas**. Obrigada por ser tão companheiro e pelo apoio moral, por dizer tantas vezes: “Vai dar certo”.

A todos aqueles que estiveram comigo no vale da sombra da faculdade. À minha amiga **Thaiza**, parceira desde o primeiro período, que esteve comigo em TODAS as cadeiras (literalmente). Fizemos tudo juntas... entramos no PET e até no mesmo grupo de pesquisa. De longe, a pessoa mais responsável desse curso e que eu tive o prazer de conhecer, que nunca atrasou um prazo e que me salvou de esquecer-los muitas e muitas vezes. Obrigada por isso e por todos os momentos compartilhados (e foram muitos). Eu não teria conseguido sem você. À minha amiga **Ana Jéssica**, a pessoa por quem tenho carinho e cuidado desde o primeiro dia em que vi no laboratório. Obrigada por me ensinar muito do que eu sei e por ser a primeira filha adotada que eu tive. Obrigada por se abrir tantas vezes e por ser transparente

no modo de viver. Vocês foram os braços que me sustentaram na faculdade e tornaram esses anos muito mais leves. Quero ter vocês sempre por perto!

Aos amigos que fiz no **Programa de Educação Tutorial - PET**, o programa que eu tanto amo. Entrei na faculdade sem ter certeza de muitas coisas, mas sabia que queria entrar no PET. Agradeço a todos os petianos que estiveram comigo desde então. Sem dúvidas, eu não teria amadurecido academicamente sem essa vivência, ao lado de pessoas tão esforçadas. Vocês também tornaram o caminho da graduação muito mais leve. Agradeço em especial ao tutor **Lucas**, que me orientou em muitos momentos de forma descontraída, mesmo quando o que eu merecia era um bom puxão de orelha. Obrigada por ser meu pai acadêmico e por me ensinar a usar o Lattes direito kkk. Sou muito grata por vocês e considero tudo isso uma graça de Deus na minha vida.

Aos colegas de laboratório, aqueles que passaram pelas mesmas dificuldades e compartilharam tantos momentos. Obrigada pelas conversas e risadas enquanto esperávamos durante os experimentos. Obrigada pelos almoços e pela companhia nas saídas tarde do laboratório. Agradeço de coração àqueles que me ensinaram logo que cheguei, em especial ao **Ricardo**, que me adotou nos primeiros dias e me ensinou a fazer ELISA da forma mais organizada possível. Agradeço também às técnicas **Santinha** e **Gisele**, pela paciência, principalmente à Santinha, que esteve comigo desde o segundo período e me ensinou a fazer extração de DNA e tantas outras coisas mais. Agradeço ainda a todos os professores dos outros grupos de pesquisa que fazem parte do LabGeM, pela parceria e apoio.

Aos meus **professores**, agradeço por cada aula e pelas aulas da vida que não precisam de palavras. Muito obrigada!

Agradeço ao meu coorientador, **Tiago**, por toda a ajuda durante o desenvolvimento desta monografia. Mesmo sem me conhecer e sabendo que eu precisaria aprender muita coisa para gerar os resultados, sempre foi extremamente paciente e solícito. Em nenhum momento me deixou desconfortável, mas sempre me ajudou com atenção e cuidado, mesmo quando minhas dúvidas eram simples. Não teria conseguido de forma alguma sem sua orientação e generosidade. Muito obrigada por tudo. Desejo muitas bênçãos para você e sua família.

Por fim, um agradecimento muito especial à pessoa sem a qual esta pesquisa não existiria, pois eu nem sequer teria conhecido essa linha de pesquisa. Agradeço de coração à minha orientadora, **Mayara Ingrid**, por me aceitar no laboratório e me dar a oportunidade de

participar de tantas experiências essenciais para a minha formação. Agradeço por todas as caronas no início da graduação, que me quebraram um galho enorme. Por todos os ensinamentos, mesmo sendo dura às vezes, sei que todos foram importantes para o meu crescimento acadêmico. Obrigada também pelos elogios, que validaram meu esforço e me fizeram seguir em frente. Acredito que a validação do orientador é extremamente importante, apesar de muitos pensarem que não. Obrigada por acreditar que eu conseguiria desenvolver este trabalho e por me permitir fazê-lo. Você foi fundamental na minha trajetória acadêmica. Desejo que você continue tendo muito sucesso na sua vida, com muitas conquistas pessoais e profissionais.

Encerro esse trabalho com o coração cheio de gratidão. Todas as pessoas citadas aqui foram essenciais para meu desenvolvimento como pessoa e como profissional.

RESUMO

Leishmania (Leishmania) infantum é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) nas Américas, caracterizada por manifestações clínicas sistêmicas e elevada letalidade quando não tratada. A quimioterapia constitui a principal estratégia de controle da LV, sendo o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e a Anfotericina B os fármacos de primeira e segunda escolha. A Miltefosina, embora ainda não aprovada para o tratamento da LV no país, tem sido investigada como alternativa terapêutica. Entretanto, o surgimento de isolados resistentes a esses medicamentos representa uma preocupação crescente, especialmente em regiões endêmicas. A resistência a drogas em *Leishmania* é um fenômeno multifatorial, fortemente associado à elevada plasticidade genômica característica desse gênero de parasitos. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, tem caracterizado isolados clínicos de *L. (L.) infantum* com distintos perfis de sensibilidade frente aos medicamentos utilizados no tratamento de LV. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização genômica de dois isolados clínicos de *L. (L.) infantum* provenientes de pacientes do estado do Maranhão, classificados como resistente ou sensível ao Glucantime®, à Anfotericina B e à Miltefosina. Por meio de uma abordagem de genômica comparativa, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para identificar alterações cromossômicas, CNVs (variações no número de cópias, do inglês *Copy Number Variations*), SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) e deleções. O alinhamento ao genoma de referência foi realizado com o BWA, o processamento do alinhamento com *SAMtools* e *Picard*, a chamada de variantes com o *PAINT*, e as análises de cobertura, somia cromossômica e visualizações gráficas no ambiente R. Os resultados evidenciaram um cariótipo predominantemente dissômico em ambos os isolados, com aneuploidias pontuais, incluindo tetrassomias e uma discreta amplificação no cromossomo 20 do isolado M03, confirmando o mosaicismismo aneuploide característico de *Leishmania*. Observou-se ainda uma distribuição heterogênea de SNPs ao longo dos 36 cromossomos, com variações quantitativas importantes ao comparar os dois isolados, demonstrando que existem diferenças polimórficas a serem melhor investigadas. Adicionalmente, no isolado resistente M03 foi identificada a deleção completa do locus MSL (Lócus de Sensibilidade a Miltefosina, do inglês *Miltefosine Sensitivity Locus*), envolvendo a perda de seus quatro genes, alteração associada à resistência à Miltefosina. Em conclusão, os resultados reforçam o papel da plasticidade genômica como mecanismo adaptativo em *L. (L.) infantum* e sugerem que a combinação de aneuploidias e o acúmulo de variantes genéticas específicas pode contribuir para os diferentes perfis de suscetibilidade aos fármacos observados. Este estudo amplia a compreensão sobre os mecanismos moleculares de resistência em isolados clínicos circulantes no Brasil e pode subsidiar o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento e controle da LV.

Palavras-Chave: leishmaniose visceral; resistência a fármacos; bioinformática.

ABSTRACT

Leishmania (Leishmania) infantum is the etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) in the Americas, a disease characterized by systemic clinical manifestations and high lethality when untreated. Chemotherapy is the main strategy for VL control, with meglumine antimoniate (Glucantime®) and Amphotericin B being the first- and second-line drugs, respectively. Miltefosine, although not yet approved for VL treatment in Brazil, has been investigated as an alternative therapeutic option. However, the emergence of isolates resistant to these drugs represents a growing concern, especially in endemic regions. Drug resistance in *Leishmania* is a multifactorial phenomenon, strongly associated with the high genomic plasticity that characterizes this genus. Previous studies by our research group have characterized clinical isolates of *L. (L.) infantum* with distinct susceptibility profiles to drugs used in VL treatment. Thus, the aim of this study was to perform the genomic characterization of two clinical isolates of *L. (L.) infantum* obtained from patients in the state of Maranhão, classified as resistant or sensitive to Glucantime®, Amphotericin B, and Miltefosine. Using a comparative genomics approach, bioinformatics tools were applied to identify chromosomal alterations, CNVs (Copy Number Variations), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), and deletions. Alignment to the reference genome was performed with BWA, alignment processing with SAMtools and Picard, variant calling with PAINT, and coverage analyses, chromosomal copy estimation, and graphical visualizations were carried out in the R environment. The results revealed a predominantly disomic karyotype in both isolates, with punctual aneuploidies, including tetrasomies and a subtle amplification of chromosome 20 in isolate M03, confirming the aneuploid mosaicism characteristic of *Leishmania*. A heterogeneous distribution of SNPs was also observed along the 36 chromosomes, with important quantitative variations when comparing the two isolates, demonstrating the existence of polymorphic differences that warrant further investigation. Additionally, in the resistant isolate M03, a complete deletion of the MSL locus (“Miltefosine Sensitivity Locus”) was identified, involving the loss of its four constituent genes, a genomic alteration associated with Miltefosine resistance. In conclusion, these results reinforce the role of genomic plasticity as an adaptive mechanism in *L. (L.) infantum* and suggest that the combination of aneuploidies and the accumulation of specific genetic variants may contribute to the distinct drug susceptibility profiles observed. This study expands the understanding of the molecular mechanisms of resistance in clinical isolates circulating in Brazil and may support the development of more effective strategies for the treatment and control of VL.

Keywords: visceral leishmaniasis; drug resistance; bioinformatics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Evolução e adaptação de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	15
2.2 Estrutura e Variabilidade do Genoma de <i>Leishmania</i>	18
2.3 Resistência aos medicamentos em <i>Leishmania</i>	19
3.OBJETIVOS	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos.....	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Isolados clínicos e sequenciamento.....	23
4.2 Controle de qualidade e genoma de referência.....	23
4.3 Alinhamento de sequências.....	24
4.4 Identificação de variantes e visualização.....	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Perfil de resistência <i>in vitro</i> do isolado clínico M03.....	26
5.2 Análise da qualidade do sequenciamento e mapeamento dos genomas completos sequenciados dos isolados M03 e M05.....	26
5.3 Padrões de somia cromossômica nos isolados M03 e M05.....	27
5.4 Classificação taxonômica e avaliação de possíveis eventos de hibridização.....	31
5.5 Perfil de SNPs.....	32
5.6 Perfil de deleções nos isolados.....	35
6. DISCUSSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR	56

1. INTRODUÇÃO

Leishmania (Leishmania) infantum é um protozoário intracelular, agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) nas Américas (MCGWIRE *et al.*, 2014). A LV é considerada a forma mais grave da leishmaniose, uma vez que acomete múltiplos órgãos internos, manifestando-se clinicamente por sinais como esplenomegalia (aumento do baço) e pancitopenia, caracterizada pela redução dos elementos figurados do sangue (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Além disso, as manifestações clínicas dessa doença podem variar por diversas razões, como interações entre fatores genéticos do hospedeiro, comorbidades e características específicas do parasito (THAKUR *et al.*, 2020).

A LV permanece um relevante problema de saúde pública, especialmente devido à inexistência de vacinas eficazes para sua prevenção. Nesse contexto, a quimioterapia é essencial para o controle e manejo da doença, sendo tradicionalmente a única opção terapêutica disponível. Os antimoniais e Anfotericina B são os principais fármacos utilizados, não apenas para a LV, mas também para as diferentes formas de leishmaniose em várias regiões (BRASIL, 2015). Entretanto, apesar de seu uso generalizado, esses medicamentos estão associados a desvantagens significativas, como alta toxicidade, baixa adesão do paciente e elevado custo do tratamento (MOORE; LOCKWOOD, 2010; THAKUR *et al.*, 2020). Além disso, a presença de cepas resistentes a esses medicamentos torna urgente a busca por alternativas terapêuticas (CROFT; COOMBS, 2003). Nesse contexto, compostos como a Miltefosina (MT), que pode ser administrada por via oral, e a Paramomicina, por via parenteral, ganharam destaque no tratamento da leishmaniose, embora também já existam relatos de falha medicamentosa (HENDRICKX *et al.*, 2017).

O fenômeno da resistência dos parasitos representa um desafio complexo, envolvendo uma combinação de mecanismos inatos e adquiridos (BHARADAVA *et al.*, 2024). Ao longo dos anos, os avanços em tecnologias de bioinformática têm lançado luz sobre o impacto do genoma do patógeno nos mecanismos de resistência. Vários estudos demonstram que variações genômicas específicas e a presença de componentes moleculares distintos estão diretamente associadas às diferenças observadas na suscetibilidade *in vitro* aos fármacos, resultantes da plasticidade genômica observada no gênero *Leishmania* (DECUYPERE *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2023; BHARADAVA *et al.*, 2024). Nesse sentido, sob pressão farmacológica, podem ocorrer alterações genéticas específicas, como variações no número de cópias de DNA (CNVs - do inglês, *Copy Number Variation*), que vão desde alterações em

poucos pares de bases até aneuploidias em cromossomos inteiros. Além disso, são encontrados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) e outras alterações, como inserções e deleções em nível genômico (LAFFITTE, 2016; SPÄTH *et al.*, 2025).

Estudar isolados de *L. (L.) infantum* resistentes não apenas expande o conhecimento sobre a biologia do parasito, mas também pode impactar diretamente a maneira como as políticas de saúde pública abordam a leishmaniose. As alterações moleculares destacam a complexidade dos parasitos, ressaltando a importância de compreender a dinâmica genômica para enfrentar a resistência aos medicamentos e esclarecer questões fundamentais para o controle da LV. Dada a endemicidade predominante no Brasil e os casos de recidivas clínicas e falhas terapêuticas, especialmente na região nordeste (SANTOS *et al.*, 2023), novas pesquisas são essenciais para caracterizar as cepas circulantes e aprimorar as estratégias de controle da doença.

Assim, o presente estudo investigou a hipótese de que isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) infantum* provenientes da mesma região geográfica apresentam diferenças genômicas que explicam os distintos perfis de sensibilidade *in vitro* ao Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®]), Anfotericina B e Miltefosina. Para testar essa hipótese, aplicou-se uma abordagem de genômica comparativa com o objetivo de caracterizar as variações no número de cópias gênicas (CNVs), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e alterações na somia cromossômica. Esta abordagem permite não apenas uma compreensão mais aprofundada das bases genéticas moleculares da resistência aos antimoniais e outros fármacos, mas também revela aspectos fundamentais relacionados aos processos evolutivos e adaptativos desses microrganismos em regiões endêmicas, contribuindo para o entendimento da dinâmica populacional de *L. infantum* no contexto brasileiro.

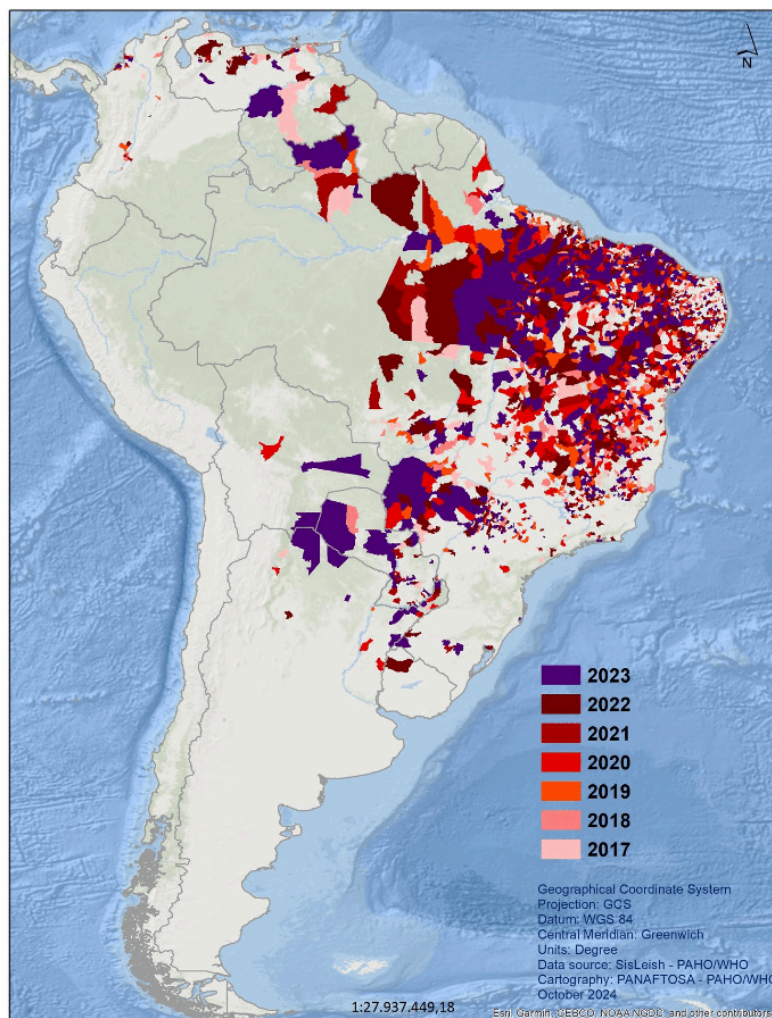
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Evolução e adaptação de *Leishmania (Leishmania) infantum*

A introdução de *Leishmania (L.) infantum* no continente americano representa um exemplo clinicamente relevante de invasão biológica associada à colonização europeia, iniciada há aproximadamente 500 anos (KUHLS *et al.*, 2011; LEBLOIS *et al.*, 2011). Processos invasivos desta natureza criam condições excepcionais para transformações evolutivas, nas quais populações fundadoras reduzidas enfrentam simultaneamente pressões seletivas inéditas e intensos efeitos de deriva genética decorrentes de uma amostragem populacional limitada (FLORÊNCIO *et al.*, 2025). Nestas circunstâncias, alterações na arquitetura genética podem ocorrer e determinar a estrutura populacional de longo prazo (SCHWABL *et al.*, 2021), como resultado da adaptação do parasito a insetos vetores no continente americano.

Mais de 90 espécies de insetos flebotomíneos transmitem o parasito ao redor do mundo (CECILIO *et al.*, 2022). No contexto americano, a leishmaniose visceral manifesta-se como zoonose associada a flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, que divergiram evolutivamente do gênero *Phlebotomus* (vetor prevalente no Velho Mundo), há aproximadamente 200 milhões de anos (AKHOUNDI *et al.*, 2016.). Essa diferença fundamental na fauna vetorial, associada às particularidades ecológicas dos ecossistemas neotropicais, estabeleceu um cenário propício para processos adaptativos distintivos nas populações parasitárias americanas (LEBLOIS *et al.* 2011; SCHWABL *et al.*, 2021). Como consequência desses processos evolutivos e das condições ambientais favoráveis, a LV apresenta atualmente ampla distribuição geográfica na América do Sul, com o Brasil concentrando a maior parte dos casos registrados no continente (Figura 1) (OPAS, 2024).

Figura 1 – Registro de casos de leishmaniose visceral na América do Sul, 2017–2023



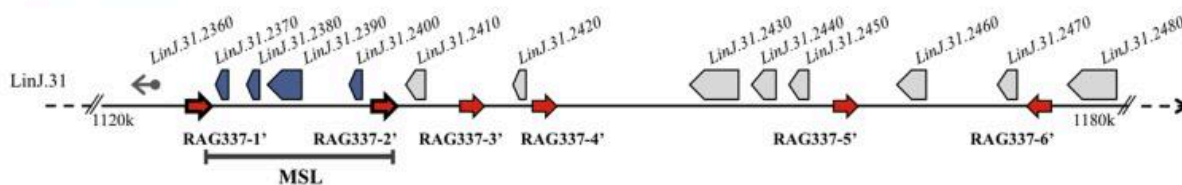
Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas, n. 13, 2024.

Séculos após o início da colonização europeia das Américas, investigações genômicas recentes revelaram um fenômeno evolutivo singular na população brasileira desses parasitos. Em um estudo baseado no sequenciamento de genoma completo de 26 isolados clínicos e genotipagem de 157 amostras, foi identificado no cromossomo 31 o marcador genético Locus de Sensibilidade à Miltefosina (MSL, do inglês *Miltefosine Sensitive Locus*) (CARNIELLI *et al.* 2018) (Figura 2). Demonstrou-se que a ausência do MSL está associada significativamente à falha terapêutica à miltefosina. Mais recentemente, a análise genômica de isolados provenientes de 17 unidades federativas brasileiras revelou a mesma alteração estrutural no cromossomo 31, caracterizada pela perda de aproximadamente 12 kb do material genético, abrangendo quatro genes do MSL (FLORENCIO *et al.*, 2025). Esse evento de deleção foi detectado em 15 das 17 regiões analisadas, demonstrando ampla distribuição geográfica, tendo sido detectado também em Honduras, porém permanece ausente em isolados europeus (BOITÉ *et al.*, 2020; SCHWABL *et al.*, 2021).

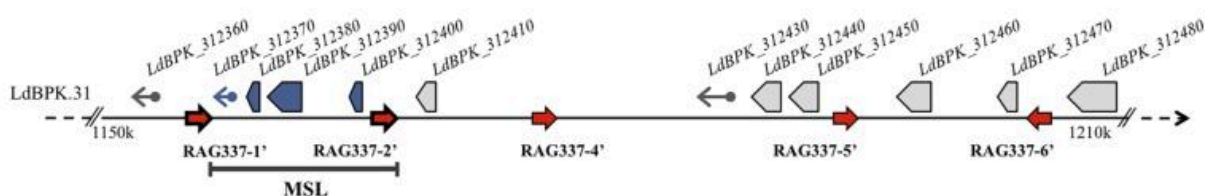
Figura 2 - Lócus MSL e possíveis mecanismos de perda dos genes

a

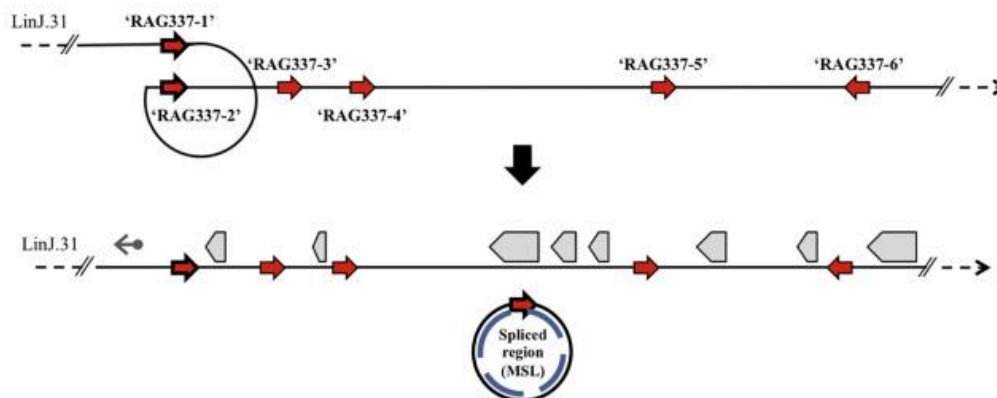
L. infantum JPCM5



L. donovani BPK282A1



b



Legend: ◻ Gene ← Truncated gene → Directed-repeat sequence ← Inverted-repeat sequence

Identificação de seqüências repetidas que flanqueiam MSL no *genoma de Leishmania* e possíveis mecanismos para perda de MSL. (A) Posição de repetições de seqüências no cromossomo 31 de *L. infantum* JPCM5, identificada por seqüência de junção nova formada após a deleção de MSL em isolados de *L. infantum*, (mapa superior). B) Modelo para perda do MSL: Recombinação homóloga entre duas seqüências de repetição direta que flanqueiam o MSL (RAG337-1' e RAG337-2'), levando à formação de um elemento extracromossômico circular. **Fonte:** Carnielli *et al.* 2018.

A região deletada abrange todas as quatro cópias do cromossomo 31, que apresenta estado tetrassômico estável dentro do contexto de aneuploidia em mosaico característico de *Leishmania* (LACHAUD *et al.*, 2014; MANNAERT *et al.*, 2012). Entre os genes afetados pela deleção encontra-se aquele codificante para a enzima ecto-3'-nucleotidase/nuclease, componente importante tanto para o metabolismo nutricional do parasito quanto para sua

capacidade de evasão dos mecanismos de defesa dos hospedeiros vertebrados (CARNIELLI *et al.*, 2018).

2.2 Estrutura e variabilidade do genoma de *Leishmania*

A estrutura do genoma de *Leishmania* é complexa, caracterizada pela presença de cromossomos lineares e DNA extracrossômico. Esta complexidade estrutural está intrinsecamente relacionada à variabilidade genética observada entre as cepas, a qual desempenha papel crucial na evolução da resistência aos tratamentos e na adaptação do parasito a diferentes ambientes. Neste contexto, a plasticidade genômica e os mecanismos epigenéticos contribuem tanto para a resistência aos medicamentos quanto para a sobrevivência do parasito ao escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, destacando a necessidade de monitoramento contínuo das populações parasitárias (LAFFITTE *et al.*, 2016; KAMRAN *et al.*, 2023).

O gênero *Leishmania* possui particularidades moleculares que o diferenciam de outros eucariotos, como a ausência de promotores específicos para RNA polimerase II e a organização em arranjos policistrônicos, que englobam centenas de genes sem relação funcional evidente (CLAYTON, 2019). Do ponto de vista cariotípico, as espécies apresentam entre 34 e 36 cromossomos, com tamanhos variando de 0,3 a 2,8 Mb. Apesar desta variação estrutural, a organização genética é notavelmente conservada, com mais de 99% dos genes compartilhados entre *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Especificamente, o genoma de *L. infantum* possui aproximadamente 32 Mb e contém mais de 8.300 genes codificadores (PEACOCK *et al.*, 2007; LAFFITTE *et al.*, 2016). Embora inicialmente se acreditasse que essas espécies possuíam genomas diplóides atípicos, a presença de aneuploidia em mosaico foi posteriormente reconhecida como fenômeno comum, com padrões que variam de acordo com a cepa ou a espécie analisada (STERKERS *et al.*, 2014).

A diversidade genética no gênero *Leishmania* é principalmente moldada por processos de amplificação de sequências de DNA e de perda de genes. Embora a variação no conteúdo genético exclusivo entre as espécies seja relativamente limitada, a heterogeneidade em nível populacional pode resultar da amplificação de regiões em cromossomos dissômicos e da variação no número de cópias de cromossomos, processos que exercem influência direta sobre o tropismo da doença (ROGERS *et al.*, 2011).

O avanço das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitou uma análise detalhada e abrangente do genoma de *L. (L.) infantum*, sendo essencial para identificar variações genéticas associadas à virulência. O sequenciamento completo do genoma de cepas distintas fornece uma base sólida para estudos funcionais que elucidam os mecanismos moleculares subjacentes à patogênese da leishmaniose (ZHENG *et al.*, 2020). Neste cenário, ferramentas como sequenciamento de exoma e genotipagem de SNPs têm sido amplamente empregadas para investigar a variabilidade genética entre cepas de diferentes regiões geográficas, o que possui implicações significativas para a epidemiologia da leishmaniose, uma vez que variantes distintas podem apresentar diferentes capacidades de transmissão e virulência (PATINO *et al.*, 2020; DOWNING *et al.*, 2011).

No contexto brasileiro, especialmente na região Nordeste, a diversidade genética de *L. infantum* ainda permanece pouco caracterizada em nível genômico, o que destaca a importância de estudos regionais para compreender a evolução e adaptação local dos parasitos, bem como suas implicações para o controle da doença.

2.3 Resistência medicamentosa em *Leishmania*

A resistência do patógeno ao tratamento antiparasitário acarreta consequências clínicas significativas, incluindo falhas terapêuticas, recidivas clínicas, com consequente aumento da morbidade, o que exige abordagens mais eficazes, como a combinação de terapias e o uso de novos agentes terapêuticos, além de estratégias preventivas como o controle de vetores (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). A resistência a drogas observada em espécies do gênero *Leishmania* constitui uma preocupação crescente, envolvendo alterações genéticas, metabólicas e na expressão de proteínas que ainda não foram totalmente elucidadas. Entre os mecanismos de resistência já identificados, destacam-se a superexpressão de genes específicos e a remodelação de componentes celulares, que são fundamentais na resistência a medicamentos como Antimônio, Miltefosina e Anfotericina B (NEVADO *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2020). Estes mecanismos incluem alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento da atividade de bombas de efluxo e modificações nas vias metabólicas (KRUPANSHI *et al.*, 2024).

Especificamente em *L. infantum*, os mecanismos de resistência são complexos e envolvem alterações genômicas e proteômicas de natureza diversa. A resistência à miltefosina, por exemplo, está frequentemente associada a lesões no complexo de proteínas LiMT/LiRos3, o que compromete a entrada do medicamento nas células do parasito. Essa

alteração decorre principalmente de uma deleção de dois pares de bases no gene *LiMT*, resultando em um códon de parada precoce que compromete a função da proteína LiMT e causa mutações que levam à produção anormal desta proteína (MONDELAERS *et al.*, 2016).

Adicionalmente, um estudo de associação genômica ampla (*genome-wide association study* - GWAS) estabeleceu conexão direta entre a deleção no cromossomo 31 anteriormente descrita, que afeta o locus MSL (*Miltefosine Sensitive Locus* - Locus de Sensibilidade à Miltefosina) e vem se mantendo nas populações brasileiras através de seleção positiva, e as falhas no tratamento da leishmaniose visceral com miltefosina no Brasil (CARNIELLI *et al.*, 2018; FLORENCIO *et al.*, 2025). Essa observação reforça a relevância epidemiológica da deleção cromossômica como marcador genético associado à resistência medicamentosa. Quanto à resistência ao antimônio (Sb III), a superexpressão do transportador ABC MRPA (ABCC3), juntamente com variações no número de cópias de genes (CNVs) e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), também se mostrou relevante (BROTHERTON *et al.*, 2013; MARTÍ-CARRERAS *et al.*, 2022).

Outras análises genômicas têm revelado camadas adicionais de complexidade. Um estudo de sequenciamento de genomas nucleares e mitocondriais de isolados de *L. infantum* da Tunísia revelou variações significativas relacionadas tanto à origem geográfica quanto ao fenótipo de resistência. Notavelmente, isolados provenientes de pacientes com recaída apresentaram padrões específicos de minicírculos mitocondriais, sugerindo que o DNA mitocondrial pode representar uma fonte promissora de biomarcadores para resistência a medicamentos (BUSSOTTI *et al.*, 2020).

Portanto, a caracterização genômica de isolados resistentes de *L. infantum* indica que a resistência é um fenômeno multifatorial, caracterizado por mutações pontuais, variações no número de cópias de genes e aneuploidias que atuam de forma integrada. A identificação dessas variações genéticas é crucial não apenas para compreender os mecanismos moleculares subjacentes à resistência, mas também pode auxiliar no desenvolvimento de biomarcadores para diagnóstico precoce e identificação de cepas resistentes. Além disso, os estudos genômicos têm implicações diretas na formulação de vacinas e no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que a compreensão detalhada da estrutura genética do parasito pode revelar alvos moleculares promissores para intervenções terapêuticas, orientando o desenvolvimento de tratamentos eficazes contra estas cepas (HERRERA-NÁJERA *et al.*, 2009; LAKSHMI *et al.*, 2014).

Diante desse cenário, a genômica comparativa emerge como ferramenta poderosa para desvendar as bases moleculares da resistência a fármacos em *L. infantum*. A comparação de genomas completos de isolados com diferentes perfis de sensibilidade permite identificar variações genéticas específicas que conferem vantagem adaptativa sob pressão farmacológica, contribuindo substantivamente para o desenvolvimento de biomarcadores preditivos e estratégias terapêuticas mais eficazes. Considerando o aumento progressivo da resistência aos tratamentos atualmente disponíveis, a integração de dados genômicos na prática clínica poderá melhorar significativamente o manejo da doença e, conseqüentemente, os resultados em saúde pública.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Realizar a caracterização genômica de dois isolados clínicos *Leishmania (L.) infantum* com diferentes perfis de resistência medicamentosa.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar análise comparativa do genoma dos isolados clínicos com o genoma de referência de *L. (L.) infantum*;
- Comparar o genoma de um isolado de *Leishmania (Leishmania) infantum* resistente e outro sensível aos medicamentos Glucantime[®], Anfotericina B e Miltefosina;
- Comparar os padrões de aneuploidias e variantes genômicas encontradas nos isolados com dados da literatura, visando identificar alterações conservadas.

4. METODOLOGIA

4.1 Isolados clínicos e sequenciamento

O biorrepositório do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM/UFMA) armazena isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) infantum* provenientes de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral no estado do Maranhão. Dentre esses isolados, foram selecionados dois perfis fenotípicos contrastantes: um isolado clínico resistente (M03) *in vitro* a três fármacos utilizados no tratamento da LV (antimoniato de meglumina (Glucantime®), anfotericina B e miltefosina), e um isolado sensível (M05), conforme determinado por ensaios de susceptibilidade previamente realizados pelo grupo. Os isolados clínicos estão cadastrados na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SISGEN, sob protocolo n.8839.

Os dados genômicos dos isolados foram obtidos por sequenciamento de nova geração (NGS) na plataforma *Illumina HiSeq 2500*, gerando leituras pareadas de 150 nucleotídeos (nt). O sequenciamento foi realizado na Universidade de York (Reino Unido), e os dados encontram-se depositados no *Sequence Read Archive* (SRA) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sob o *BioProject* ID PRJNA781413. Os dados brutos de sequenciamento foram obtidos no formato *FASTQ* por meio do *SRA Toolkit*, a partir dos identificadores SRR16972313 (isolado M03) e SRR16972315 (isolado M05). Foram extraídas leituras pareadas (*forward* e *reverse*), que foram utilizadas nas etapas subsequentes da análise.

4.2 Controle de qualidade e genoma de referência

A avaliação inicial da qualidade das leituras de sequenciamento foi realizada com o software *FastQC* (versão 0.12.1), por meio da inspeção de métricas como qualidade de base por ciclo, conteúdo GC, presença de sequências adaptadoras e distribuição do comprimento das leituras. Com base nesses relatórios, foi conduzida a filtragem das sequências utilizando o *Trimmomatic* (versão 0.39), visando à remoção de adaptadores e de regiões de baixa qualidade, garantindo maior confiabilidade para as etapas subsequentes de alinhamento e detecção de variantes. Os relatórios gerados em cada etapa foram sumarizados por meio do software *MultiQC* (Figura S1 e Figura S2).

Como genoma de referência, foi utilizado o genoma de *Leishmania (L.) infantum* cepa JPCM5, originalmente descrito por Peacock *et al.* (2007), obtido no formato FASTA a partir

do banco de dados *TriTrypDB* (versão 68). Esse genoma foi empregado como base para o alinhamento das leituras e para todas as análises comparativas subsequentes.

4.3 Alinhamento de sequências

As leituras filtradas foram alinhadas ao genoma de referência utilizando o algoritmo *BWA-MEM* (versão 0.7.17), adequado para alinhamento de leituras longas e pareadas. Os arquivos SAM gerados foram convertidos para o formato BAM, ordenados e indexados com o auxílio do *SAMtools* (versão 1.17). Posteriormente, o software *Picard* (versão 1.131) foi empregado para a marcação e remoção de leituras duplicadas, reduzindo vieses associados à amplificação por PCR e assegurando maior precisão na chamada de variantes.

Após o alinhamento das leituras filtradas ao genoma de referência *Leishmania (Leishmania) infantum* JPCM5, foram realizadas análises adicionais de controle de qualidade dos arquivos de alinhamento (BAM), incluindo o cálculo do número total de leituras, percentual de leituras mapeadas, qualidade média de mapeamento (MAPQ) e cobertura média do genoma. Esses parâmetros foram obtidos por meio de ferramentas do pacote SAMtools. A alta taxa de mapeamento e a cobertura média adequada observadas para ambos os isolados indicaram a qualidade dos dados para as análises genômicas subsequentes.

4.4 Identificação de variantes e visualização

A detecção de variantes genômicas foi realizada por meio de abordagens complementares. Inicialmente, o software *PAINT* (versão 1.0), desenvolvido especificamente para análise genômica de parasitos do gênero *Leishmania* (Shaik *et al.*, 2021), foi utilizado para a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), análise da profundidade de cobertura e inferência da ploidia cromossômica (somia). A partir do *PAINT*, foram gerados arquivos contendo listas de alelos, matrizes de ploidia e arquivos VCF com SNPs ajustados à somia cromossômica de cada isolado, por meio do módulo *AGELESS*.

Para a identificação e caracterização de variantes localizadas em regiões codificantes, foi utilizado o arquivo de anotação genômica (GFF) do genoma de referência *Leishmania (Leishmania) infantum* JPCM5, obtido da base TriTrypDB. Inicialmente, o arquivo GFF foi filtrado para reter apenas as anotações correspondentes a sequências codificantes (CDS), que foram posteriormente convertidas para o formato BED, compatível com as ferramentas de interseção genômica. As variantes previamente identificadas nos isolados M03 e M05 foram também convertidas para o formato BED e intersectadas com as regiões CDS utilizando o

software *bedtools*, permitindo a seleção de SNPs localizados exclusivamente em regiões codificantes do genoma. Em seguida, as variantes foram associadas a genes codificadores por meio da interseção entre os SNPs detectados e as anotações de genes do tipo *protein_coding_gene* presentes no arquivo GFF. A partir dessa interseção, foi realizada a contagem do número de SNPs por gene em cada isolado, possibilitando a identificação de genes com maior carga de polimorfismos e a comparação dos padrões de variação gênica entre os isolados resistente (M03) e sensível (M05).

As análises estatísticas e a visualização dos dados, incluindo a distribuição genômica das variantes, comparação entre isolados resistente e sensível, e a proporção de variantes em regiões codificantes, foram realizadas no ambiente *RStudio (Posit)*, utilizando principalmente o pacote *ggplot2*. A inspeção visual manual de regiões genômicas específicas e de variantes de interesse foi conduzida com o *Integrative Genomics Viewer (IGV)*.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil de resistência *in vitro* dos isolados clínicos

O isolado clínico M03 apresentou resistência *in vitro* a três fármacos, caracterizando um perfil multirresistente, conforme descrito na Tabela 1. Dessa forma, esse isolado clínico foi considerado um modelo relevante para a investigação dos mecanismos genéticos associados à resistência. Em contraste, o isolado M05 apresentou-se suscetível à Miltefosina e à Anfotericina B (Tabela 1).

Tabela 1- Sensibilidade *in vitro* dos isolados clínicos frente a diferentes fármacos

Medicamento	Forma do parasito	Isolado Clínico/ Índice de Resistência (IR)	
		M03	M05
Antimônio trivalente	Promastigota	2,00	2,30
Anfotericina B	Promastigota	3,50	0,70
Miltfosina	Promastigota	3,21	0,93
	Amastigota intracelular	3,72	0,81

O Índice de Resistência foi calculado utilizando o valor da IC50, dose do medicamento que mata 50% dos parasitos, do isolado clínico pelo valor da IC50 de uma cepa de referência susceptível. Valores superiores a 1,0 indicam que a cepa é tolerante e valores menores que 1,0 relacionam-se às cepas sensíveis. **Fonte:** Santos 2022; Coelho 2024.

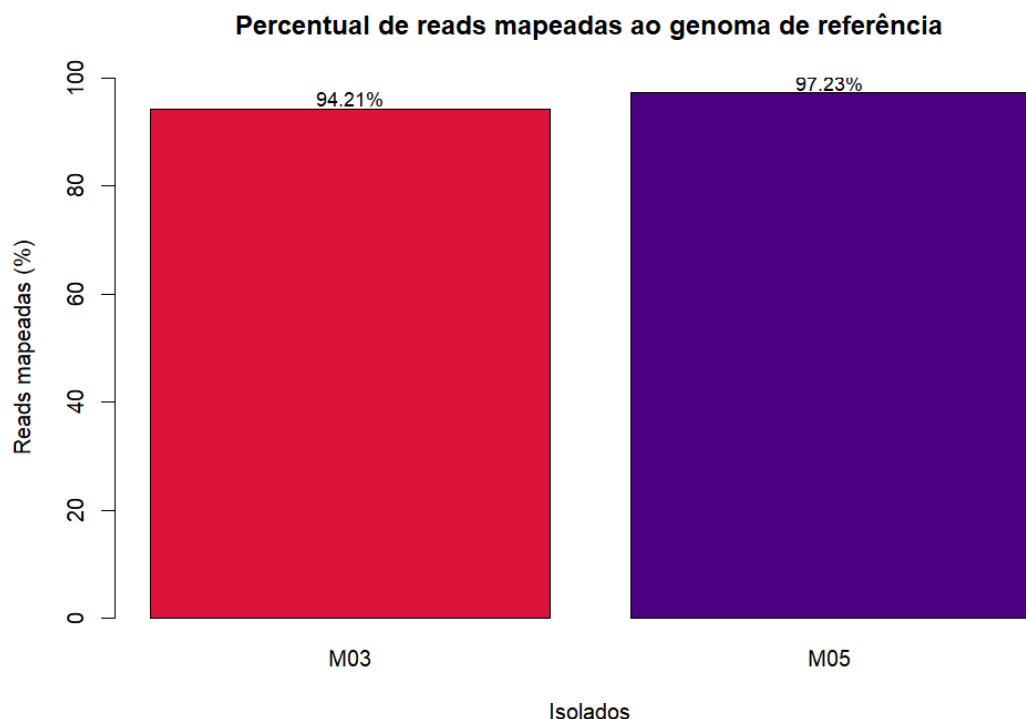
5.2 Análise da qualidade do sequenciamento e mapeamento dos genomas completos sequenciados dos isolados M03 e M05

O sequenciamento de genoma completo (WGS, do inglês *whole genome sequencing*) dos isolados gerou 12.316.154 (M03) e 16.646.016 *reads* (M05) na plataforma Illumina, com cobertura média de $50,30 \pm 72,86$ (M03) e $71,26 \pm 56,68$ (M05) e elevada porcentagem de leituras mapeadas (Figura 03) para o genoma de referência de *L. infantum* (JPCM5, TriTrypDB).

A análise conjunta dos relatórios de controle de qualidade gerados pelo *FastQC* e sumarizados pelo *MultiQC* (Figuras S1 e S2) demonstrou que os dados de sequenciamento apresentam excelente qualidade global. A distribuição das pontuações médias de qualidade por sequência revelou que a grande maioria das leituras concentrou-se em valores elevados de *Phred*, predominantemente acima de 30 e com picos entre 35 e 40, indicando alta

confiabilidade na identificação das bases. Não foram observadas leituras significativas com baixa qualidade.

Figura 3 - Percentual de *reads* mapeadas ao genoma de referência *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 após alinhamento.



O isolado M03 (vermelho) apresentou taxa de alinhamento de 94,21%, enquanto o isolado M05 (roxo) apresentou 97,23%. **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*

5.3 Padrões de somia cromossômica nos isolados M03 e M05

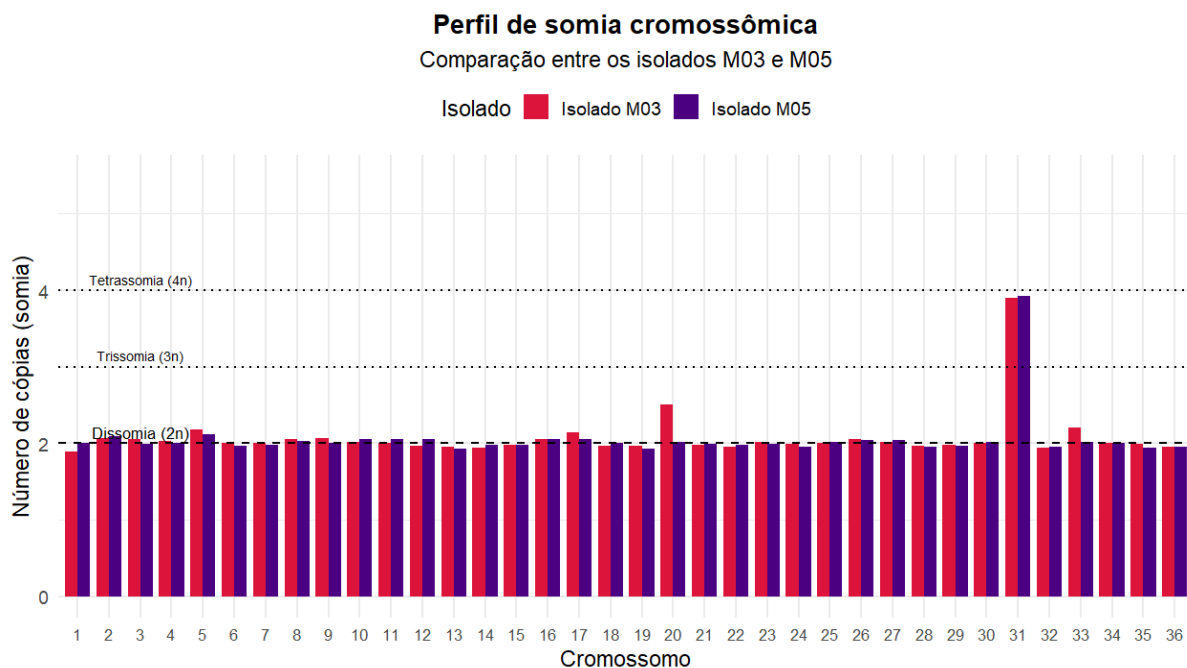
O perfil de somia cromossômica dos isolados *L. (L.) infantum* M03 e M05 foi obtido a partir da estimativa do número médio de cópias para cada um dos 36 cromossomos. As somias foram inferidas com base na profundidade média de cobertura ao longo de cada cromossomo, conforme calculado pelo software *PAINT*. De modo geral, ambos os isolados apresentaram predominância de cromossomos dissômicos ($2n$), evidenciada por valores de somia próximos a dois na maioria dos cromossomos analisados (Figura 4). Esse padrão foi consistente entre os isolados M03 e M05, indicando perfis globais de ploidia semelhantes.

Entretanto, variações pontuais foram observadas em cromossomos específicos. No isolado M03, essas variações incluem flutuações de somia ligeiramente acima ou abaixo de $2n$ quando comparadas ao isolado M05, refletindo diferenças cromossômicas sutis e específicas entre os mesmos. Um aspecto particularmente relevante foi observado no

cromossomo 20, que no isolado resistente M03 apresentou um valor de somia intermediário entre $2n$ e $3n$, indicando uma possível amplificação parcial desse cromossomo (Figura 4 e Figura 5). Esse resultado sugere que o cromossomo 20 pode representar um candidato importante para a investigação de genes associados à adaptação e à resistência a fármacos.

Adicionalmente, observou-se que o cromossomo 31 apresentou somia elevada em ambos os isolados, compatível com um estado de tetrassomia ($4n$). Embora esse achado seja consistente com os dados obtidos, ele é esperado, uma vez que a polissomia do cromossomo 31 é amplamente descrita como uma característica conservada em espécies do gênero *Leishmania*. Apesar das diferenças citadas, o perfil geral de somia manteve-se amplamente conservado entre os isolados M03 e M05.

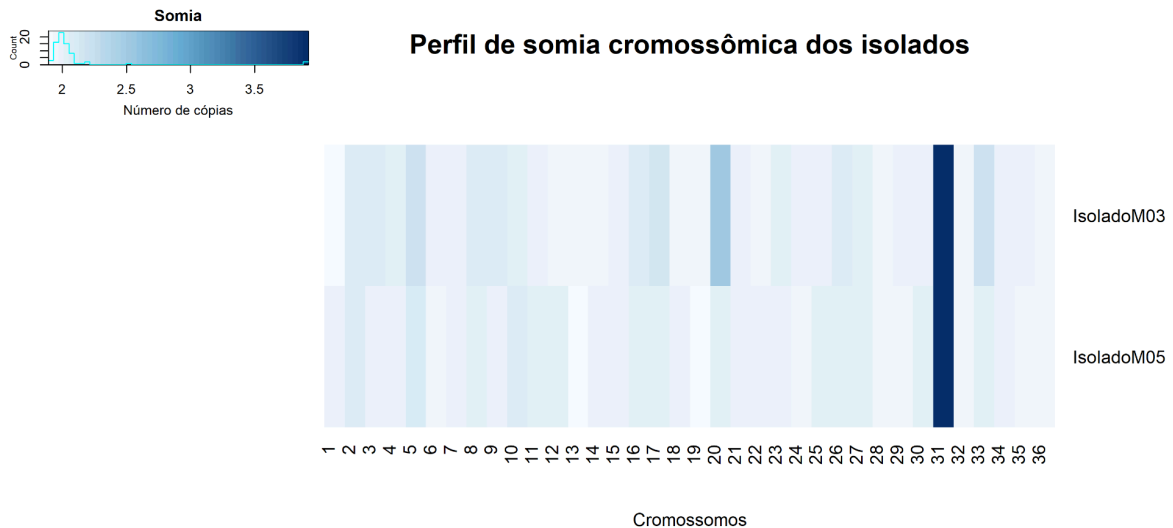
Figura 4 - Perfil de somia cromossômica ao longo dos 36 cromossomos nos isolados M03 e M05



Comparação do número de cópias cromossômicas entre o isolado M03 (resistente; vermelho) e M05 (sensível; roxo) para os 36 cromossomos. Observa-se predominância de cromossomos dissômicos ($2n$) em ambos os isolados, com exceções incluindo a tetrassomia do cromossomo 31. **Fonte:**

Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *ggplot2*.

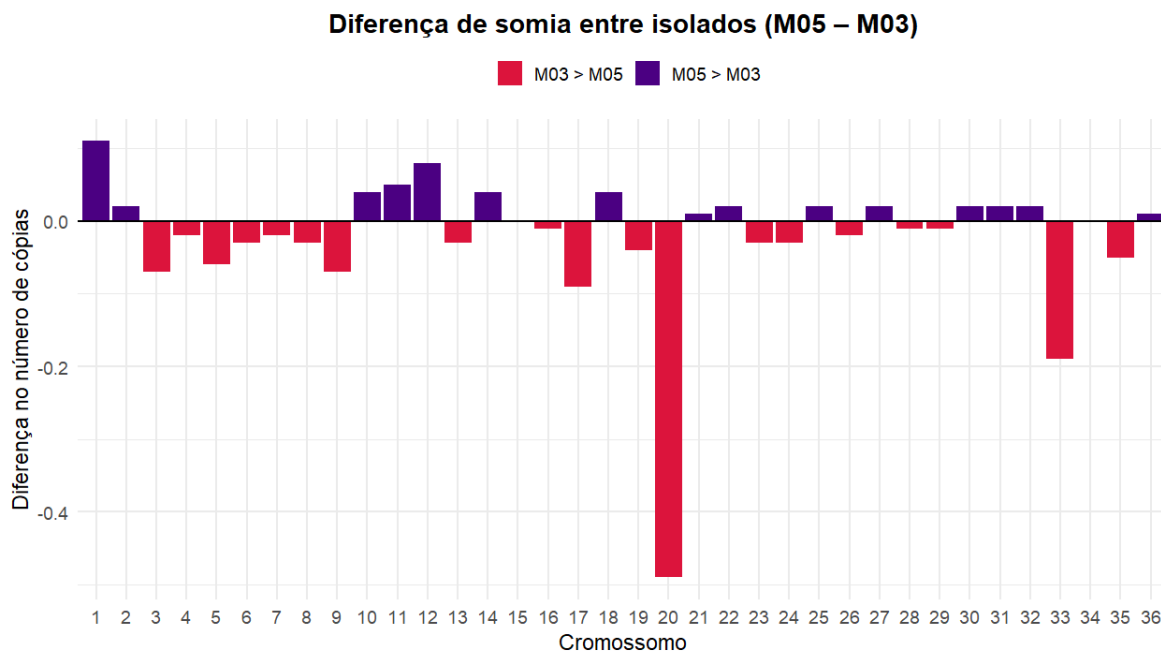
Figura 5 - Perfil de somia cromossômica dos isolados M03 e M05 representado por *heatmap*



Heatmap da somia cromossômica dos 36 cromossomos de *Leishmania infantum* nos isolados M03 e M05. As cores representam a variação no número estimado de cópias cromossômicas (somia), conforme a escala apresentada, variando de valores próximos à dissomia ($2n$) até valores mais elevados. Diferenças sutis de intensidade entre os isolados refletem variações discretas de somia em cromossomos específicos. **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *gplots* (função *heatmap.2*).

A análise da diferença de somia cromossômica evidenciou variações discretas de somia entre os isolados ao longo da maior parte do genoma, com diferenças próximas de zero para a maioria dos cromossomos (Figura 6). Entretanto, alguns cromossomos apresentaram diferenças mais pronunciadas, indicando variações no número de cópias entre os isolados. Destaca-se o cromossomo 20, que apresentou a maior diferença negativa de somia, refletindo maior número de cópias no isolado M03 em comparação ao M05. Diferenças positivas discretas também foram observadas em cromossomos específicos no isolado M05. De modo geral, os resultados indicam que, embora ambos os isolados apresentem predominantemente perfis de somia semelhantes, existem variações cromossômicas específicas que distinguem os isolados M03 e M05.

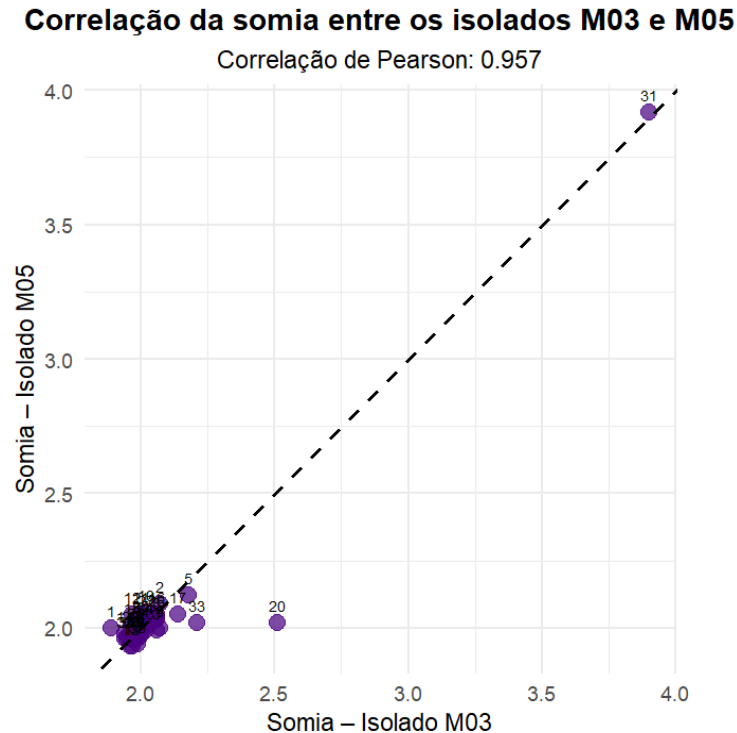
Figura 6 - Diferença de somia cromossômica entre os isolados



A diferença de somia foi calculada como a subtração da somia média do isolado M03 em relação à somia média do isolado M05 ($M05 - M03$) para cada um dos 36 cromossomos. Valores positivos (barras em roxo) indicam maior número de cópias cromossômicas no isolado M05, enquanto valores negativos (barras em vermelho) indicam maior somia no isolado M03. A linha horizontal em zero representa ausência de diferença de somia entre os isolados. **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *ggplot2*.

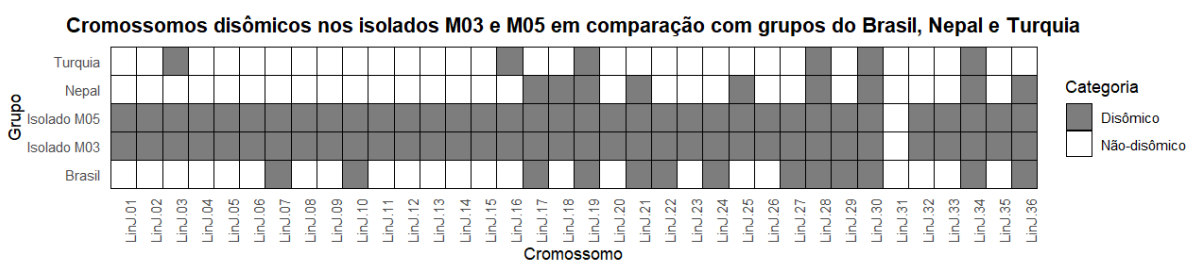
O coeficiente de correlação de Pearson foi estimado utilizando as somias médias de cada cromossomo nos isolados, avaliando a concordância linear entre os perfis. Valores próximos de 1 indicam alta similaridade entre os isolados, enquanto desvios refletem diferenças cromossômicas específicas. Dessa forma, a comparação direta das somias cromossômicas entre os isolados M03 e M05 (Figura 7) revelou alta similaridade global. A forte correlação observada indica que, de modo geral, os dois isolados compartilham padrões cromossômicos semelhantes. No entanto, a presença de cromossomos que se afastam da relação linear sugere variações pontuais no número de cópias.

Figura 7 - Correlação de Pearson entre a somia cromossômica dos isolados



O gráfico de dispersão apresenta a relação entre a somia média de cada cromossomo nos isolados M03 e M05. Cada ponto representa um cromossomo, enquanto a linha tracejada indica a igualdade perfeita de somia entre os isolados ($y = x$). Observa-se uma forte correlação positiva entre os perfis de somia ($r = 0,957$). No entanto, desvios pontuais em relação à linha diagonal evidenciam diferenças específicas entre alguns cromossomos. **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *ggplot2*.

Figura 8 - Comparação dos cromossomos predominantemente dissômicos dos isolados M03 e M05 com isolados do Brasil, Nepal e Turquia.



Distribuição dos cromossomos classificados como dissômicos (cinza) e não dissômicos (branco). O painel compara o padrão dos isolados M03 e M05 com dados de isolados do Brasil, Nepal e Turquia.

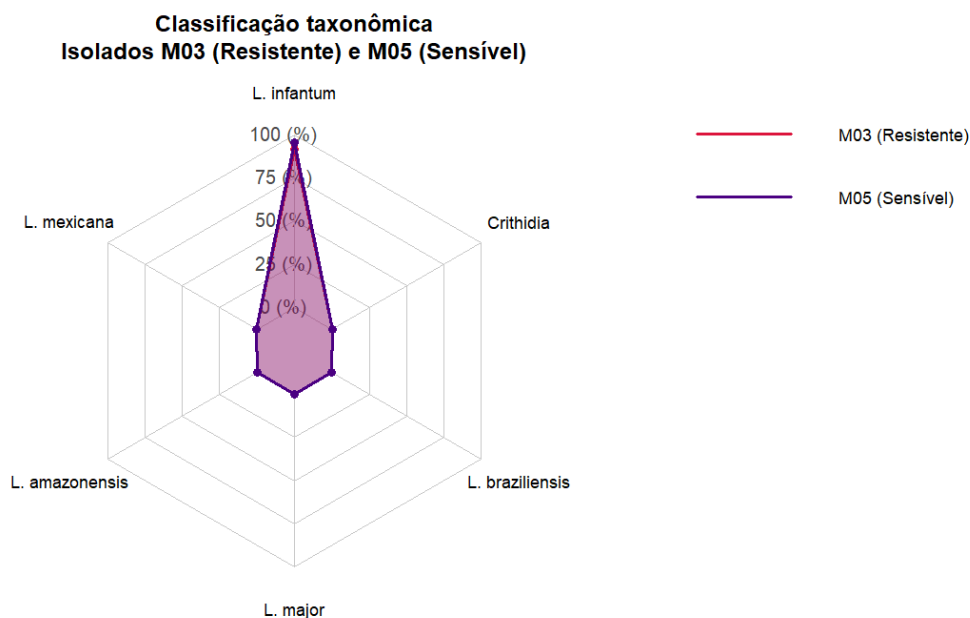
Os cromossomos são mostrados que são predominantemente dissômicos em 20 isolados de *L. infantum* do Brasil, 17 isolados de *L. donovani* do Nepal e 12 isolados de *L. infantum* da Turquia. Um total de 13 cromossomos nos isolados brasileiros, nove nos isolados nepaleses e seis nos isolados turcos foram predominantemente dissômicos (ROGERS *et al.*, 2014; DOWNING *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2017). **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*.

5.4 Classificação taxonômica e avaliação de possíveis eventos de hibridização

A análise taxonômica das leituras de sequenciamento por meio do software Kraken2 revelou que ambos os isolados, M03 e M05, apresentam predominância de leituras classificadas como *Leishmania (L.) infantum* (Figura 9). No isolado M05, 95,44% das leituras foram atribuídas especificamente a *L. infantum*. Já no isolado M03, 91,38% das leituras correspondem a *L. infantum*.

Observou-se ainda uma maior proporção de leituras não classificadas no isolado M03 (6,52%) em comparação ao isolado M05 (3,23%). Além disso, pequenas frações de leituras foram atribuídas a outras espécies do gênero *Leishmania*, incluindo *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, bem como ao gênero *Crithidia*. Essas atribuições correspondem a proporções reduzidas do total de leituras e não indicam inicialmente a presença de hibridização. Em vez disso, refletem limitações inerentes à abordagem de classificação taxonômica baseada em *k-mers*, uma vez que a elevada similaridade genômica entre espécies do gênero *Leishmania* pode levar à classificação de leituras conservadas em táxons filogeneticamente próximos. Uma análise mais detalhada deverá ser conduzida no futuro para determinar se os isolados não apresentam evidência de evento de recombinação recente.

Figura 9 - Classificação taxonômica dos isolados



Classificação taxonômica das leituras de sequenciamento dos isolados M03 e M05 obtida pelo software Kraken2. **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *fmsb*.

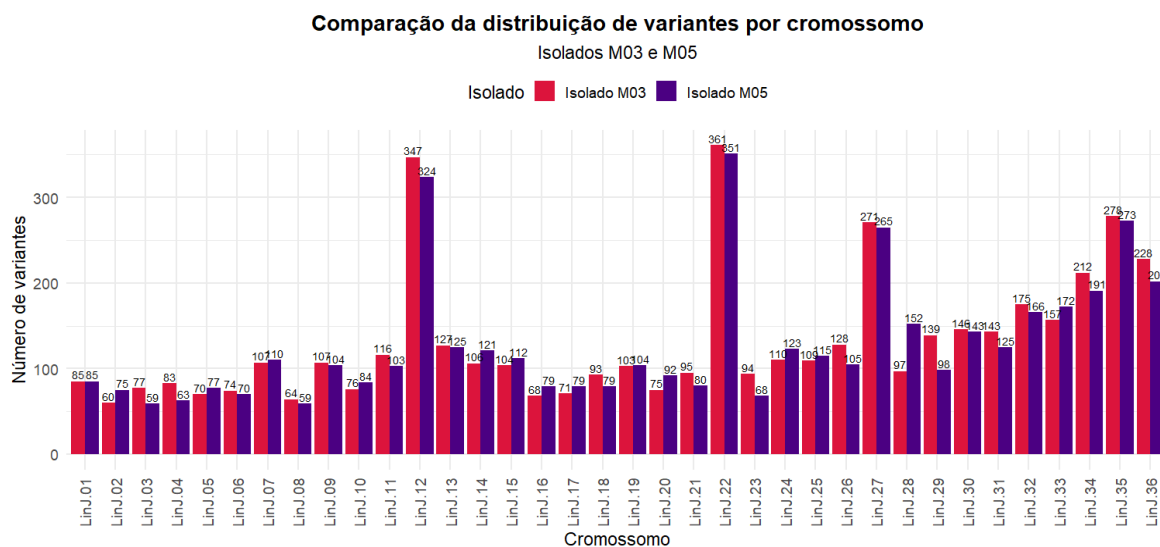
5.5 Perfil de SNPs

Ao avaliar a distribuição do número de variantes genômicas identificadas nos isolados M03 e M05, observou-se que a ocorrência de variantes não é homogênea entre os 36 cromossomos, com padrões semelhantes entre os dois isolados, mas com diferenças quantitativas pontuais (Figura 10).

Em ambos os isolados, alguns cromossomos concentram um número mais elevado de variantes, destacando-se, por exemplo, os cromossomos 12, 22, 27, 34, 35 e 36, que apresentam picos evidentes de variação. Esse padrão indica a existência de regiões genômicas potencialmente mais suscetíveis a eventos mutacionais, possivelmente associadas a *hotspots* de instabilidade, a pressões seletivas específicas ou a regiões de recombinação genética. Por outro lado, alguns cromossomos exibem menor número de alterações, sugerindo regiões relativamente mais conservadas do genoma.

De modo geral, o isolado M03 apresenta um número ligeiramente superior de variantes em diversos cromossomos quando comparado ao isolado M05, embora a tendência global de distribuição seja semelhante entre ambos (Figura 10). Esse padrão indica que, apesar das diferenças fenotípicas entre os isolados, a organização geral da variabilidade genômica ao longo dos cromossomos é amplamente compartilhada. Os dados evidenciam que a variabilidade genômica em *L. infantum* está distribuída de forma desigual ao longo do genoma, refletindo possivelmente diferenças regionais na taxa de mutação ou na pressão seletiva, aspectos que serão explorados com maior profundidade na seção de discussão.

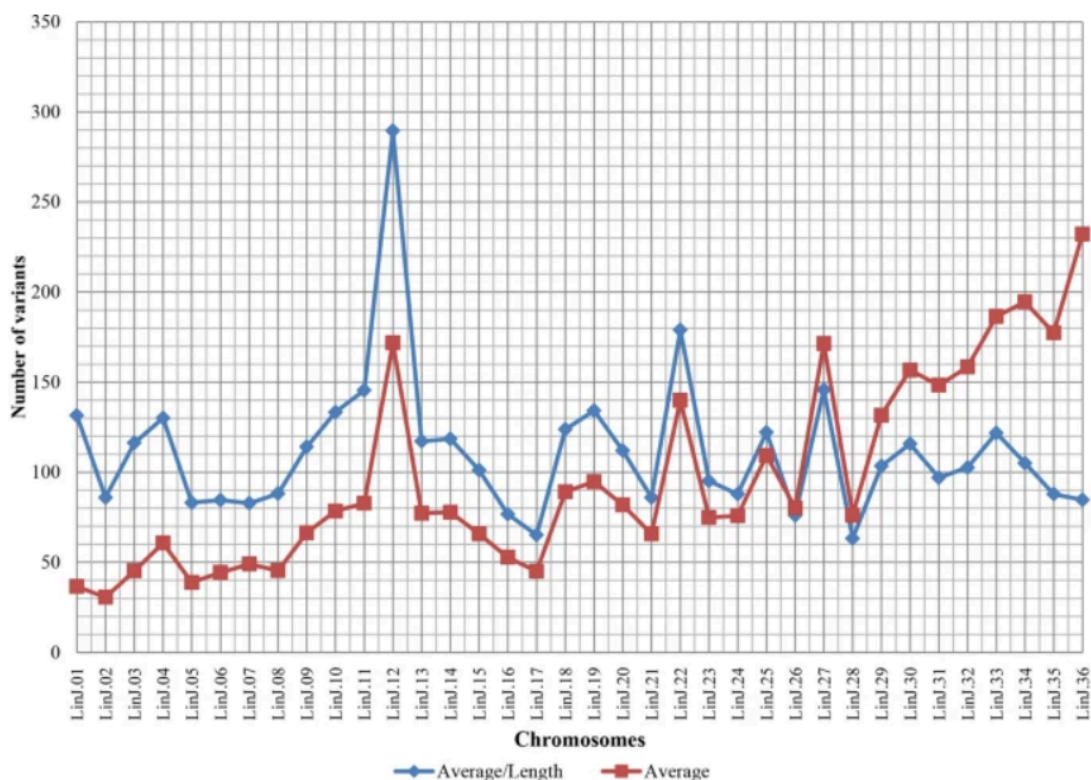
Figura 10 - Distribuição de variantes genômicas por cromossomo



Número de variantes identificadas em cada um dos 36 cromossomos dos isolados M03 (resistente;

vermelho) e M05 (sensível; roxo). A distribuição das variantes não é uniforme ao longo do genoma, com determinados cromossomos apresentando um acúmulo mais pronunciado de alterações. **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *ggplot2*.

Figura 11 - Distribuição de variantes genômicas por cromossomo em *Leishmania infantum* observada por Carvalho *et al.* (2020)



Número de variantes genômicas distribuídas por cromossomo em 30 isolados de *L. infantum* do Piauí e Maranhão. Os cromossomos 12, 22, 27 e 36 apresentaram o maior número bruto de variantes (destacados em vermelho). Após normalização pelo tamanho do cromossomo, apenas os cromossomos 12, 22 e 27 permaneceram destacados (azul), indicando que esses cromossomos acumulam variantes de forma desproporcional ao seu tamanho. **Fonte:** Carvalho *et al.* (2020).

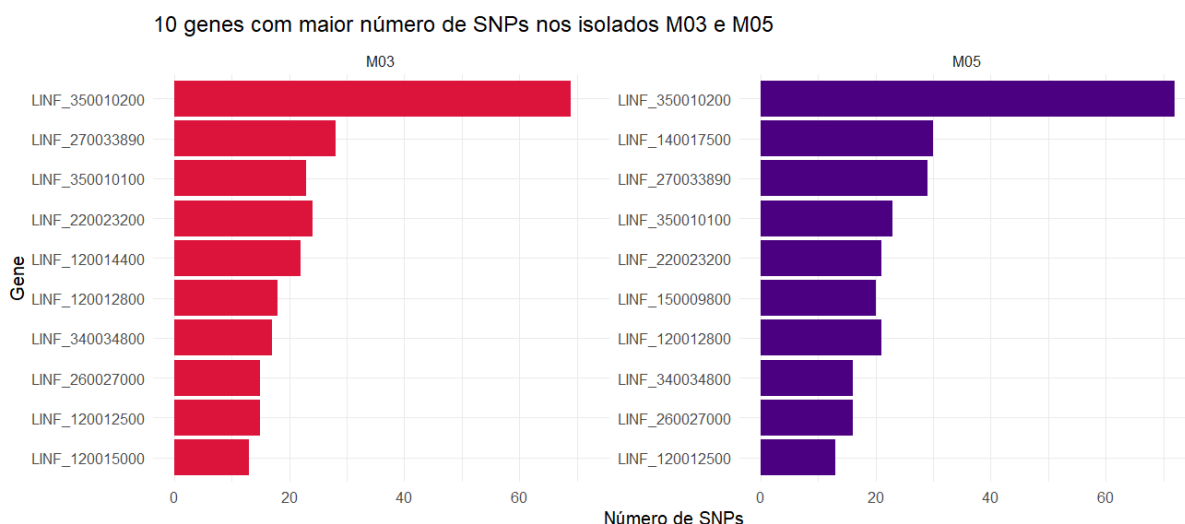
Os dez genes com maior número de variantes do tipo SNP foram identificados nos genomas dos isolados. Genes localizados em regiões deletadas não foram incluídos na contagem de SNPs. Os resultados evidenciam que, embora haja sobreposição parcial entre os genes mais polimórficos dos dois isolados, diferenças importantes são observadas tanto na identidade dos genes quanto no número total de SNPs associados a cada um (Figura 12).

No isolado M03, destaca-se o gene LINF_350010200, que apresenta o maior número de SNPs dentre todos os genes analisados, seguido por LINF_270033890 e LINF_350010100. Os demais genes do conjunto exibem números intermediários de variantes, indicando um padrão de concentração de polimorfismos em *loci* específicos do genoma (Figura 12). De forma semelhante, no isolado M05, o gene LINF_350010200

também foi identificado como o mais polimórfico, sugerindo que esse gene apresenta elevada variabilidade em ambos os isolados. Entretanto, a ordem relativa e o número de SNPs nos genes subsequentes diferem entre M03 e M05, como observado para LINF_140017500 e LINF_270033890, que ocupam posições de destaque apenas no isolado M05.

A comparação entre os dois perfis revela que, apesar de os isolados compartilharem genes altamente polimórficos, a intensidade da variabilidade genética associada a cada gene varia entre M03 e M05. Esses resultados evidenciam a presença de padrões específicos de polimorfismo gênico entre os isolados analisados, reforçando a heterogeneidade genômica intraespecífica em *L. (L.) infantum*. Adicionalmente, observa-se que a maior parte das variantes identificadas está localizada em regiões não codificantes do genoma, o que sugere que grande parte da variabilidade genética pode estar associada a regiões regulatórias ou intergênicas, e não diretamente a alterações em sequências codificadoras.

Figura 12 - Genes com maior número de SNPs nos isolados M03 e M05



Genes com maior número de SNPs nos isolados M03 e M05. As variantes foram intersectadas com as regiões codificantes e com as anotações de genes do genoma de referência *L. infantum* JPCM5. (Genes ausentes devido a deleções não foram incluídos na análise de SNPs). **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *ggplot2*.

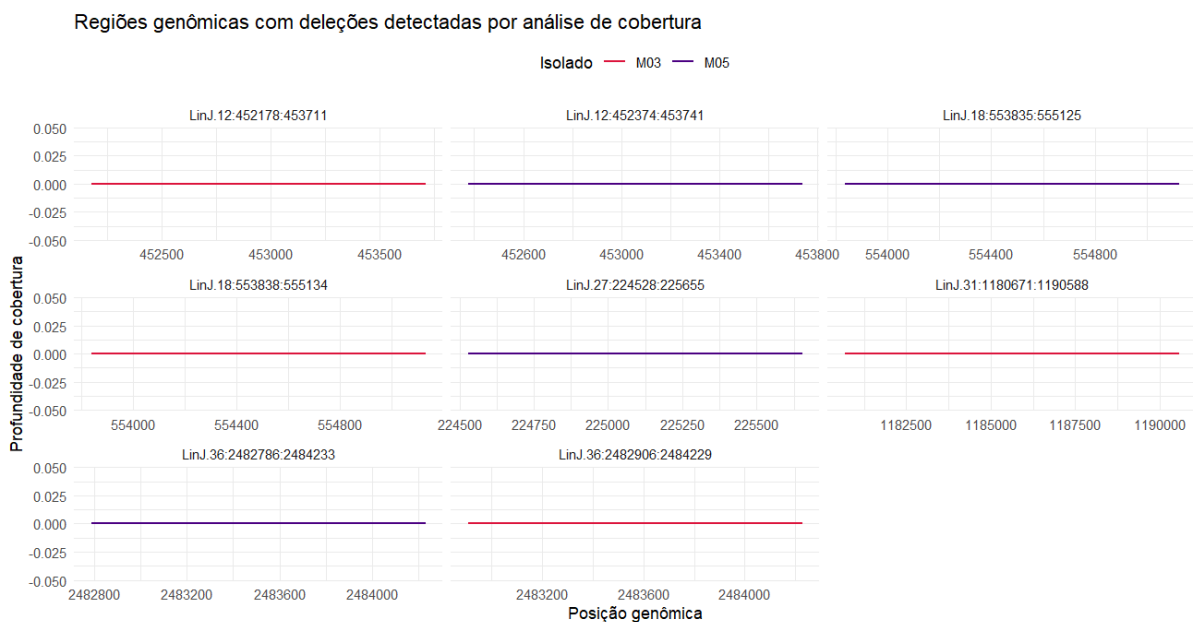
5.6 Perfil de deleções nos isolados

A avaliação das sequências deletadas em cada um dos isolados, relativo ao genoma de referência, demonstrou que os dois compartilham deleções genômicas em regiões semelhantes nos cromossomos LinJ.12, LinJ.18 e LinJ.36, indicando um padrão comum de variação estrutural (Figura 13). No entanto, uma diferença marcante é observada no cromossomo LinJ.31, onde apenas o isolado M03 apresenta uma deleção extensa

correspondente ao locus MSL, enquanto essa região permanece íntegra no isolado M05 (Figura 13 e Figura 14).

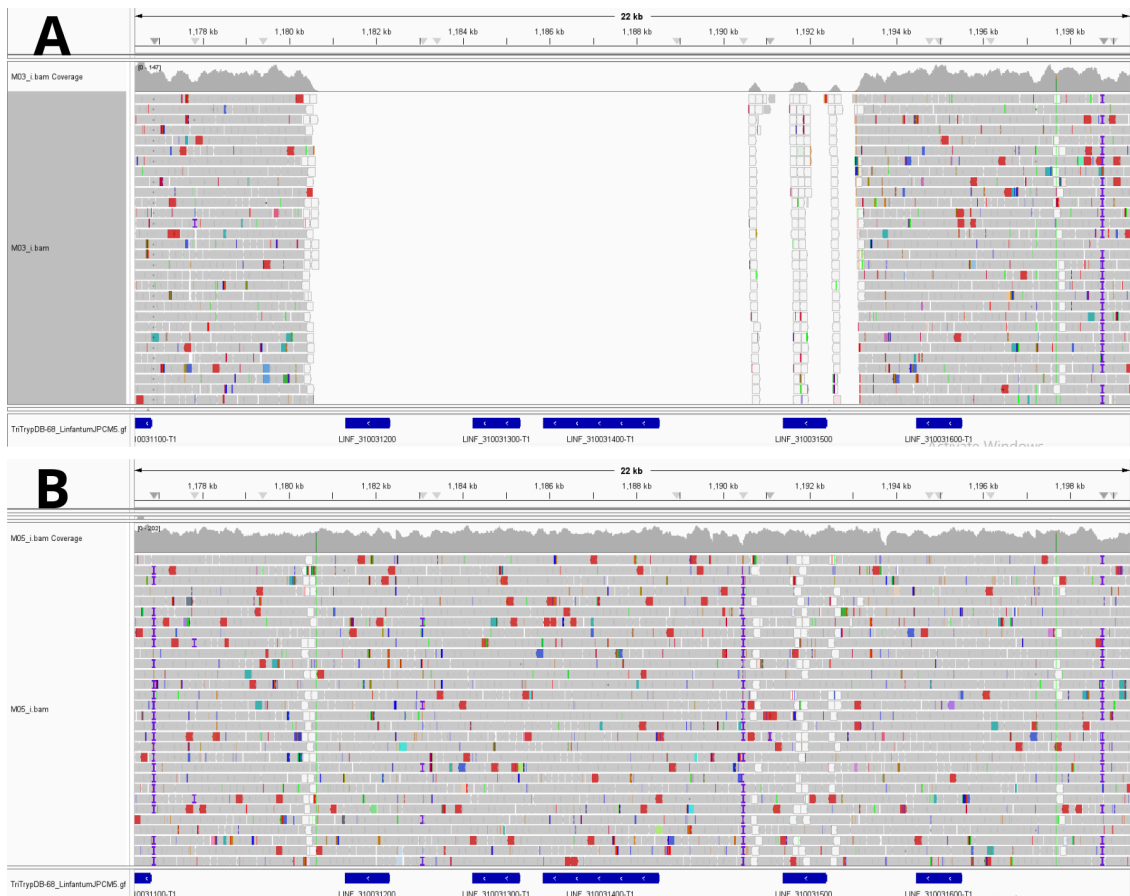
Entre as outras regiões deletadas, destaca-se a ausência do gene *LINF_120014700* no cromossomo 12 em ambos os isolados, anotado no genoma de referência como *surface antigen protein 2 – putative*, classificado como gene codificador de proteína, com um único transcrito do tipo mRNA (*LINF_120014700-T1*). Esse gene, por estar associado a uma proteína de superfície putativa, pode estar envolvido em processos de interação parasito–hospedeiro, como adesão celular, reconhecimento imunológico ou modulação da resposta imune. A presença dessa deleção compartilhada em ambos os isolados, independentemente do perfil de sensibilidade ou resistência aos fármacos, indica que ela provavelmente reflete um padrão comum de variação estrutural genômica dos parasitos circulantes, podendo estar associada a processos adaptativos ou à plasticidade genômica típica do gênero, especialmente em genes relacionados à relação parasito–hospedeiro.

Figura 13 - Regiões genômicas com deleções detectadas nos isolados



As deleções foram identificadas a partir da análise da profundidade de cobertura por base, obtida com o comando *samtools depth*, considerando regiões contínuas com ausência de cobertura (*depth* = 0). O isolado M03 (vermelho) apresenta deleções nos cromossomos LinJ.12, LinJ.18, LinJ.31 e LinJ.36, enquanto o isolado M05 (roxo) apresenta deleções nos cromossomos LinJ.12, LinJ.18, LinJ.27 e LinJ.36. As posições genômicas são apresentadas de acordo com o genoma de referência *L. infantum* JPCM5. **Fonte:** Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacotes da coleção *tidyverse*

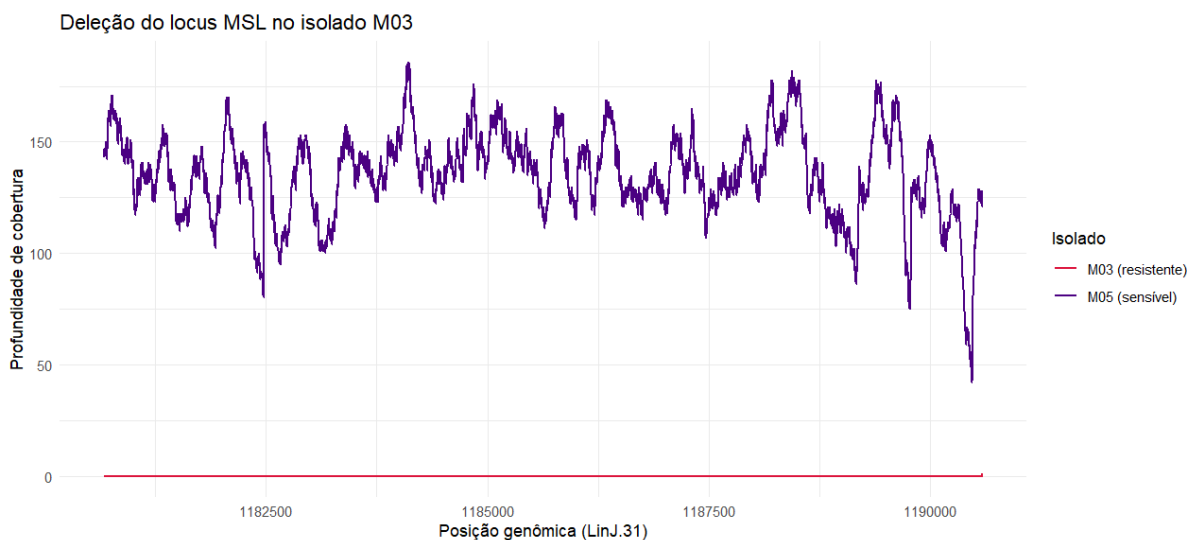
Figura 14 - Visualização no IGV do alinhamento das leituras ao genoma de referência *Leishmania (L.) infantum* JPCM5 na região do locus MSL.



A) Isolado M03 – Observa-se uma redução abrupta da cobertura de leitura na região correspondente ao locus MSL (localizado no cromossomo 31), acompanhada pela ausência de alinhamentos. Essa perda de sinal é indicativa de uma deleção genômica, afetando os genes LINF_310031200 a LINF_310031500, o que evidencia a deleção do locus MSL. **B)** Isolado M05 – Observa-se a região correspondente ao locus MSL preservada, com cobertura de leitura contínua e alinhamentos regulares, indicando a ausência de deleção nessa região genômica. **Fonte:** IGV

A profundidade de cobertura ao longo do locus MSL, localizado no cromossomo 31, foi avaliada a partir dos arquivos de alinhamento das sequências dos isolados. No isolado M03, observa-se uma redução abrupta da profundidade de cobertura em um segmento contínuo do locus MSL, compreendido aproximadamente entre as posições 1.180.671 e 1.190.589, caracterizando uma região com ausência ou cobertura extremamente reduzida de leituras. Em contraste, o isolado M05 apresenta cobertura contínua e homogênea ao longo de toda a extensão do locus, sem interrupções evidentes. Essas diferenças no perfil de cobertura entre os isolados evidenciam a presença de uma deleção genômica no locus MSL no isolado M03, enquanto o mesmo permanece íntegro no isolado M05.

Figura 15- Profundidade de cobertura do locus MSL no cromossomo 31



Profundidade de cobertura ao longo da região genômica correspondente ao locus MSL nos isolados M03 (resistente; vermelho) e M05 (sensível; roxo). A cobertura foi calculada considerando cada posição nucleotídica da região analisada. Observa-se, no isolado M03, uma queda acentuada da cobertura (valor 0) entre as posições ~1.182.500 e 1.190.000, caracterizando uma deleção genômica no locus MSL, enquanto o isolado M05 apresenta cobertura contínua ao longo de toda a região.

Fonte: Elaborada pela autora no software *RStudio Posit*, pacote *tidyverse*.

6. DISCUSSÃO

Por meio de análises genômicas, nosso estudo revelou diferenças genéticas pontuais marcantes entre dois isolados clínicos simpátricos de *L. infantum* do Maranhão, que apresentam perfis fenotípicos contrastantes de sensibilidade em resposta à exposição a fármacos, com um isolado classificado como resistente (M03) e o outro sensível (M05) aos medicamentos previamente avaliados. No genoma do isolado resistente, foi confirmada a deleção do locus MSL, região gênica do parasito recentemente associada ao tratamento eficaz com miltefosina (CARNIELLI *et al.*, 2018; FLORENCIO *et al.*, 2025). Vale ressaltar as demais variantes descritas para esse isolado no presente trabalho, que representam novos potenciais marcadores que deverão ser investigados em estudos futuros, após confirmação utilizando um número maior de amostras.

O gênero *Leishmania* é amplamente reconhecido por sua elevada plasticidade genômica, que atua como uma importante estratégia adaptativa frente a diferentes pressões (ROGERS *et al.*, 2011). Estudos reforçam que a variação da somia cromossômica constitui uma característica biológica intrínseca a esse gênero, desempenhando um papel funcional na adaptação a condições experimentais e ambientais distintas (DUMETZ *et al.*, 2017). Embora esses parasitos tenham sido por muito tempo considerados essencialmente diplóides (2n), evidências acumuladas ao longo das últimas décadas demonstram que estados de triploidia (3n), tetraploidia (4n) e até pentaploidia (5n) são relativamente comuns em *Leishmania*, refletindo mecanismos dinâmicos de resposta às pressões seletivas impostas ao longo do ciclo de vida do parasito (UBEDA *et al.*, 2008; LACHAUD *et al.*, 2014).

O número estimado de cópias cromossômicas para os 36 cromossomos de *L. infantum* nos isolados M03 e M05 evidenciou a ocorrência de cromossomos dissômicos (valor 2 no eixo y), trissômicos (valor 3) e tetrassômicos (valor 4). Ambos os isolados apresentaram perfil cariotípico predominantemente dissômico, com 34 dos 36 cromossomos mantendo duas cópias. Adicionalmente, observou-se a presença de cromossomos com profundidade de leitura intermediária, como o cromossomo 20 no isolado M03, que apresentou valor entre 2 e 3. Este padrão pode refletir o fenômeno de aneuploidia em mosaico, caracterizado pela coexistência de subpopulações celulares com diferentes números de cópias cromossômicas dentro de uma mesma cultura parasitária, ou indicar ampliações segmentares de regiões específicas do cromossomo (ROGERS *et al.*, 2011; FRANSSSEN *et al.*, 2020).

Estudos comparativos não apresentaram o padrão predominantemente dissômico de ploidia observado neste trabalho. Rogers *et al.* (2014), Downing *et al.* (2011) e Teixeira *et al.* (2017) analisaram 49 isolados clínicos do complexo *L. infantum/L. donovani* provenientes do Nepal, Turquia e Brasil (Rio Grande do Norte), demonstrando que apenas quatro cromossomos (19, 28, 30 e 34) eram predominantemente dissômicos nas três populações. Especificamente nos isolados brasileiros, sete cromossomos (17, 19, 21, 28, 30, 34 e 36) mantiveram a dissomia em todos os isolados analisados, sugerindo conservação de somias entre diferentes populações geográficas (Figura 8). Entretanto, nesses estudos, diversos cromossomos apresentaram polissomia, contrastando com os achados nos isolados M03 e M05 aqui analisados, nos quais 34 dos 36 cromossomos mantiveram-se dissômicos.

A única exceção ao padrão dissômico observado nos isolados M03 e M05 foi o cromossomo 31, que apresentou tetrassomia ($4n$) em ambos os isolados. Este padrão é amplamente conservado no gênero *Leishmania*, conforme demonstrado por estudos com diferentes populações e espécies. Dumetz *et al.* (2017) identificaram pelo menos tetrassomia do cromossomo 31 em todas as linhagens experimentais de *L. donovani* analisadas, enquanto Imamura *et al.* (2016) corroboraram esse achado em 204 cepas de *L. donovani* do subcontinente indiano. A conservação evolutiva da tetrassomia do cromossomo 31 tem sido atribuída à sua composição gênica específica, particularmente o enriquecimento em genes envolvidos no metabolismo do ferro e em funções redox. Sugere-se que a poliploidia desse cromossomo constitui uma estratégia adaptativa para otimizar a captação de ferro e amplificar a expressão de proteínas ferro-enxofre, essenciais para reações de oxidação-redução e síntese de metabólitos fundamentais para a sobrevivência do parasito (VALDIVIA *et al.* 2015).

É importante considerar que a diferença observada entre o perfil cariotípico dos isolados M03 e M05 e aqueles reportados em estudos anteriores pode estar relacionada ao número de passagens em cultura realizadas antes do sequenciamento. Os isolados M03 e M05 foram sequenciados logo nas primeiras passagens, minimizando a exposição às condições artificiais de cultivo. Sabe-se que passagens sucessivas *in vitro* podem induzir alterações no número de cópias cromossômicas em *Leishmania*, favorecendo o surgimento de polissomias (DUMETZ *et al.*, 2017). Dessa forma, o perfil predominantemente dissômico observado neste estudo pode refletir um estado genômico mais próximo ao encontrado *in vivo*.

Embora certos padrões de ploidia sejam conservados, a aneuploidia em *Leishmania* não constitui um fenômeno estático, mas é altamente dinâmica e dependente do ambiente e do estágio do parasito. Níveis elevados de aneuploidia foram observados em promastigotas mantidas *in vitro*, enquanto em amastigotas isoladas de hamsters ocorreu redução progressiva desse fenômeno, acompanhada pelo surgimento de novas polissomias (DUMETZ *et al.*, 2017). Além disso, as variações no número de cópias cromossômicas mostraram correlação com os níveis de transcritos correspondentes, sustentando a hipótese de que a aneuploidia em *Leishmania* constitui uma estratégia adaptativa para modular a dosagem gênica, sendo potencialmente relevante para a adaptação a pressões seletivas, como aquelas associadas ao hospedeiro e ao tratamento farmacológico (DUMETZ *et al.*, 2017; IANTORNO *et al.*, 2017.).

Leishmania spp. pode apresentar um perfil de mosaicismos aneuplóide, no qual diferentes células de uma mesma população clonal exibem combinações variadas de mono-, di- e trissomias cromossômicas (LACHAUD *et al.*, 2014; MANNAERT *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2020). Evidências obtidas a partir de abordagens experimentais e genômicas indicam que populações clonais de promastigotas podem conter diversidade cariotípica significativa, com a coexistência de múltiplos cariótipos distintos dentro de uma mesma população de promastigotas (STERKERS *et al.*, 2010; NEGREIRA *et al.*, 2021).

Esse cenário reflete a presença de populações mistas, caracterizadas pela ocorrência simultânea de diferentes subpopulações genômicas, o que resulta em elevada variabilidade fenotípica e pode influenciar diretamente processos como virulência e adaptação a estresses ambientais (SHAW *et al.*, 2016; NEGREIRA *et al.*, 2021). Estudos recentes, incluindo abordagens de alta resolução, demonstram que mesmo populações derivadas de um único clone pode rapidamente gerar milhares de cariótipos distintos, evidenciando que a aneuploidia em *Leishmania* é altamente dinâmica e intrínseca à biologia do parasito (NEGREIRA *et al.*, 2021). Nesse contexto, o mosaicismos cromossômico surge como um reservatório de diversidade genômica prontamente disponível para seleção, favorecendo a sobrevivência do parasito frente a diferentes desafios.

Adicionalmente, análises baseadas em genomas completos indicam que a variabilidade genética de *Leishmania* não se restringe ao genoma nuclear, abrangendo também diferenças no genoma mitocondrial, com impacto direto sobre o fenótipo dos isolados. Um estudo conduzido com isolados clínicos de *Leishmania infantum* do norte da

África demonstrou a existência de perfis distintos de variação nuclear e mitocondrial, bem como uma associação entre alterações no padrão do DNA mitocondrial (mtDNA) e a resistência aos antimoniais (BUSSOTTI *et al.*, 2020). Esses achados sugerem que a diversidade genômica observada pode atuar de forma complementar aos efeitos do mosaicismos de somia cromossômica, reforçando a noção de que múltiplos mecanismos genômicos contribuem de maneira integrada para os processos de adaptação e resistência.

Nesse sentido, embora a variação de somia represente um importante mecanismo adaptativo, ela nem sempre é suficiente, de forma isolada, para explicar fenótipos complexos, como a resistência a fármacos. Torna-se necessária, portanto, a consideração de outras fontes de variação genômica, incluindo componentes mitocondriais que normalmente têm sido negligenciados nas análises com sequenciamento de nova geração (NGS) (CAMACHO *et al.*, 2019; BUSSOTTI *et al.*, 2020).

No presente estudo, a análise conduzida com os isolados M03 e M05 concentrou-se exclusivamente no genoma nuclear e não incluiu a investigação do DNA do cinetoplasto (kDNA), característico dos tripanossomatídeos. Esse aspecto torna-se particularmente relevante à luz dos resultados obtidos, uma vez que os isolados analisados, apesar de apresentarem perfis fenotípicos contrastantes de suscetibilidade a fármacos, exibiram padrões de somia cromossômica notavelmente semelhantes. Dessa forma, a inclusão de análises voltadas ao genoma mitocondrial em estudos futuros pode fornecer informações adicionais importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares associados à resistência observada no isolado M03, complementando os achados baseados na análise do genoma nuclear.

Além das variações no número de cópias cromossômicas, a diversidade genômica em *Leishmania* manifesta-se também através de variantes de nucleotídeo único (SNPs) e variações estruturais, como inserções e deleções (indels). A análise da distribuição dessas variantes ao longo do genoma pode revelar regiões de instabilidade genômica e identificar potenciais marcadores moleculares associados a fenótipos específicos, como a resistência a fármacos.

A análise da distribuição de SNPs nos isolados M03 e M05, revelou uma distribuição heterogênea, com variação considerável no número de variantes entre os diferentes cromossomos, oscilando de 59 a 361 SNPs. Notavelmente, ambos os isolados apresentaram

padrão concordante de acúmulo de variantes, com os cromossomos 12, 22, 27 e 35 concentrando o maior número de SNPs. No isolado M03, esses cromossomos apresentaram 347, 361, 271 e 278 variantes, respectivamente, enquanto no isolado M05 foram identificadas 324, 351, 265 e 273 variantes (Figuras S4 e S5).

Esse padrão de acúmulo de variantes em cromossomos específicos encontra respaldo em estudos prévios com *Leishmania* spp. Carvalho *et al.* (2020), ao analisarem 30 genomas de isolados clínicos de *L. (L.) infantum* do Piauí e do Maranhão, identificaram que os cromossomos 12, 22, 27 e 36 exibiam a maior quantidade de variação (Figura 11). Notavelmente, esses mesmos cromossomos (12, 22, 27 e 36) concentraram o maior número de variantes nos isolados aqui analisados, reforçando a hipótese de que essas regiões representam *hotspots* de instabilidade genômica evolutivamente conservados no complexo *L. infantum/L. donovani*.

A análise de Carvalho *et al.* (2020) demonstrou que, após a normalização pelo tamanho dos cromossomos, apenas os cromossomos 12, 22 e 27 permaneceram em destaque, indicando que a acumulação de variantes neste caso ocorreu de forma desproporcional ao seu comprimento. Esse resultado sugere que a concentração de variantes não está relacionada apenas ao tamanho cromossômico ou ao número total de genes, mas possivelmente a pressões seletivas específicas e à presença de genes com funções biológicas críticas. Nesse contexto, o cromossomo 22 merece atenção especial por abrigar genes da família A2, amplamente associados ao processo de visceralização em *L. donovani*. Dessa forma, a elevada densidade de variantes observada nesse cromossomo pode ter implicações funcionais diretas na adaptação e na virulência do parasito no hospedeiro vertebrado (ZHANG *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2020).

Do ponto de vista funcional, a densidade de variantes também pode ser influenciada pela ploidia dos cromossomos. Episódios de monossomia reduzem a heterozigosidade, levando a uma menor densidade de SNPs, enquanto ampliações cromossômicas promovem o ganho de heterozigosidade e aumentam a densidade de variantes, pois cópias adicionais favorecem uma evolução mais flexível (SPÄTH *et al.*, 2025). Um exemplo recorrente é o cromossomo 31, cuja condição está associada ao acúmulo de polimorfismos e à manutenção de haplótipos distintos (conjuntos de variantes genéticas herdadas que podem conferir vantagens adaptativas específicas). Assim, a aneuploidia não apenas amplia a plasticidade genômica, mas também molda o repertório de variantes disponíveis para a seleção natural,

favorecendo a adaptação do parasito (CHEN *et al.*, 2012; SPÄTH *et al.*, 2025; FLORENCIO *et al.*, 2025).

Adicionalmente, a análise da densidade de SNPs em genes específicos pode revelar alvos preferenciais da diversificação adaptativa. Nesse contexto, o gene que apresentou maior densidade de SNPs em ambos os isolados foi o LINF_350010200, anotado como um putativo proteofosfoglicano (PPG3). Os proteofosfoglicanos constituem uma família de glicoconjugados altamente glicosilados que desempenham papéis centrais na biologia de *Leishmania*, estando envolvidos tanto na interação com o vetor flebotomíneo quanto na infecção do hospedeiro vertebrado. Em particular, *Leishmania* secreta um gel rico em PPGs conhecido como *Promastigote Secretory Gel* (PSG), o qual se acumula no intestino médio dos flebotomíneos e facilita a transmissão por meio da obstrução física do trato digestivo, promovendo a regurgitação de formas infectantes durante o repasto sanguíneo (ROGERS, 2012). Além de sua função na transmissão, PPGs podem conferir proteção aos promastigotos contra enzimas digestivas do vetor, aumentando a sobrevivência dos parasitos durante o desenvolvimento no intestino do inseto (ROGERS, 2012). Essas moléculas também modulam a resposta imune do hospedeiro vertebrado, influenciando a ativação de células como macrófagos e neutrófilos, e potencialmente favorecendo a persistência da infecção (ROGERS *et al.*, 2009; ROGERS, 2012).

A elevada variabilidade observada no LINF_350010200 nos isolados M03 e M05 pode refletir a importância adaptativa dessa classe de genes. Estudos genômicos em *Leishmania infantum* demonstram que genes associados a glicoconjugados de superfície, como os PPGs, são frequentemente variáveis entre diferentes isolados e regiões geográficas, sugerindo pressões seletivas decorrentes das interações com hospedeiros e vetores distintos (PATIÑO *et al.*, 2021). A combinação de densidade elevada de SNPs e possíveis variações no número de cópias em LINF_350010200 pode indicar que a modulação estrutural ou funcional dessa proteína contribui para a plasticidade fenotípica dos parasitos, influenciando características como a eficiência de colonização vetorial, a modulação de respostas imunes do hospedeiro e, possivelmente, aspectos da virulência ou adaptação a ambientes epidemiológicos específicos.

A análise comparativa do perfil genômico dos isolados M03 e M05 revelou que, apesar da alta similaridade em somia cromossômica e distribuição de SNPs, uma diferença estrutural marcante distingue esses dois isolados: a presença de uma deleção

subcromossômica de aproximadamente 12 kb no cromossomo 31 do isolado M03, ausente no isolado M05. Essa deleção afeta especificamente o locus MSL, removendo quatro genes (LINF_310031200, LINF_310031300-T1, LINF_310031400-T1 e LINF_310031500) que têm sido amplamente associados à suscetibilidade à miltefosina. Os genes deletados incluem ecto-nucleotidases (NUC1 e NUC2) envolvidas na suscetibilidade ao fármaco (CARNIELLI *et al.*, 2022). A perda dessas enzimas altera o metabolismo celular, levando ao aumento do conteúdo lipídico basal, incluindo o ergosterol, que pode funcionar como reservatório para a miltefosina, reduzindo sua eficácia. Além disso, estudos mostram que isolados portadores dessa deleção apresentam melhor capacidade de controlar desequilíbrios lipídicos e o acúmulo de óxido nítrico em macrófagos, o que sugere também um papel na modulação da resposta imune do hospedeiro (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2014; CARNIELLI *et al.*, 2022; BHUSAL *et al.*, 2025).

Interessantemente, essa deleção foi descrita como estável mesmo em um contexto de aneuploidia em mosaico, uma vez que abrange todas as cópias do cromossomo 31, indicando forte pressão seletiva favorecendo sua manutenção em populações do Brasil e de outros países da América Latina. Evidências apontam que a perda simultânea desses quatro genes ocorre provavelmente por recombinação homóloga entre elementos repetitivos adjacentes à região deletada, um mecanismo que favorece o surgimento recorrente dessa alteração em diferentes contextos (CARNIELLI *et al.*, 2018; SCHWABL *et al.*, 2021). Entretanto, apesar de sua relevância funcional, os fatores responsáveis pelo aparecimento dessa deleção em múltiplas regiões do Brasil permanecem desconhecidos. Sua abundância e distribuição geográfica ainda são pouco caracterizadas, mas sua presença consistente em isolados das Américas sugere que confere uma vantagem adaptativa, possivelmente associada ao aumento da transmissibilidade (SCHWABL *et al.*, 2021).

Estudos recentes indicam que parasitos portadores dessa deleção exibem fenótipos complexos: embora apresentem menor capacidade de infectar macrófagos e sobreviver a armadilhas extracelulares de neutrófilos, demonstram metaciclogênese aumentada e elevada taxa de colonização em vetores, favorecendo a disseminação populacional (BHUSAL *et al.*, 2025). Nesse sentido, análises mais aprofundadas da diversidade genética e do impacto epidemiológico de cepas portadoras da deleção são fundamentais para compreender quais pressões seletivas sustentam a manutenção desse genótipo e suas implicações para o controle da LV. A presença dessa deleção no isolado M03 não apenas reforça a associação direta entre

a perda do locus MSL e a resistência à miltefosina, mas também evidencia como modificações estruturais no genoma podem simultaneamente reduzir a patogenicidade no hospedeiro vertebrado e aumentar a transmissibilidade no vetor, configurando uma estratégia evolutiva complexa de adaptação do parasito.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo realizou uma análise genômica comparativa de dois isolados clínicos simpátricos de *L. infantum* provenientes do Maranhão, revelando diferenças genéticas pontuais marcantes que se refletem em perfis contrastantes de resposta a fármacos. Apesar da alta similaridade no padrão de somia cromossômica, com ambos os isolados apresentando perfil predominantemente dissômico em 34 dos 36 cromossomos, um aumento de somia no cromossomo 20 do isolado resistente e tetrassomia conservada do cromossomo 31, foi identificada uma diferença estrutural crítica: a deleção do locus MSL no isolado resistente M03. A conservação evolutiva da tetrassomia do cromossomo 31, observada nos dois isolados e corroborada por estudos com diferentes populações geográficas, reforça a importância funcional dessa alteração.

A confirmação da deleção de aproximadamente 12 kb no locus MSL do isolado M03, envolvendo quatro genes incluindo as ecto-nucleotidases NUC1 e NUC2, estabelece uma associação direta com o fenótipo de resistência à miltefosina observado previamente. Essa alteração estrutural, mantida de forma estável em todas as cópias do cromossomo 31, demonstra forte pressão seletiva favorecendo sua manutenção. Os achados são consistentes com evidências de que parasitos portadores dessa deleção apresentam fenótipos complexos, com metaciclogênese aumentada e maior capacidade de colonização em vetores, configurando uma estratégia evolutiva que favorece a transmissibilidade em detrimento da patogenicidade no hospedeiro vertebrado.

A distribuição de SNPs revelou padrão concordante de acúmulo de variantes nos cromossomos 12, 22, 27 e 35 em ambos os isolados, consistente com estudos prévios que identificam essas regiões como *hotspots* de instabilidade genômica em *L. infantum*. A concentração desproporcional de variantes nesses cromossomos, particularmente no cromossomo 22 que abriga genes da família A2 associados à visceralização, sugere que pressões seletivas específicas e a presença de genes com funções biológicas críticas moldam o repertório de variação genômica disponível para adaptação do parasito.

Os resultados obtidos demonstram que a resistência a fármacos em *Leishmania* não pode ser atribuída exclusivamente a variações de ploidia, mas resulta de uma combinação de mecanismos genômicos que incluem modificações estruturais como a deleção do locus MSL.

As demais variantes descritas para o isolado M03 no presente trabalho representam novos potenciais marcadores moleculares que deverão ser investigados em estudos futuros, após confirmação utilizando um número maior de amostras.

Esses resultados destacam a importância da análise genômica como ferramenta indispensável para compreender a plasticidade genética em *L. (L.) infantum*. A capacidade do parasito de acumular variações estruturais e pontuais, moduladas por aneuploidia e eventos de recombinação, assegura sua notável resiliência frente a diferentes pressões seletivas, incluindo a imunidade do hospedeiro e o uso de fármacos. Este trabalho reforça a necessidade de abordagens genômicas integradas para a compreensão dos mecanismos de resistência a fármacos em leishmanioses, considerando não apenas o genoma nuclear mas também componentes mitocondriais que podem contribuir de forma complementar para fenótipos complexos. Nesse contexto, monitorar a diversidade genômica e a distribuição de variantes entre isolados clínicos é essencial para o desenho de estratégias terapêuticas mais eficazes e para o controle da LV no Brasil, sobretudo diante da crescente preocupação com a resistência medicamentosa. A caracterização molecular da deleção do locus MSL em isolados do Maranhão contribui para o conhecimento sobre a distribuição geográfica e abundância desse genótipo no Brasil, fornecendo subsídios importantes para o desenvolvimento de estratégias de vigilância epidemiológica e controle da leishmaniose visceral nas Américas.

8. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. *et al.* Comparative transcriptomic analysis of antimony resistant and susceptible *Leishmania infantum* lines. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 600, 2020.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, 2016.
- BHARADAVA, K.; *et al.* Genomic Insight of *Leishmania* Parasite: In-Depth Review of Drug Resistance Mechanisms and Genetic Mutations. **ACS Omega**, v. 09, n. 11, p. 12500–12514, 2024.
- BRASIL. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 1. ed., rev. e Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BROTHERTON, M. *et al.* Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.
- BOITÉ, M. C. *et al.* Trans-Atlantic Spillover: deconstructing the ecological adaptation of *Leishmania infantum* in the Americas. **Genes**, v. 11, n. 4, 2020.
- BUSSOTTI, G. *et al.* Nuclear and mitochondrial genome sequencing of North-African *Leishmania infantum* isolates from cured and relapsed visceral leishmaniasis patients reveals variations correlating with geography and phenotype. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 10, 2020.
- BHUSAL, C. K.; SINHA, S.; KAUR, D.; SEHGAL, R. Unravelling drug resistance in leishmaniasis: genomic adaptations and emerging therapies. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 12, 2025.
- CAMACHO, E. *et al.* *Leishmania* mitochondrial genomes: maxicircle structure and heterogeneity of minicircles. **Genes**, Basel, v. 10, n. 10, p. 758, 26 set. 2019.
- CARNIELLI, J.B.T. *et al.* A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBioMedicine**, v. 36, p. 83–91, 2018.

CARNIELLI, J.B.T. *et al.* 3'Nucleotidase/nuclease is required for *Leishmania infantum* clinical isolate susceptibility to miltefosine. **EBioMedicine**, v. 86, p.1-18, 2022.

CARVALHO, K. *et al.* Application of next generation sequencing (NGS) for descriptive analysis of 30 genomes of *Leishmania infantum* isolates in Middle-North Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, 2020.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications Biology**, Londres, v. 5, p. 305, 2022.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open Biology**, The Royal Society. [S.L.], v. 9, n. 6, jun. 2019.

CHEN, G.; BRADFORD, W. D.; SEIDEL, C. W.; LI, R. Whole chromosome aneuploidy: big mutations drive adaptation by phenotypic leap. **BioEssays**, v. 34, n. 10, p. 893-900, 2012.

COELHO, Ana Jessica Sousa. **Análise do locus de sensibilidade à Miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania infantum* do Maranhão**. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Luís, 2024.

CROFT, S.; COOMBS, G. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

DUMETZ, F. *et al.* Modulation of aneuploidy in *Leishmania donovani* during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. **mBio**, v. 8, n. 3, 2017.

DECUYPERE, S.; *et al.* Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Natural *Leishmania* Populations Vary with Genetic Background. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 06, n. 02, 2012.

DOWNING, T. *et al.* Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2143-2156, 2011.

FLORÊNCIO, M. *et al.* Gene deletion as a possible strategy adopted by New World *Leishmania infantum* to maximize geographic dispersion. **PLoS Pathogens**, v. 21, n. 3, p. e1012938, 2025.

FRANSEN, S. U. *et al.* Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. **eLife**, v. 9, 2020.

HENDRICKX, S. *et al.* Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, 2017.

HERRERA-NÁJERA, C. *et al.* Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. **PROTEOMICS**, v. 9, 2009.

IANTORNO, S. A. *et al.* Gene expression in *Leishmania* is regulated predominantly by gene dosage. **mBio**, v. 8, n. 5, 2017.

IMAMURA *et al.* Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **eLife**, v. 5, p. 1-39, 2016.

KAMRAN, M.; BHATTACHARJEE, R.; DAS, S.; MUKHERJEE, S.; ALI, N. The paradigm of intracellular parasite survival and drug resistance in leishmanial parasite through genome plasticity and epigenetics: Perception and future perspective. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 2023.

KRUPANSHI, B. *et al.* Genomic insight of *Leishmania* parasite: in-depth review of drug resistance mechanisms and genetic mutations. **ACS Omega**, v. 9, p. 12500-12514, 2024.

KUHLS, K. *et al.* Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent **Old World origin**. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, 2011.

LAFFITTE, M. C.; LEPROHON, P.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**, v. 5, p. 1-10, 2016.

LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; KUK, N.; MORELLE, C.; CROBU, L.; MERLIN, G.; BASTIEN, P.; PAGÈS, M.; STERKERS, Y. Constitutive mosaic aneuploidy is a unique

genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2014.

LAKSHMI, B.; WANG, R.; MADHUBALA, R. *Leishmania* genome analysis and high-throughput immunological screening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 32, n. 30, p. 3816-3822, 2014.

LEBLOIS, R.; KUHLS, K.; FRANÇOIS, O.; SCHÖNIAN, G.; WIRTH, T. Guns, germs and dogs: on the origin of *Leishmania chagasi*. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 1091–1095, 2011.

MANNAERT, A.; DOWNING, T.; IMAMURA, H.; DUJARDIN, J. Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 370-376, 2012.

MARTÍ-CARRERAS, J. *et al.* Identification of *Leishmania infantum* epidemiology, drug resistance and pathogenicity biomarkers with nanopore sequencing. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, 2022.

MCGWIRE, B.S., SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n.1, p. 7–14, 2014.

MONDELAERS, A. *et al.* Genomic and molecular characterization of miltefosine resistance in *Leishmania infantum* strains with either natural or acquired resistance through experimental selection of intracellular amastigotes. **PLoS ONE**, v. 11, 2016.

MOORE, E.M.; LOCKWOOD, D.N. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 02, n. 02, p. 151-158, 2010.

NEVADO, P. *et al.* A telomeric cluster of antimony resistance genes on chromosome 34 of *Leishmania infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5262-5275, 2016.

NEGREIRA, G. H. *et al.* High throughput single-cell genome sequencing gives insights into the generation and evolution of mosaic aneuploidy in *Leishmania donovani*. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 1, p. 293-305, 10 dez. 2021.

OLIVEIRA, K. W. *et al.* Distribution and occurrence of *Leishmania infantum chagasi* causing canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 16, 2025.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). *Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas*. n. 13, dezembro 2024. Washington, D.C.: OPAS, 2024. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/63166>. Acesso em: 07 de Janeiro de 2026.

PATIÑO, L. H. *et al.* Revisiting the heterogeneous global genomic population structure of *Leishmania infantum*. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 9, 2021.

PEACOCK, C.S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, p. 839–847, 2007.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, 2017.

ROGERS, M.; KROPF, P.; CHOI, B. S.; DILLON, R.; PODINOVSKAIA, M.; BATES, P.; MÜLLER, I. 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, 2009.

ROGERS, M. E. *et al.* The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and mammalian host infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 223, 2012.

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.

ROGERS, M. B. *et al.* Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 1, 2014.

SANTOS, Gustavo de Almeida. *Aspectos clínicos, falha de tratamento e recidivas na Leishmaniose Visceral: uma abordagem bibliográfica e experimental para relacionar esses fatores com a tolerância medicamentosa de isolados clínicos de Leishmania infantum*. 118 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/4322>.

- SANTOS, G. A.; *et al.* Systematic Review of Treatment Failure and Clinical Relapses in Leishmaniasis from a Multifactorial Perspective: Clinical Aspects, Factors Associated with the Parasite and Host. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, p. 1-24, 2023.
- SCHWABL, P.; BOITÉ, M. C.; BUSSOTTI, G. *et al.* Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas. **Communications Biology**, v. 4, n. 139, 2021.
- STERKERS, Y. *et al.* FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 274-283, 2010.
- STERKERS, Y.; CROBU, L.; LACHAUD, L.; PAGÈS, M.; BASTIEN, P. Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 429-435, 2014.
- SPÄTH, GERALD F. *et al.* *Leishmania* genomic adaptation: more than just a 36-body problem. **Trends in Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 441-448, 2025
- SHAW, C. *et al.* In vitro selection of miltefosine resistance in promastigotes of *Leishmania donovani* from Nepal: genomic and metabolomic characterization. **Molecular Microbiology**, v. 99, p. 1134–1148, 2016.
- SHAIK, J. S. *et al.* *Leishmania* sexual reproductive strategies as resolved through computational methods designed for aneuploid genomes. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 167, 2021.
- TEIXEIRA, D. G.; *et al.* Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. **International Journal of Parasitology**, v. 47, n. 10-11, p. 655-665, 2017.
- THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 2, p. 253-272, 2020.
- TORRES-GUERRERO, E.; *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 26 maio 2017.
- VALDIVIA, H. O. *et al.* Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 715, 2015.

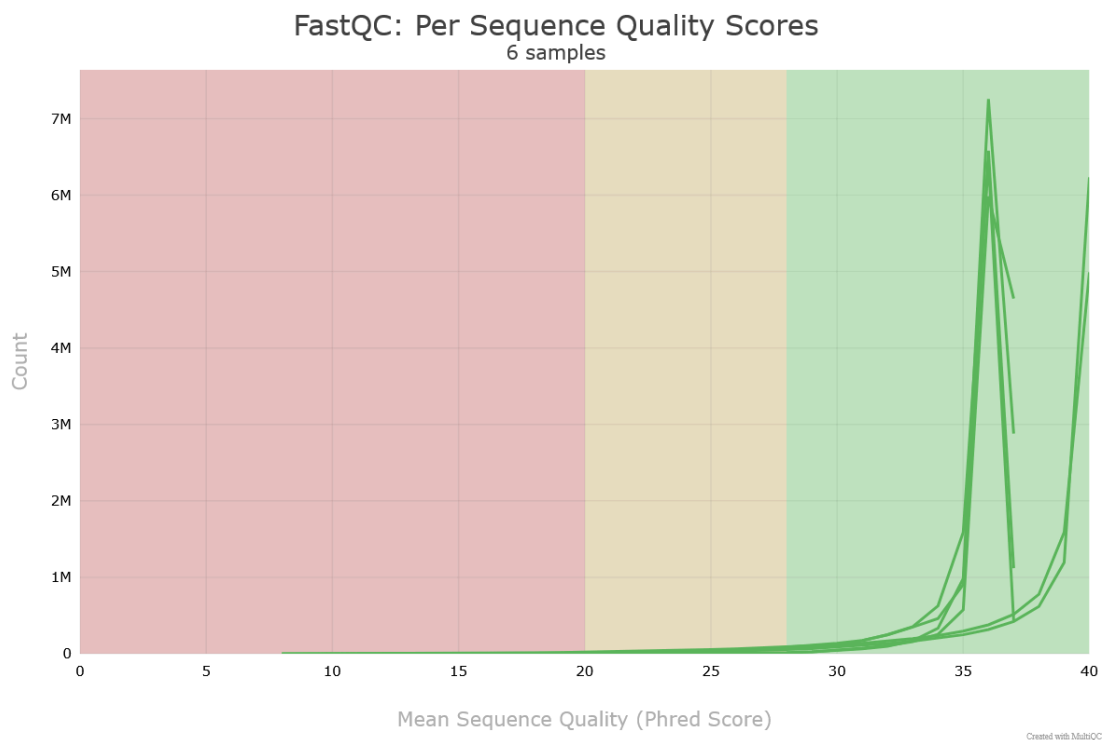
ZACKAY, A.; COTTON, J. A.; SANDERS, M.; HAILU, A.; NASEREDDIN, A.;
WARBURG, A.; JAFFE, C. L. Broad genome-wide comparison of *Leishmania donovani*
strains reveals differences potentially related to parasite survival. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 1,
2018.

ZHENG, Z. *et al.* Integrative genomic, proteomic and phenotypic studies of *Leishmania*
donovani strains revealed genetic features associated with virulence and antimony-resistance.
Parasites & Vectors, v. 13, 2020.

ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in
Leishmania donovani: involvement of A2 in visceralization during infection. **Molecular**
Microbiology, v. 39, n. 4, p. 935-948, 2001.

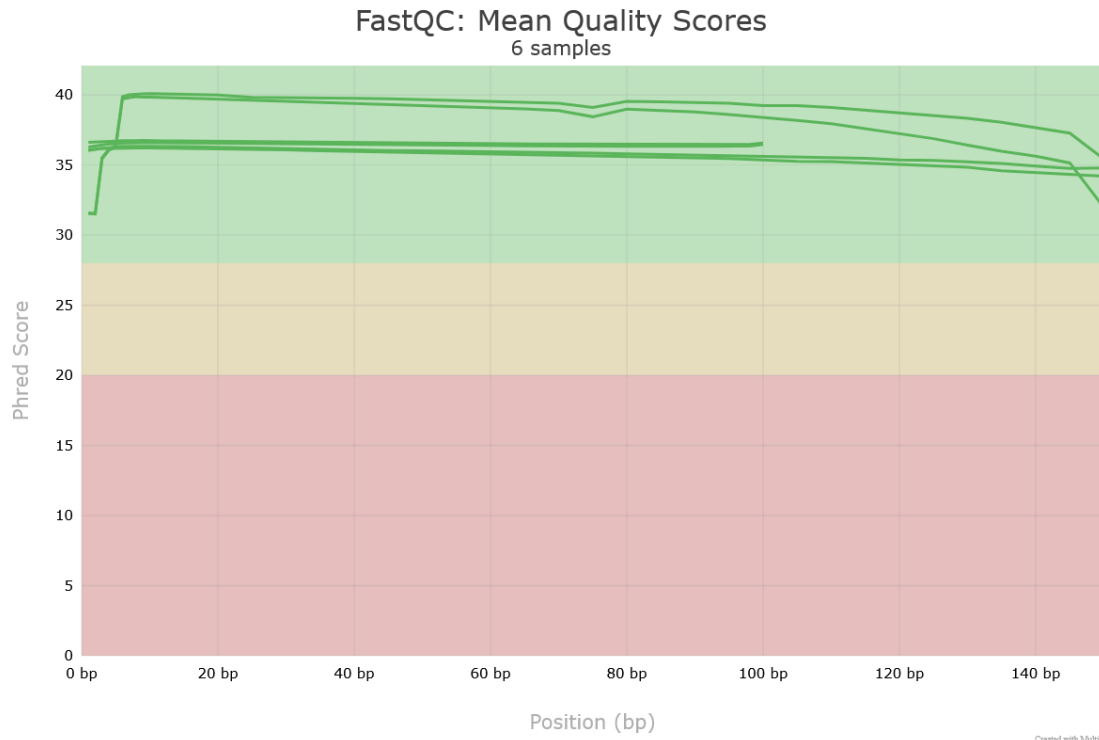
APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1 - Distribuição de qualidade por sequência



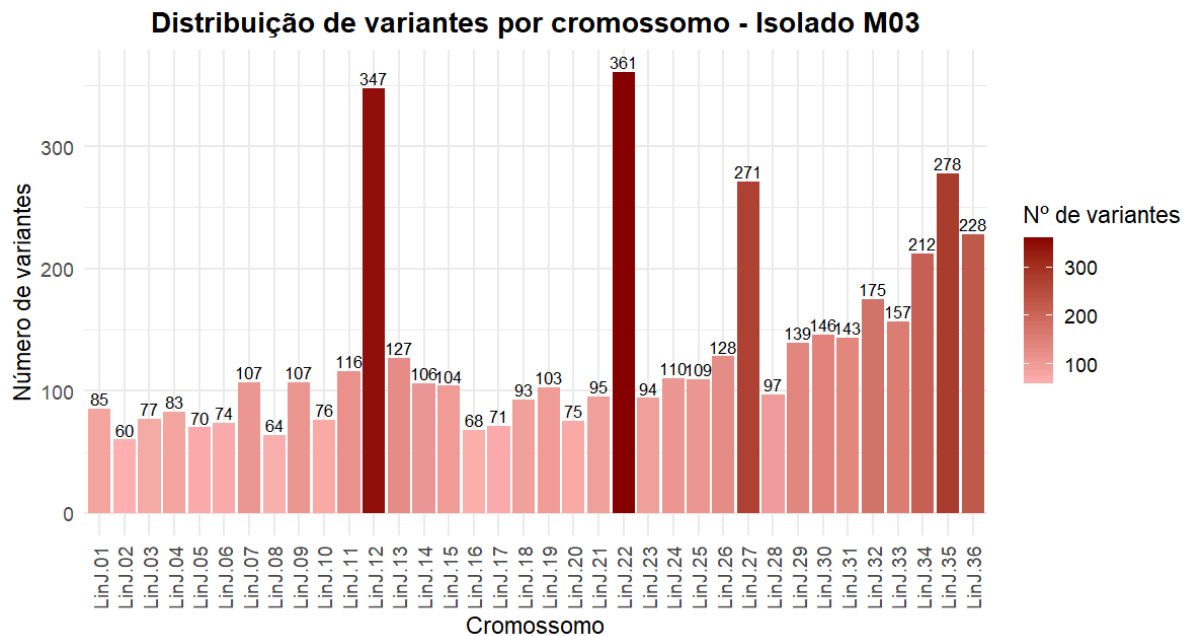
Distribuição das pontuações médias de qualidade *Phred* por sequência para os isolados M03, M05 e referência JPCM5. A maioria das ~7 milhões de *reads* apresenta qualidade elevada (*Phred* 35-40), com acurácia >99,9%. Ausência de *reads* de baixa qualidade (*Phred* <20) confirma confiabilidade dos dados. **Fonte:** *FastQC/MultiQC*.

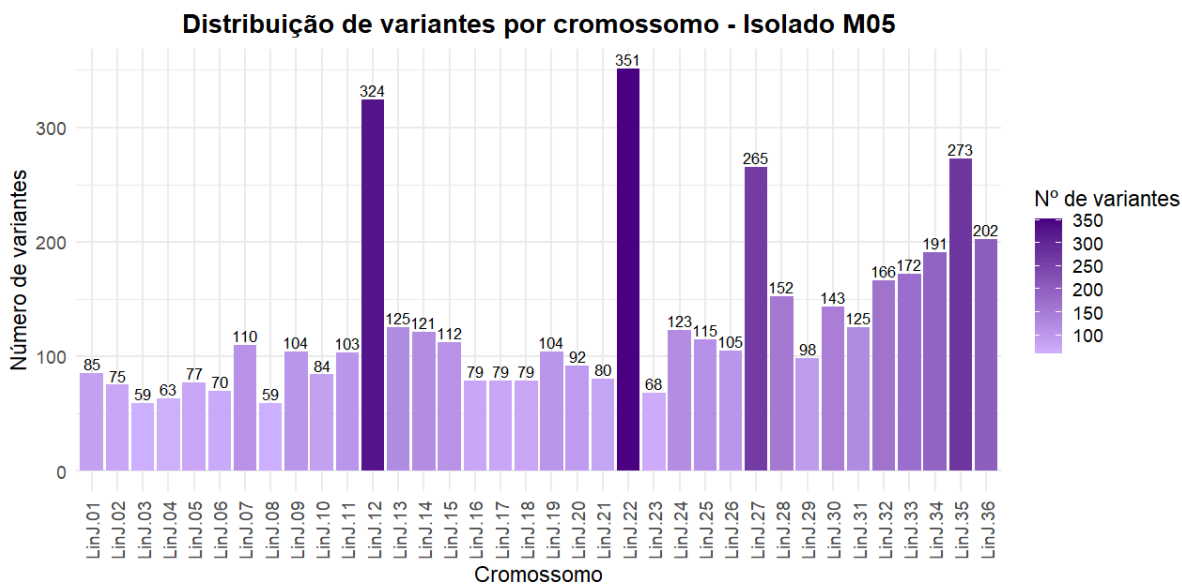
Figura S2 - Pontuações médias de qualidade por posição de base



Pontuações médias de qualidade *Phred* ao longo das posições de base das sequências para os isolados M03, M05 e genoma de referência JPCM5. Valores >28 (verde) indicam alta qualidade. Todas as amostras mantiveram escores >35, demonstrando excelente qualidade do sequenciamento. **Fonte:** *FastQC/MultiQC*.

Figuras S4 e S5 - Distribuição de variantes genômicas por cromossomo nos isolados M03 e M05





Número de variantes identificadas em cada um dos 36 cromossomos dos isolados clínicos M03 e M05. A distribuição não uniforme indica a existência de regiões genômicas potencialmente mais suscetíveis a eventos mutacionais, possivelmente associadas a *hotspots* de instabilidade. **Fonte:** Elaborada pela autora no *RStudio Posit*, pacote *ggplot2*.