

# 36º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFRN – CICT 2025



## 36º cict

Planeta Água: a cultura oceânica  
para enfrentar as mudanças  
climáticas no meu território.

# ANAIS

# **EXPEDIENTE**

## **APRESENTAÇÃO**

O Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica (CICT) é um evento aberto à comunidade no qual todos os aproximadamente 1.700 alunos de Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN (bolsistas e voluntários) apresentam os resultados de suas pesquisas desenvolvidas ao longo de um ano, como cumprimento de um plano de trabalho elaborado e orientado por um professor/pesquisador do quadro permanente da Instituição.

O CICT está entre as ações inseridas no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN, que possui entre seus objetivos: a) Contribuir para a formação e engajamento de recursos humanos em atividades de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação; b) Contribuir para a formação científica de recursos humanos que se dedicarão a qualquer atividade profissional; e c) Contribuir para a formação de recursos humanos que se dedicarão ao fortalecimento da capacidade inovadora das empresas no País.

A 36ª edição do Congresso teve como tema “Planeta Água: a cultura oceânica para enfrentar as mudanças climáticas no meu território”, estando alinhada aos 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 da ONU. Ao submeter os trabalhos ao Congresso, os alunos indicaram os objetivos da Agenda 2030 aos quais suas pesquisas estavam relacionadas. Essa iniciativa visa estimular a pesquisa científica e tecnológica voltada para a busca por soluções para os desafios sociais contemporâneos. Em uma etapa inicial do CICT, denominada Mostra de Trabalhos e Vídeos de Ciência, Tecnologia e Inovação, foram realizadas as apresentações dos trabalhos submetidos pelos participantes do evento. As apresentações ocorreram de forma assíncrona, por meio de arquivos digitais (trabalho completo e vídeo), sendo disponibilizadas não só aos avaliadores do congresso pelos Sistemas da UFRN, mas também ao público em geral por meio do site do evento ([www.cic.propesq.ufrn.br](http://www.cic.propesq.ufrn.br)). Após essa etapa inicial, que ocorreu sob o formato virtual, os 48 melhores trabalhos do evento foram selecionados para apresentação oral em uma etapa complementar do congresso que ocorreu de forma presencial.

Os alunos concorreram ao 9º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN, que foi instituído pela Pró-Reitoria de Pesquisa em 2017 para reforçar as ações dos programas institucionais de iniciação científica e tecnológica. O prêmio contemplou as categorias Trabalho Destaque de Iniciação Científica e Tecnológica e Vídeo Destaque de Iniciação Científica e Tecnológica) e na subcategoria de Inovação. Os premiados foram agraciados com bolsas mensais de até R\$ 1100,00 (mil e cem reais) durante o período de um ano. Os orientadores dos alunos premiados adquiriram precedência em relação aos demais para efeitos de concorrência no Edital de Bolsas de Pesquisa da UFRN em 2026.

Ainda em 2025, a Pró-Reitoria de Pesquisa realizou a 7ª Edição do Prêmio Pesquisador Destaque da UFRN, certame instituído em 2019 e que é concedido anualmente aos pesquisadores da instituição que tenham apresentado relevantes contribuições para o desenvolvimento da ciência em cada uma das três grandes áreas do conhecimento: Ciências da Vida; Ciências Exatas, da Terra e Engenharias; e Ciências Humanas e Sociais, Letras e Artes. Além de troféu e certificado, todos os premiados foram contemplados com auxílio no valor de R\$ 10.000,00 (dez mil reais) para custear despesas específicas, discriminadas em edital, e tiveram a oportunidade de compartilhar suas experiências com os participantes do CICT 2025 em uma mesa redonda.

O congresso cumpriu três funções valiosas para o desenvolvimento da ciência na instituição: inserção dos discentes em um ambiente acadêmico de publicação e apresentação dos resultados da pesquisa; divulgação científica por meio dos vídeos que utilizam uma linguagem científica, porém acessível a todos; e, por fim, a popularização da ciência.

## PROGRAMAÇÃO

### Outubro – 2025

**15/10** Divulgação da lista dos pré-selecionados para concorrer ao 9º Prêmio Destaque na Iniciação Científica e Tecnológica da UFRN

### Novembro – 2025

**03/11** Abertura oficial do evento

**03/11 a 07/11** CICT 2025 – Etapa presencial

**04/11 a 06/11** Sessões de Apresentações Orais

**07/11** Cerimônia de premiação e encerramento do evento

**IMT**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**

CÓDIGO: SB0346

AUTOR: MARIA LUIZA DOS SANTOS

COAUTOR: DIEGO GOMES TEIXEIRA

ORIENTADOR: SELMA MARIA BEZERRA JERONIMO

TÍTULO: Análise genômica comparativa em *Leishmania infantum*: implicações da aneuploidia na resistência a fármacos

### Resumo

A *Leishmania infantum* apresenta elevada plasticidade genômica, favorecendo adaptação a diferentes pressões seletivas, incluindo terapias medicamentosas. Alterações no número de cópias gênicas (CNVs) estão associadas a fenótipos de resistência, influenciando a resposta aos tratamentos. Este estudo teve como objetivo caracterizar variações do conteúdo genômico de *L. infantum* em diferentes fenótipos, com ênfase nas CNVs e seus impactos funcionais. Trata-se de uma investigação exploratória, baseada em 410 bibliotecas públicas de sequenciamento paired-end, com cobertura mínima de 30x. As análises incluíram alinhamento ao genoma de referência (BWA), estimativa de ploidia (Samtools), cálculo do desvio da mediana e teste de Mann-Whitney ( $p < 0,001$ ) para seleção de genes significativos. Em seguida, realizou-se análise de enriquecimento funcional na plataforma STRING. Foram identificados 3.532 genes com CNVs significativas, dos quais 70,5% exclusivos do grupo resistente, destacando-se nos cromossomos 12, 23 e 26. A análise funcional revelou predominância de genes relacionados a processos metabólicos e funções moleculares críticas à sobrevivência, incluindo fatores de virulência como GP63, HSP70 e OPB. Conclui-se que a plasticidade genômica, sobretudo pela amplificação gênica, constitui o principal mecanismo de resistência em *L. infantum*, fornecendo subsídios para a compreensão dos processos de virulência e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Palavras-chave: *Leishmania Infantum*. Plasticidade genética. Resistência a fármacos.

TITLE: Comparative Genomic Analysis in *Leishmania infantum*: Implications of Aneuploidy in Drug Resistance.

### Abstract

*Leishmania infantum* exhibits high genomic plasticity, favoring adaptation to different selective pressures, including drug therapies. Copy number variations (CNVs) are associated with resistance phenotypes, influencing treatment responses. This study aimed to characterize genomic content variations in *L. infantum* across different phenotypes, with emphasis on CNVs and their functional impacts. It is an exploratory investigation based on 410 public paired-end sequencing libraries, with a minimum coverage of 30x. Analyses included alignment to the reference genome (BWA), ploidy estimation (Samtools), calculation of the median deviation, and the Mann-Whitney test ( $p < 0.001$ ) for the selection of significant

genes. Subsequently, functional enrichment analysis was performed using the STRING platform. A total of 3,532 genes with significant CNVs were identified, 70.5% of which were exclusive to the resistant group, particularly enriched in chromosomes 12, 23, and 26. Functional analysis revealed a predominance of genes related to metabolic processes and molecular functions critical for survival, including virulence factors such as GP63, HSP70, and OPB. In conclusion, genomic plasticity, mainly through gene amplification, represents the primary mechanism of resistance in *L. infantum*, providing insights into virulence processes and supporting the development of more effective therapeutic strategies.

**Keywords:** Leishmania infantum. Genetic plasticity. Drug resistance.

## Introdução

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas de distribuição global, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Estima-se que sejam endêmicas em cerca de 92 países, expondo aproximadamente 1 bilhão de pessoas ao risco de infecção (Ruiz-Postigo et al., 2021). Clinicamente, apresentam-se em três formas principais: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), variando conforme a espécie envolvida e as condições do hospedeiro (Sutter et al., 2017). Mais de 20 espécies estão implicadas na infecção, distribuídas em cinco complexos (*L. donovani*, *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. hertigi* e *L. braziliensis*) (Pillai et al., 2012). A LC, frequentemente associada a *L. major*, resulta em ulcerações cutâneas, enquanto a LMC, relacionada a *L. mexicana* ou *L. braziliensis*, provoca lesões desfigurantes em mucosas. Já a LV, a forma mais grave, é causada principalmente por *L. infantum* e *L. donovani*, levando a manifestações como hepatomegalia, esplenomegalia, febre e perda de peso (Leithner et al., 2017). No Brasil, *L. infantum* é responsável por cerca de 90% dos casos urbanos e periurbanos de LV (Lima et al., 2017). O genoma de *L. infantum* é composto por 36 cromossomos (Britto et al., 1998). Inicialmente descrito como predominantemente diploide (Iovannisci & Beverley, 1989), foi posteriormente caracterizado pela presença de trissomias e pela aneuploidia em mosaico, fenômeno recorrente no gênero *Leishmania* (Sunkin et al., 2000; Iourov et al., 2008). Essa plasticidade genômica, somada a outras variações como inserções/deleções (INDELs) e variações no número de cópias gênicas (CNVs), desempenha papel central na adaptação do parasito, inclusive à pressão seletiva imposta por fármacos (Black et al., 2023). Alterações no conteúdo gênico são frequentemente associadas à diversidade fenotípica e à resistência, configurando *Leishmania* como modelo de plasticidade genética (Sterkers et al., 2011). A patogenicidade do parasito relaciona-se à expressão de fatores de virulência, moléculas cuja ausência resulta em fenótipo avirulento ou atenuado, enquanto sua reintrodução restaura a virulência (Kubar & Fragaki, 2006). Esses fatores modulam negativamente a resposta imune, favorecendo a invasão e sobrevivência intracelular (Turco; Späth; Beverley, 2001). A literatura destaca exemplos como a deleção das cisteínas proteases B em *L. mexicana*, que reduziu em 80% a infectividade em macrófagos (Mottram et al., 1996), e a família multigênica A2, essencial para o tropismo visceral, presente em múltiplas cópias em espécies causadoras de LV, mas em cópia única nas associadas à LC (McCall; Matlashewski, 2010). A plasticidade genômica observada em *Leishmania* spp. resulta em variação nos fenótipos clínicos, afetando desde a capacidade de invasão celular até a evasão da resposta imune (Sinha et al., 2018; Kamran et al., 2023). Entre os mecanismos associados, destacam-se a aneuploidia em mosaico e as CNVs, que modulam a expressão gênica e conferem heterogeneidade genética e fenotípica. Dessa forma, a variação do conteúdo gênico é amplamente reconhecida como fator determinante na adaptação e na resistência aos fármacos empregados no tratamento das leishmanioses (Lypaczewski et al., 2018). Apesar dos avanços, não há vacinas disponíveis para humanos ou

reservatórios, e os fármacos existentes apresentam toxicidade significativa, além de enfrentarem o desafio da resistência mediada pela variabilidade genética do parasito (Parashar; Mukhopadhyay, 2017). Assim, torna-se necessário compreender mais profundamente a relação entre plasticidade genômica e fenótipos da doença. Nessa perspectiva, nosso objetivo é analisar o conteúdo genômico de *L. infantum* a partir de dados públicos, buscando identificar padrões de variação genética associados aos diferentes fenótipos. Avaliamos genes, cromossomos e intervalos cromossômicos, partindo da hipótese de que a variação do conteúdo gênico desempenha papel central na determinação da diversidade fenotípica das leishmanioses.

## Metodologia

**Biblioteca de dados biológicos de *L. infantum*** Os dados biológicos foram obtidos do Sequence Read Archive (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), repositório de dados brutos de sequenciamento de próxima geração que integra o conjunto de recursos ofertados pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como critério de inclusão, foram consideradas apenas bibliotecas de estudos com sequências de DNA para *L. infantum*, sob termo de pesquisa “*Leishmania Infantum*” e taxonomyID: 5671, obtendo-se como resultado preliminar um total de 1.053 bibliotecas. Se detivemos também a reunir as informações acerca de identificadores dos respectivos estudos, como accession, run, instrument, e layout, bem como título e breve resumo a caráter de identificação para etapa de correlação dos diferentes fenótipos. A representação das informações reunidas estão sumarizadas no quadro abaixo (Quadro 1).

### Triagem e processamento das bibliotecas:

Após a identificação inicial das 1.053 bibliotecas, realizamos a exclusão daquelas que não atendiam aos critérios do estudo, resultando em 971 bibliotecas selecionadas. O download foi feito pelo SRA Toolkit em ambiente Linux, com arquivos em formato fastq, contendo reads e escores de qualidade. As sequências foram mapeadas ao genoma de referência de *L. infantum* (JPCM5 – ASM287v2) com BWA, avaliadas no fastp e processadas com Samtools para ordenação e remoção de duplicatas. Das 971 bibliotecas, 470 atenderam ao limite de cobertura global de 30x. Após filtros adicionais, incluindo descarte de bibliotecas single e de processamentos não concluídos, obtivemos um total final de 410 bibliotecas válidas e do tipo paired, utilizadas para as análises de cobertura (depth) e estimativa de ploidia (Figura 1).

### Cálculo de profundidade:

A profundidade caracteriza o quantitativo de reads que envolvem cada região de um genoma com base no mapeamento. Para esse fim utilizamos o Samtools depth, que nos fornece dados de saída com o número de reads alinhadas por cada base do genoma.

### Estimativa de ploidia:

A ploidia foi estimada com base na abordagem de Downing et al (2011), utilizando a profundidade mediana por cromossomo normalizada pela profundidade mediana do genoma (Equação 1), calculada por meio de uma função implementada no software R. Onde:  $s$  = profundidade de leitura cromossômica normalizada ou somia;  $M_c$  = profundidade mediana de leitura normalizada por cromossomo;  $M_g$  = profundidade de leitura mediana do genoma.

### Cobertura global:

A cobertura global quantifica o valor médio de vezes que cada base foi sequenciada (Equação 2). Em geral, a literatura considera a utilização de dados de sequenciamento com cobertura superior a 30x para investigar variações genômicas como o ideal (Negreira et al., 2022). Percebeu-se a necessidade de desconsiderar as bibliotecas de reads longa por não apresentarem uniformidade no comprimento das reads.

Distribuição fenotípicas das bibliotecas:

Em consequência dos diversos critérios utilizados para filtragem de qualidade das bibliotecas, das 1.053 bibliotecas inicialmente disponíveis, 410 atenderam aos critérios de qualidade e foram incluídas na análise de variação genômica. Dessas, 336 correspondem ao grupo controle, incluindo 54 humanas, 44 caninas e 238 com origem desconhecida, enquanto 74 pertencem a estudos de resistência a diversos fármacos usados no tratamento das leishmanioses, como antimônio, alopurinol, anfotericina, miltefosina, paromomicina, fluorouracil, terbinafina e tiofeno (Figura 2).

Desvio da mediana:

A partir da análise de cobertura cromossômica, foi calculado o desvio da mediana ( $D_m$ ) como a diferença entre a mediana de cada intervalo cromossômico (mil pares de bases dos respectivos cromossomos) e a mediana global do cromossomo. As amostras foram então associadas aos fenótipos “controle” e “resistência”, determinando-se a média dos desvios por intervalo cromossômico e fenótipo e a razão dessas médias entre os grupos, seguido da aplicação do logaritmo na base 2 (Equação 3). Onde:  $M_d \text{ resistência} = \text{Média dos desvios por intervalos cromossômico do grupo resistência}$ ;  $M_d \text{ controle} = \text{Média dos desvios por intervalos cromossômico do grupo controle}$ ;

Crítérios para identificação de variação no número de cópias:

Para identificar a associação da alteração do conteúdo gênico nas respectivas posições que os genes ocupam dentro do genoma de *Leishmania*, utilizamos informações coletadas pelo NCBI acerca dos identificadores genéticos e estabelecemos dois critérios para classificação de genes como estatisticamente significativos: O valor absoluto do  $\log_2$  da razão deve ser maior ou igual a 1 ( $|\log_2(\text{razão})| \geq 1$ ); O p-valor do teste de Mann-Whitney, aplicado sobre os desvios da mediana entre os grupos “controle” e “resistência”, deve ser inferior a 0,001 ( $p < 0,001$ ), considerando como amostras independentes.

## Resultados e Discussões

Estimativa do conteúdo cromossômico em *L. infantum*:

A análise do número de cópias cromossômicas do genoma de *L. infantum*, considerando fenótipos derivados de amostras provenientes de estudos de resistência e de amostras não expostas a fármacos, constituiu o objetivo central do relatório anterior, no qual obtivemos resultados exitosos e respaldados pela literatura científica. A partir desse achado, aqui resgatado para favorecer a compreensão das etapas subsequentes da pesquisa, avançamos para uma análise mais específica, com o intuito de identificar de que forma as variações de ploidia (número de cópias cromossômicas) se refletem no número de cópias gênicas e como esses achados contribuem para entender os mecanismos envolvidos no processo de resistência a fármacos em *Leishmania*. Esse achado impulsionou a construção dos resultados exibidos a seguir. A estimativa do número de cópias cromossômicas em cada biblioteca está representada no heatmap (Figura 3), que possibilita o agrupamento hierárquico das amostras segundo a similaridade de seus conteúdos. Embora a análise inicial tenha definido dois

grupos principais (controle e resistência), o gráfico evidencia a formação de múltiplos agrupamentos. No grupo controle, localizado à esquerda, observa-se predominância de perfil diplóide, exceto no cromossomo 31, além de variações pontuais para triplóide em cromossomos como 3, 6, 8, 11, 12, 20, 23, 26, 33 e 35. Já as amostras resistentes, posicionadas mais centralmente, não apresentam uniformidade, mas revelam cromossomos com maior variação de cópias, especialmente 3, 12, 13, 22, 26 e 33, incluindo tetrassomia nos cromossomos 12 e 23. Também se destaca a similaridade entre amostras de resistência à paromomicina e miltefosina com tiofeno, fluorouracil e terbinafina, ainda que oriundas de estudos distintos. O grupo controle à direita do gráfico revelou grande variabilidade cromossômica, sem padrão definido, mas com o cromossomo 31 mantendo perfil tetrassômico. Algumas amostras exibiram perfis haplóide/diplóide, além de variações de tetrassomia a pentassomia em diversos cromossomos, com destaque para o cromossomo 8, único a atingir 7 cópias. Apesar da multiplicidade de agrupamentos revelados pelo heatmap, os achados sugerem que a distribuição majoritária em três grupos distintos reflete semelhanças biológicas reais entre as amostras, não restritas ao pertencimento a estudos específicos. No agrupamento de resistência, observa-se centralização das amostras, com poucas dispersas entre os demais grupos, o que reforça a consistência biológica, mesmo considerando suas origens distintas, e reduz a possibilidade de viés de sequenciamento.

Dinâmica das variações de cobertura entre amostras resistente e sem exposição a fármacos: Posteriormente a identificação dos valores de ploidia dos 36 cromossomos de *L. infantum* - como se dá a distribuição dos cromossomos nas células - partimos para a investigação de como os padrões previamente identificados refletem no número de cópias genéticas. Utilizamos as informações da profundidade de cobertura, sumarizado em métricas de valores que representam o desvio da mediana de cada respectivo cromossomo, intervalo genômico (a cada mil pb), amostras e condições fenotípicas. A razão dos valores de desvio da mediana obtidos entre os fenótipos foi aplicado ao logaritmo na base 2 ( $\log_2$ ) e incorporado a média móvel para facilitar a interpretação das informações biológicas e destacar possíveis tendências. As figuras ilustram (Figura 4) como a amplificação genética está presente de forma predominante nas análises de amostras provenientes de resistência. No gráfico, o eixo x representa os intervalos cromossômicos em segmentos de mil pares de bases (pb), enquanto o eixo y exibe o  $\log_2$  da razão entre as médias dos desvios da mediana nos grupos controle e resistência. O zero indica a equivalência entre os grupos. As linhas vermelhas interceptadas pelos valores -1 e +1 indicam regiões onde o controle apresenta maior número de cópias quando comparado a resistência e regiões onde a quantidade de cópias no grupo resistente é superior ao controle, respectivamente. Valores fora dessa faixa são indicativos de possíveis diferenças biológicas. Conforme evidenciado na Figura A, identificamos ampliações e deleções relevantes em diferentes cromossomos. Os cromossomos 3, 6, 8 e 9 apresentam diversas regiões de amplificação, sendo o cromossomo 9 o mais expressivo, com aumento superior a oito vezes no número de cópias (intervalos 200–300 pb). No cromossomo 3, além das variações positivas, destacam-se três regiões de depressão (50–100, 200–250 e 330–350 pb), nas quais as amostras resistentes exibem apenas  $\frac{1}{4}$  das cópias em relação ao controle. O cromossomo 13 apresenta duas regiões altamente amplificadas, seguidas de uma possível deleção no intervalo 490–500 pb. Já os cromossomos 10, 16 e 17 exibem valores negativos marcantes, enquanto 10, 12, 15 e 17 mostram ampliações iniciais, ainda que menos intensas que no cromossomo 13, mas superiores a nove vezes em relação ao controle. Os cromossomos 19, 22, 23 e 26 também se destacam, sobretudo o 19, com a maior variabilidade detectada (300–400 pb), seguido do 26, que apresenta elevação expressiva na região final. Nos cromossomos 22 e 23, observam-se múltiplas regiões amplificadas

associadas à resistência. Por fim, os cromossomos 28 a 36 exibem comportamento distinto, com predomínio de variações positivas e padrão instável, especialmente entre os cromossomos 33 a 36. O cromossomo 33, adicionalmente, apresenta uma variação negativa, sugerindo deleção em relação ao grupo controle.

Comparação do conteúdo genético entre os fenótipos de *L. infantum*:

Controle versus resistência a fármacos: Com o intuito de aumentar a robustez das análises e considerando a ausência de normalidade nos dados, aplicamos o teste de Mann-Whitney aos desvios da mediana, agrupados por cromossomos e intervalos genômicos com o intuito de verificar a hipótese de que há diferenças significativas entre as amostras de controle e resistência, associando posteriormente os resultados aos genes descritos para *Leishmania* no NCBI. Um gene foi considerado significativo quando apresentou p-valor ajustado  $\leq 0,001$  e  $|\log_2 \text{razão}| \geq 1$ . O limite do p-valor estrito foi definido para reduzir a probabilidade de associações que não são verdadeiramente significativas. Foram identificados 7.242 genes associados às posições genômicas nas análises preliminares, dos quais 3.532 atenderam aos critérios iniciais. Devido ao caráter multi cópia do genoma, adotamos o critério de  $\geq 50\%$  dos fragmentos significativos para validação final, resultando em 2.641 genes, equivalentes a 74,77% dos inicialmente significativos e 36,5% do total de genes analisados (Tabela 1).

Frequência de variações genéticas identificadas na perspectiva dos fenótipos:

Definido o panorama da variabilidade genética em *Leishmania*, avaliamos a distribuição das alterações nos cromossomos a partir dos genes que atenderam aos critérios de proporção  $\geq 0,5$  e  $\log_2 \text{razão} \geq 1$  (resistência) ou  $\leq -1$  (controle), permitindo a identificação da frequência dessas ocorrências por cromossomos e por grupos. A Figura 5 mostra que, como esperado, o grupo resistência concentra a maior parte das variações, com destaque para o cromossomo 12 (92,3% em resistência contra 7,7% em controle), seguido dos cromossomos 32, 26, 30 e 23 (86,1% a 84,1%). Esses achados corroboram os perfis poliplóides previamente observados nos perfis de ploidia - resultados obtidos no relatório anterior - sobretudo nos cromossomos 12, 23 e 26. Em contraste, o cromossomo 1 apresenta maior frequência de variações no grupo controle (54,7%), enquanto os cromossomos 11 (36,7%) e 20 (44,1%) exibem padrão semelhante, sugerindo menor suscetibilidade de seus genes às alterações associadas à resistência ou menor relevância desses loci nos mecanismos adaptativos da espécie.

Avaliação da composição da variabilidade genética entre grupos e classificação funcional dos genes:

Após a quantificação dos genes que atendem aos critérios estabelecidos pelas nossas análises, nosso objetivo é identificar as principais funções associadas a esses genes e compreender como se distribuem nos diferentes grupos. Os genes totais que atenderam aos critérios de proporção foram distribuídos em três grupos: controle exclusivo, resistência exclusiva e genes compartilhados (Figura 2). O grupo controle exclusivo e resistência exclusiva são compostos apenas pelos genes que apresentam alteração no número de cópias e que se encontram exclusivamente nesses grupos. Em contrapartida, o grupo genes compartilhados é formado pelas alterações genéticas identificadas em ambos os grupos. Com resultado, observamos que o grupo controle exclusivo reuniu 510 genes (19,3%), enquanto a resistência apresentou 1.861 genes exclusivos (70,5%). Já o grupo de genes compartilhados foi composto por 270 genes, indicando a presença de alterações comuns a ambos os fenótipos (Figura 6). A caracterização funcional dos genes identificados permite compreender os mecanismos envolvidos nos diferentes fenótipos de *Leishmania*, cujo desfecho clínico está diretamente relacionado ao perfil genético do parasita. Utilizando a plataforma STRING

(<https://string-db.org/>), que nos permite observar interações e funções moleculares conhecidas entre os genes observados, verificamos que, dos 2.641 genes identificados, apenas 858 (32,5%) codificam proteínas, incluindo interações experimentais e previstas; mais de 66% permanecem não caracterizados. Entre os caracterizados, 181 pertencem ao controle, 600 à resistência e 77 são compartilhados (Tabela 3). A diferença entre os grupos sugere regulação diferencial: o número expressivo de genes associados à resistência pode refletir adaptações necessárias à sobrevivência em condições adversas, enquanto o grupo controle apresenta menor diversidade funcional, indicando a dispensabilidade de certos mecanismos fora do contexto de resistência. Já os 77 genes compartilhados provavelmente correspondem a funções basais essenciais ao parasita, embora sua ausência de agrupamento possa decorrer de limitações metodológicas.

#### Caracterização funcional e biológica de genes associados à variabilidade fenotípica em *Leishmania*:

A plataforma STRING foi utilizada para realizar o enriquecimento funcional dos genes com número de cópias alteradas pertencentes exclusivamente aos grupos “controle” e “resistência”. A análise conjunta possibilitou uma visão mais ampla e fiel do contexto biológico. Na figura, o eixo y representa os mecanismos obtidos pelo enriquecimento; no eixo x (signal) observa-se a intensidade da associação gênica aos processos; a legenda indica o FDR, em que tons laranja refletem maior confiabilidade estatística e tons roxos menor. O gene count representa o número de genes envolvidos, proporcional ao tamanho das bolhas no gráfico. Nos processos biológicos (Figura 7A), observamos envolvimento majoritário dos genes em processos metabólicos, como metabólitos primários, celulares e de substâncias orgânicas. O “processo metabólico” e o “processo metabólico de substância orgânica” apresentaram enriquecimento moderado com alta confiabilidade estatística (FDR baixo), enquanto o “processo metabólico celular”, apesar de confiabilidade inferior (FDR alto), manteve relevância biológica pelo número elevado de genes associados. Já os processos de moléculas pequenas e de ácido carboxílico exibiram forte associação, mas com baixa confiabilidade (signal alto + FDR alto). Os demais processos foram desconsiderados por ausência de relevância biológica. Quanto à função molecular (Figura 7B), destacou-se a atividade catalítica, com cerca de 300 genes associados, alta intensidade de enriquecimento e elevada confiabilidade estatística (signal alto + FDR baixo). Outras funções, como atividade de hidrolase, nucleosídeo-trifosfatase e fosfatase, apresentaram enriquecimento moderado, mas com FDR elevado e menor número de genes, ainda que biologicamente relevantes. Funções com signal baixo e FDR elevado foram consideradas não significativas.

#### Fatores de virulência de *L. infantum*:

A virulência de *Leishmania* resulta da interação entre fatores ambientais, genéticos do hospedeiro e vetores, mas os determinantes moleculares assumem papel central (Chang; McGwire, 2002). A literatura destaca a plasticidade genética como estratégia fundamental, promovendo alterações nos padrões de virulência. Com base em levantamento bibliográfico, caracterizamos a distribuição genômica e fenotípica dos principais fatores de virulência de *L. infantum* (Tabela 3). Observamos predominância de alterações no número de cópias gênicas, sobretudo em amostras resistentes, com destaque para os cromossomos 28 e 29, que concentram variações em genes como HSP70, LMPK, fosfatase ácida, amastina e LPG3. As regiões iniciais dos cromossomos (100–300 kb) mostraram maior suscetibilidade às amplificações, sendo que, no cromossomo 28, as alterações frequentemente ocorrem em associação ao cromossomo 30 (correlação de 0,8), o que corrobora com os resultados do relatório anterior. Nas amostras de controle, identificamos aumento de cópias para a cisteína

peptidase (C2) e predomínio de variações em genes metabólicos citoplasmáticos. Já nas resistentes, às alterações envolveram genes de processos metabólicos e celulares, reforçando a necessidade de múltiplas funções para superar a resposta imune do hospedeiro sob pressão terapêutica.

## Discussão

A *Leishmania* consolida-se como modelo central para o estudo da plasticidade genômica, com perfis de aneuploidia observados tanto em isolados clínicos quanto em populações de laboratório (Rogers et al., 2011; Reis-Cunha; Valdivia; Bartholomeu, 2018). Realizando um resgate de resultados do relatório anterior, em nossas análises de ploidia (Figura 1), identificamos três grupos distintos, reforçando achados prévios sobre a predominância de dissomias, enquanto o cromossomo 31 mantém padrão supranumerário em todos os agrupamentos, corroborando a literatura, embora as causas desse comportamento ainda sejam pouco elucidadas. O grupo controle exibiu maior variabilidade genômica, incluindo perfis de dissomia, trissomia e até haploidia, condição associada a rápida adaptação fenotípica (Sterkers et al., 2012). Em contrapartida, amostras resistentes apresentaram maior variabilidade em cromossomos específicos (12, 13, 23 e 32), evidenciando perfis polissômicos associados à resistência a fármacos. A análise da mediana de cópias cromossômicas, um achado que também foi fruto o relatório de pesquisa anterior, confirmou predominância dissômica no grupo controle, em concordância com estudos documentados, enquanto no grupo resistente observamos alta variabilidade, com destaque para cromossomos 8, 12 e 23, frequentemente associados à resistência e adaptação ambiental. O cromossomo 31 manteve-se supranumerário, variando entre tetrassomia e pentassomia, sugerindo vantagens seletivas, como maior robustez metabólica e adaptação ao estresse (Valdivia et al., 2015). De modo geral, nossos dados reforçam a tendência de modulação seletiva de determinados cromossomos (Negreira et al., 2022), evidenciando a plasticidade genômica como mecanismo central de adaptação. No contexto da resistência, destacamos a amplificação gênica como fator recorrente (Beverley, 1991), especialmente em cromossomos associados a resistência ao antimonio e à paromomicina, em concordância com relatos prévios (Douane et al., 2020). Singh, Goel e Jain (2018) realizaram uma análise comparativa de perfis proteômicos utilizando ferramentas de interação proteína-proteína envolvendo isolados de *Leishmania* com diferentes perfis de sensibilidade aos antimoniais e, assim como nossos achados, revelam a presença de genes com número de cópias alteradas enriquecidos em vias metabólicas e processos imunomoduladores (Figura 7A). Dessa forma, reforça a importância dessas funções nos processos de adaptação e sobrevivência do parasito, especialmente no contexto da resistência. A função molecular consistentemente associada a atividade catalíticas, atividade de hidrolases e atividade de nucleosídeo-trifosfatase (Figura 7B) reflete os mecanismos de infectividade, adaptação e modulação da resposta imune em *Leishmania*. Estudos indicam que a expressão de duas enzimas do tipo nucleosídeo-trifosfatase em *L. infantum* está relacionada ao aumento da adesão e infecção dos macrófagos, bem como à indução da produção de óxido nítrico. Da Silva et al (2023) demonstraram que a deleção dessas enzimas resulta em uma redução significativa da infectividade in vitro. Além disso, a atividade das enzimas ecto-nucleotidases tem sido associada ao aumento da capacidade infectiva pelo parasita, uma vez que a inibição dessas enzimas leva a uma queda expressiva na infecção de macrófagos, sugerindo seu papel como possíveis ligantes na interação parasita-hospedeiro (Peres et al., 2018). Por fim, identificamos uma possível associação entre os mecanismos utilizados pelos respectivos fatores de virulência para aumento da patogenicidade de *Leishmania* e seus correspondentes processos biológicos, funções moleculares e localização subcelular (Quadro 2). Genes citoplasmáticos, em sua maioria

vinculados a processos metabólicos, exibem funções imunomoduladoras, como GP63 (viabilizador da resistência à lise mediada pelo complemento), fosfatases ácidas (capacidade de regulação negativa das vias de sinalização) e cisteínas peptidases (vinculados a uma resposta por células Th2) (McMahon-Pratt; Alexander, 2004; Freitas-Mesquita; Dos-Santos; Meyer-Fernandes, 2021; (Williams et al., 2006). Em contrapartida, genes intracelulares, associados a processos celulares, sustentam a sobrevivência intramacrófaga e a proliferação parasitária: mutantes nulos de LMPK apresentaram redução da proliferação parasitária em estudo in vitro (Wiese; Gorcke, 2001); estudos utilizando inibidores de OPB resultaram em redução da invasão parasitária em macrófagos murinos (Lasse et al., 2020); e por fim, a amastina e A2, apesar de não estarem localizadas intracelularmente, também exibem significativa contribuição nos processos vinculados à sobrevivência e proliferação parasitária (Wu et al., 2000; McCall; Matlashewski, 2010). Assim, nossos resultados confirmam padrões já descritos, mas também expandem o entendimento sobre a plasticidade genômica em *Leishmania*.

## Conclusão

Este estudo reforça a *Leishmania* como um modelo notável de plasticidade genômica, evidenciando a aneuploidia em mosaico e as variações no número de cópias gênicas como mecanismos centrais de adaptação e resistência. A análise de dados públicos provenientes de repositórios como o SRA NCBI demonstrou-se uma estratégia eficiente para acesso a bibliotecas de informação genômica. Associado a isso, o uso de softwares de programação gratuitos mostrou-se essencial para a implementação de análises estatísticas, expandindo as possibilidades de análises de genomas.

Os achados deste trabalho revelam padrões consistentes de variação cromossômica e gênica entre amostras de controle e de resistência a fármacos, com destaque para os cromossomos 8, 12, 23 e 26, frequentemente associados à resistência. Em relação ao controle, identificamos um perfil predominantemente dissômico nos cromossomos 10 e 27. Acrescenta-se a predominância do cromossomo 31 em apresentar perfil polissomal em ambos os fenótipos analisados, atestando o exposto na literatura. Concluiu-se que cerca de 70% dos genes com variações do número de cópias estão associadas a amostras resistentes. Ainda, identificamos também os principais genes com alterações do número de cópias e que são apontados como fatores de virulência em *Leishmania*, tais como: GP63, HSP70, LMPK, OPB, A2, LPG3, amastinas, fosfatases ácidas e cisteínas peptidases. Além disso, esses genes foram relacionados a processos celulares e atividades catalíticas, como potenciais determinantes da adaptação do parasito. Esses resultados corroboram evidências já descritas e ampliam a compreensão dos mecanismos genômicos que sustentam a resistência em *Leishmania*.

Portanto, este estudo ilustra a relevância da integração entre dados públicos, ferramentas computacionais e análises estatísticas para a investigação de fenômenos complexos como a resistência a fármacos. A capacidade de explorar o genoma do parasito em larga escala fortalece o papel da bioinformática como ferramenta indispensável para a saúde pública, permitindo identificar alvos moleculares de interesse, subsidiar estratégias terapêuticas e ampliar o entendimento dos mecanismos que sustentam a diversidade fenotípica da doença. Esse trabalho não apenas consolidou conhecimentos técnicos e científicos, mas também contribuiu para a formação científica e crítica, evidenciando a importância de abordagens integrativas e acessíveis para o enfrentamento de doenças negligenciadas como as leishmanioses.

## Referências

BEVERLEY, S. M. Gene amplification in *Leishmania*. *Annual Review of Microbiology*, v. 45, p. 417–444, 1991. BLACK, Jennifer A. et al. Life in plastic, it's fantastic! How *Leishmania* exploit genome instability to shape gene expression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, p. 1102462, 2023. BRITTO, C. et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*, v. 222, n. 1, p. 107–117, 5 nov. 1998. DA SILVA, Walimir et al. *Leishmania infantum* NTPDase1 and NTPDase2 play an important role in infection and nitric oxide production in macrophages. *Acta Tropica*, v. 237, p. 106732, jan. 2023. DOUANNE, Noélie et al. MRPA-independent mechanisms of antimony resistance in *Leishmania infantum*. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, v. 13, p. 28–37, ago. 2020. FREITAS-MESQUITA, Anita Leocadio; DOS-SANTOS, André Luiz Araújo; MEYER-FERNANDES, José Roberto. Involvement of *Leishmania* Phosphatases in Parasite Biology and Pathogeny. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 2021. IOVANNISCI, D. M.; BEVERLEY, S. M. Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 34, n. 2, p. 177–188, 1 maio 1989. LASSE, Camila et al. Prolyl Oligopeptidase From *Leishmania infantum*: Biochemical Characterization and Involvement in Macrophage Infection. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1060, 2020. KAMRAN, Mohd et al. 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, p. 1001973, 2023. KUBAR, Joanna; FRAGAKI, Konstantina. *Leishmania* proteins derived from recombinant DNA: current status and next steps. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 3, p. 111–116, mar. 2006. LEITHERER, S. et al. Characterization of the Protein Tyrosine Phosphatase LmPRL-1 Secreted by *Leishmania major* via the Exosome Pathway. *Infection and Immunity*, v. 85, n. 8, p. e00084-17, ago. 2017. LIMA, Jonilson Berlink et al. *Leishmania infantum* lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- $\gamma$  expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 14321, 30 out. 2017. LYPACZEWSKI, Patrick et al. A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 16549, 8 nov. 2018. MCCALL, Laura-Isobel; MATLASHEWSKI, Greg. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. *Molecular Microbiology*, v. 77, n. 2, p. 518–530, jul. 2010. MCMAHON-PRATT, Diane; ALEXANDER, James. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunological Reviews*, v. 201, p. 206–224, out. 2004. NEGREIRA, Gabriel 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, 11 jan. 2022. PARASHAR, Smriti; MUKHOPADHYAY, Amitabha. GTPase Sar1 regulates the trafficking and secretion of the virulence factor gp63 in *Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 29, p. 12111–12125, 21 jul. 2017. PILLAI, Agiesh Balakrishna et al. Sphingolipid degradation in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 12, p. e1944, 2012. PERES, Nalu Teixeira de Aguiar et al. Infection of Human Macrophages by *Leishmania infantum* Is Influenced by Ecto-Nucleotidases. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1954, 11 jan. 2018. REIS-CUNHA, João Luís; VALDIVIA, Hugo O.; BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira. Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. *Current Genomics*, v. 19, n. 2,

p. 87–97, fev. 2018. ROGERS, Matthew B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, dez. 2011. STERKERS, Yvon et al. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cellular Microbiology*, v. 13, n. 2, p. 274–283, fev. 2011. SINHA, Roma et al. Genome Plasticity in Cultured *Leishmania donovani*: Comparison of Early and Late Passages. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1279, 2018. SINGH, Neeloo; GOEL, Renu; JAIN, Ekta. Differential Metabolic Pathway Analysis of the Proteomes of *Leishmania donovani* and *Leptomonas seymouri*. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, v. 12, n. 5, p. 1600087, 2018. SUTTER, Amanda et al. Structural insights into leishmanolysins encoded on chromosome 10 of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 9, p. 617–625, set. 2017. SUNKIN, S. M. et al. The size difference between *leishmania major* friedlin chromosome one homologues is localized to sub-telomeric repeats at one chromosomal end. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 109, n. 1, p. 1–15, jun. 2000. TURCO, S. J.; SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 5, p. 223–226, maio 2001. VALDIVIA, Hugo O. et al. Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *BMC genomics*, v. 16, n. 1, p. 715, 18 set. 2015. WILLIAMS, R. A. et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology*, v. 61, n. 3, p. 655–674, 2006. WU, Y. et al. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 110, n. 2, p. 345–357, out. 2000.

## Anexos

Figura 1 - Fluxograma de triagem das bibliotecas genômicas para análise de variação genômica em *Leishmania infantum*.

Figura 2 - Classificação fenotípica das amostras genômicas de *L. infantum*.

Figura 3 - Mapa de calor das variações de ploidia cromossômica em isolados de *L. infantum*.

Figura 4A - Comparação da razão (log2) de CNVs entre grupos fenotípicos do genoma de *L. infantum*.

Figura 4B - Comparação da razão (log2) de CNVs entre grupos fenotípicos do genoma de *L. infantum*.

Figura 4C - Comparação da razão ( $\log_2$ ) de CNVs entre grupos fenotípicos do genoma de *L. infantum*.

Figura 4D - Comparação da razão ( $\log_2$ ) de CNVs entre grupos fenotípicos do genoma de *L. infantum*.

Figura 4E - Comparação da razão ( $\log_2$ ) de CNVs entre grupos fenotípicos do genoma de *L. infantum*.

Figura 4F - Comparação da razão ( $\log_2$ ) de CNVs entre grupos fenotípicos do genoma de *L. infantum*.

Figura 5 - Frequência comparativa de genes com variação no número de cópias no genoma de *L. infantum*.

Figura 6 - Classificação funcional dos genes com CNVs segundo a categoria biológica.

Figura 7A - Análise de enriquecimento funcional dos genes alterados vias metabólicas e processos biológicos associados. (A) Processos biológicos.

Figura 7B - Análise de enriquecimento funcional dos genes alterados vias metabólicas e processos biológicos associados. (B) Função molecular.

Quadro 1. Metadados das bibliotecas genômicas selecionadas para análise layout, origem e instrumento de sequenciamento.

Quadro 2 - Descrição funcional dos principais fatores de virulência investigados em *L. infantum*.

Tabela 1 - Distribuição percentual de genes com variação significativa no número de cópias

Tabela 2 - Comparação da quantidade total de genes com CNVs nos grupos controle e resistência.

Tabela 3 - Fatores de virulência com CNVs relevantes em *Leishmania infantum* função e localização genômica.

Esquação 1

Equação 2

Equação 3

CÓDIGO: SB1439

AUTOR: ARIANE DOS SANTOS BEZERRA

COAUTOR: ANGELIS MARIA ALVES FALCÃO

COAUTOR: JOANNA GARDEL VALVERDE GALVAO

ORIENTADOR: SELMA MARIA BEZERRA JERONIMO

TÍTULO: Detecção de Anticorpos IgG Anti-Saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)

### Resumo

A *Leishmania infantum*, o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) na América Latina, é transmitido por flebotomíneos, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor no Brasil. Os cães são considerados como principal reservatório do parasita. Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral canina contra antígenos da saliva de *Lu. longipalpis* considerando a taxa de exposição ao vetor. Foram analisados 13 cães, divididos entre grupo negativo (n=9), não exposto ao vetor, e grupo positivo (n=4), cães infectados por *L. infantum* provenientes de área endêmica para LV. O ensaio imunoenzimático foi padronizado utilizando diferentes concentrações de soro canino e anticorpo secundário. Após estabelecimento das concentrações ideais (soro: 1:25; anticorpo secundário 1:4.000), foi determinado o ponto de corte (densidade óptica 0,345). Foi observado aumento de IgG anti-saliva no grupo negativo após exposição a *Lu. longipalpis* (p=0,0029), com níveis de anticorpos similar aos controles positivos (p>0.05). Os achados confirmam que a exposição ao vetor induz rapidamente resposta humoral detectável. Não foram observadas correlações entre os níveis de anticorpos anti-saliva e grau de exposição ao flebotomíneo. Esses achados reforçam o potencial uso da saliva do *Lu. longipalpis* como ferramenta para estudos de imunomodulação, uma vez que a literatura sinaliza que a saliva do vetor pode alterar a evolução frente à infecção por *L. infantum*.

Palavras-chave: Saliva, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania infantum*

TITLE: Detection of Anti-Saliva IgG Antibodies of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*

### Abstract

*Leishmania infantum*, the etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) in Latin America, is transmitted by phlebotomine sand flies, with *Lutzomyia longipalpis* being the main vector in Brazil. Dogs are considered the primary reservoir of the parasite. This study aimed to evaluate the canine humoral immune response against *Lu. longipalpis* salivary antigens, considering the rate of exposure to the vector. A total of 13 dogs were studied, divided into a negative group (n=9), not exposed to the vector, and a positive group (n=4), infected with *L. infantum* residing in the VL-endemic area. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was standardized using different concentrations of canine serum and secondary

antibody. After establishing optimal concentrations (serum: 1:25; secondary antibody: 1:4,000), the cutoff point was determined (optical density: 0.345). An increase in anti-saliva IgG levels was observed in the negative group after exposure to *Lu. longipalpis* ( $p=0.0029$ ), with antibody levels similar to those of positive controls ( $p>0.05$ ). The findings confirm that exposure to the vector rapidly induces a detectable humoral response. No correlations were found between anti-saliva antibody levels and the degree of exposure to the sand fly. These results reinforce the potential use of *Lu. longipalpis* saliva as a tool for immunomodulation studies, as the literature indicates that vector saliva may alter the progression of infection by *L. infantum*.

**Keywords:** Saliva, *Lutzomyia longipalpis*, *Leishmania infantum*

## Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* na América Latina e os cães domésticos representam os principais reservatórios do parasita, desempenhando papel fundamental na manutenção da cadeia epidemiológica da infecção, o que torna seu diagnóstico e monitoramento da infecção canina essenciais para o controle da leishmaniose visceral em áreas endêmicas. A *L. infantum* é transmitida principalmente por flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) do gênero *Lutzomyia* nas Américas (1). No Brasil, a espécie *Lutzomyia longipalpis* é reconhecida como vetor primário.

A saliva dos flebotomíneos constitui um secretoma complexo, rico em moléculas bioativas com propriedades anti-hemostáticas — como vasodilatadores (maxadilina, adenosina), anticoagulantes (lufaxin) e antiagregantes plaquetários (apirase) — que facilitam o repasto sanguíneo. Além disso, a saliva se mostrou um facilitador no processo de atração de neutrófilos (2) e macrófagos (3) para o local da picada, favorecendo o estabelecimento inicial da infecção. Estudo experimental com hamsters infectados demonstrou que a reexposição ao vetor aumentou mais de duas vezes a transmissão de *Leishmania donovani*, agente etiológico da LV na Índia (4), o que evidencia a relevância desse mecanismo em regiões endêmicas. A saliva do flebotomíneo também apresenta propriedades imunomodulatórias, capazes de induzir perfil Th2 e suprimir respostas Th1 protetoras, favorecendo a infecção por *Leishmania* (5). Em algumas espécies, compostos salivares ainda exercem efeito analgésico, reduzindo a percepção de dor e aumentando o tempo de alimentação.

A exposição repetida do hospedeiro a esses componentes salivares pode induzir uma resposta humoral específica, com produção de anticorpos IgG anti-saliva. Esses anticorpos se consolidaram como marcadores sensíveis e específicos de contato vetorial em diferentes contextos epidemiológicos. A quantificação desses marcadores tem sido utilizada para estimar níveis de exposição a flebotomíneos, avaliar risco de transmissão e monitorar intervenções de controle (6). A importância deste estudo decorre do fato de que, embora a LV humana tenha diminuído no Brasil, a doença canina permanece prevalente, impulsionada pela urbanização. As primeiras descrições ocorreram em Teresina e Natal, no Nordeste (7,8), mas logo foram relatadas no Rio de Janeiro (9), Minas Gerais (10), São Paulo e Ceará (11). Atualmente, todos os estados brasileiros apresentam casos autóctones. A expansão da LV está associada a fatores ambientais e socioeconômicos, como urbanização desordenada, precárias condições sanitárias e migração de pessoas e cães, aumentando o contato entre vetor e hospedeiro. Assim, estudar o papel do vetor na transmissão de *L. infantum* é essencial para compreender o elo entre a

resposta imune humoral e celular frente aos antígenos salivares e seu impacto na proteção ou exacerbação da infecção.

Neste contexto, o presente estudo tem por hipótese de que cães sem prévia exposição ao *Lu. longipalpis*, após exposição, desenvolvem níveis detectáveis de IgG anti-saliva e isto poderia estar correlacionado com a taxa de repasto do flebotomíneo. Assim, o objetivo geral foi avaliar se há associação entre a resposta imune humoral canina contra antígenos da saliva de *Lu. longipalpis* e taxa de repasto de flebotomíneos. Para tanto, tivemos por objetivos específicos: a) Padronizar ensaio imunoenzimático para avaliação da exposição ao inseto vetor *Lu. longipalpis* em áreas endêmicas para infecção por *L. infantum*. b) Avaliar associação entre os níveis de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* em cães expostos e a quantidade de flebotomíneos. c) Avaliar associação entre os níveis de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis* em cães e a taxa de repasto de flebotomíneos. d) Avaliar associação do tempo de exposição e os níveis de anticorpos anti-saliva do *Lu. longipalpis*.

## Metodologia

### 3.1 Considerações éticas

Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com as diretrizes éticas para uso de animais em pesquisa, sob aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (protocolo CEUA-UFRN nº 156.012/2019).

### 3.2 Obtenção das glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*

A dissecação das glândulas salivares foi realizada seguindo metodologia já descrita (12). As fêmeas de *Lu. longipalpis* utilizadas no projeto eram provenientes de colônia do Instituto de Medicina Tropical do RN (IMT-RN). As fêmeas foram capturadas com capturador manual de castro e colocadas em tubo Falcon de 15 mL contendo solução com sabão. O conteúdo do tubo foi suspenso em uma tela de tecido fino fixada em outro recipiente para enxágue com água corrente até remoção do sabão. As fêmeas contidas na tela, foram manuseadas com estilete entomológico até uma placa de Petri contendo PBS 1x e novo enxágue será realizado. Uma gota de PBS 1x foi aplicada à lâmina de microscópio. Com auxílio dos estiletes entomológicos, foi retirada a cabeça do flebotomíneo, para as glândulas salivares ficarem visíveis na parte posterior da cabeça. As glândulas foram arrancadas com alfinetes de dissecação e aspiradas para uma seringa com PBS 1x até serem transferidas para tubo Eppendorf e posterior armazenamento a -80°C.

### 3.3 Animais arrolados no estudo

Com o objetivo de padronizar o ensaio imunoenzimático para anticorpos IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis* recrutamos 13 cães que foram agrupados em dois grupos. Cães positivos: cães sintomáticos com diagnóstico clínico e sorológico positivo para infecção por *L. infantum* provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral (n=4). Cães negativos: cães nascidos e mantidos em ambiente experimental controlado, em canil telado impregnado com inseticida, com o objetivo de garantir a ausência de exposição aos flebotomíneos (n=9). Com

o objetivo de avaliar o efeito do repasto sanguíneo nos níveis de anticorpos IgG anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis* 8 desses cães foram então expostos ao vetor *Lu. longipalpis* provenientes de colônia duas ou três vezes.

### 3.4 Exposição ao inseto *L. longipalpis*

Cada animal foi exposto a aproximadamente 40 fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Todos os flebotomíneos utilizados estavam livres de infecção por *L. infantum*, caracterizando-se, portanto, como vetores “limpos”. Os insetos permaneceram em contato com os cães por aproximadamente 30 minutos de forma a permitir o repasto sanguíneo. Após a exposição, foram avaliadas a quantidade de fêmeas que realizaram o repasto (taxa de repasto %).

### 3.5. Coleta de amostras de sangue

A coleta de sangue periférico foi realizada em dois momentos: antes (amostra basal) e em média 18 dias após a exposição aos flebotomíneos (variando de 11 a 30 dias). O sangue coletado foi centrifugado para obtenção do soro, que foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes sorológicos.

### 3.6 Teste ELISA para detecção de anticorpos anti-saliva

A detecção de anticorpos IgG específicos contra a saliva de flebotomíneos foi realizada por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA indireto modificado de protocolo previamente descrito (13). Placas de microtitulação de 96 poços de alta ligação foram sensibilizadas com 50  $\mu\text{L}$  de homogeneizado de glândulas salivares (SGH, concentração 0,71  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) 36 ng/poço, seguido de incubação a  $4^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Após o bloqueio de sítios inespecíficos com solução de TBS/BSA a 4% por uma hora em temperatura ambiente, as amostras de soro foram diluídas em TBS/BSA a 4% nas diluições 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200, sendo o ensaio conduzido em duplicata. Os soros permaneceram por 1h em temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (TBS contendo 0,05% Tween 20) e foi adicionado anticorpo secundário de coelho anti-IgG canino conjugado a peroxidase (*Jackson Immuno Research*, EUA) em diferentes concentrações (1:2000, 1:4000 e 1:10000). Em seguida as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e adicionado o substrato. Após 1 hora, as placas foram lavadas novamente e em seguida, foi adicionado o cromógeno ABTS e substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) diluídos em tampão citrato-fosfato pH 4,2. A placa foi incubada ao abrigo da luz por 20 minutos até a reação ser interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de SDS 5%. A densidade óptica utilizada para leitura foi de 405 nm (*Biochrom®*, *Asys expert plus*, Cambridge, UK).

Para uma melhor padronização dos resultados, as amostras foram corridas em duplicatas em presença e ausência de sensibilização com antígenos (HGS). Os resultados de densidade óptica obtida em poços previamente sensibilizados com antígeno foi diminuído de média de densidade óptica de poços não sensibilizados. Esse procedimento teve por objetivo remover possíveis variações individuais presentes no soro dos cães analisados.

### 3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados através do software GraphpadPrism (GraphPad Software, La Jolla, CA. EUA) versão 8. Dados de um mesmo cão, foram comparados usando o teste teste T pareado. A significância estatística foi determinada através do Two-tailed Student's t test. Dados não pareados foram analisados utilizando o teste Mann–Whitney e as correlações foram feitas através do Pearson test. Somente P valores < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## Resultados e Discussões

### 4.1 Padronização do ensaio imunoenzimático para detecção de IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis* em soro de cães

Primeiramente utilizamos diferentes concentrações de amostras de soro (1:25, 1:50, 1:100 e 1:200) de 4 cães, sendo 3 provenientes de área endêmica para LV e um controle não exposto ao vetor. Diferentes concentrações de anticorpo secundário também foram testadas (1:2000; 1:4000 e 1:10.000). Para tanto realizamos a sensibilização da placa com 36ng/poço.

Com base nos dados encontrados (Figura 1) decidimos pelo uso da diluição de, soro 1:25 e anticorpo secundário na diluição de 1:4.000..

Para determinação do ponto de corte de níveis de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* utilizamos amostras de 9 cães não expostos ao flebotomíneos e cães provenientes de área endêmica com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral canina (Figura 2). O ponto de corte foi determinado como a média das densidades ópticas das amostras negativas, somada 1,96 vezes o desvio padrão das densidades ópticas dos controles negativos (0,345) conforme previamente descrito (14).

Observamos níveis de anticorpos significativamente mais elevados no grupo exposto (positivo) quando comparado ao grupo não exposto (negativo) ao inseto *Lu. Longipalpis*, (Figura 2).

Este estudo demonstrou que a exposição de cães a flebotomíneos do gênero *Lutzomyia longipalpis* induz a produção de anticorpos IgG específicos contra a saliva do vetor, detectáveis por ELISA. A padronização do ensaio permitiu a determinação de condições ideais para detecção de anticorpos, com elevada sensibilidade para identificar cães previamente expostos. Contudo, observou-se que nem todos os cães de área endêmica apresentaram níveis acima do ponto de corte, confirmando estudos que mostraram variabilidade individual na produção desses anticorpos (15).

### 4.2 Associação entre resposta imune humoral canina contra antígenos da saliva de *Lu. longipalpis* e repasto de flebotomíneos em xenodiagnóstico.

Após exposição ao vetor observamos aumento significativo ( $p= 0,0029$ ) nos níveis de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* em cães (Figura 3A), embora alguns ainda tenham permanecido com anticorpos abaixo do ponto de corte, sugerindo variação individual na magnitude da resposta. Esses dados corroboram com estudos anteriores de descreveram a existência de variações individuais na resposta imunológica humoral (16). Não encontramos diferença significativa nos níveis de anticorpos anti-saliva de flebotomíneos entre cães

experimentalmente expostos ao repasto de *Lu. longipalpis* e cães provenientes de área endêmica, naturalmente expostos ao inseto vetor e infectados por *L. infantum* (positivos). Sendo assim, os resultados sugerem que a resposta de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* pode ser usada como um marcador de exposição aos flebotomíneos e o estabelecimento dessa ferramenta no laboratório tem uma grande importância em futuros estudos epidemiológicos e de imunomodulação.

Com o objetivo de determinar se os níveis de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* tem associação com a intensidade de exposição aos flebotomíneos, avaliamos a correlação dos níveis de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* e a quantidade absoluta de flebotomíneos utilizada nas exposições (Figura 4A) assim como o número absoluto de fêmeas alimentadas durante a exposição (Figura 4B) e taxa de repasto na exposição (Figura 4C), porém não foi possível detectar correlação significativa nas comparações. Em estudo prévio realizado com muitos cães, foi possível detectar correlação entre a taxa de repasto e os níveis de anticorpos anti-saliva de *P. perniciosus*(17)

A literatura descreve uma cinética bem definida para os níveis de anticorpos anti-saliva de flebotomíneos, com pico em 5 semanas seguido de declínio (17). No presente estudo não foi identificada correlação significativa correlação entre os níveis de anticorpos anti-saliva de *Lu. longipalpis* e tempo decorrido entre a coleta da amostra a exposição (dias) (Figura 4D). Contudo, um fator limitante no presente estudo foi o número reduzido de amostras de cães avaliadas. Isso ocorreu pela dificuldade de manutenção dos cães em canil telado impregnado com inseticida.

## Conclusão

Os resultados indicam que cães expostos ao *Lu. longipalpis* desenvolvem resposta humoral contra antígeno salivar do inseto. Esses achados reforçam o potencial uso da saliva do *Lu. longipalpis* como ferramenta para estudos de imunomodulação na infecção por *Leishmania infantum*, uma vez que a literatura sinaliza que a saliva do vetor pode alterar a evolução frente à infecção por *L. infantum*.

## Referências

- 1.Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Jan 19;4(1):e584.
- 2.Guimaraes-Costa AB, Shannon JP, Waclawiak I, Oliveira J, Meneses C, de Castro W, et al. A sand fly salivary protein acts as a neutrophil chemoattractant. Nat Commun. 2021 May 28;12:3213.
- 3.Teixeira CR, Teixeira MJ, Gomes RBB, Santos CS, Andrade BB, Raffaele-Netto I, et al. Saliva from Lutzomyia longipalpis Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. J Immunol. 2005 Dec 15;175(12):8346–53.
- 4.Valverde JG, Paun A, Inbar E, Romano A, Lewis M, Ghosh K, et al. Increased Transmissibility of Leishmania donovani From the Mammalian Host to Vector Sand Flies After Multiple Exposures to Sand Fly Bites. J Infect Dis. 2017 Apr 15;215(8):1285–93.

5. Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. *J Exp Med*. 1998 Nov 16;188(10):1941–53.
6. Hostomska J, Rohousova I, Volfova V, Stanneck D, Mencke N, Volf P. Kinetics of Canine Antibody Response to Saliva of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2008 Aug;8(4):443–50.
7. Soares RPP, Turco SJ. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Ciênc*. 2003;75:301–30.
8. SVS. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Editora do Ministério da Saúde; 2006.
9. Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today*. 1994;10(1):37–40.
10. Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanization of visceral leishmaniose in Belo Horizonte, Brazil. *Arq Bras Med Veterinária E Zootec*. 2001 Feb;53:1–8.
11. Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2008 Dec;24:2959–63.
12. Bowles D. Sand Flies - Significance, Surveillance and Control in Contingency Operations. 2015 Jan;
13. Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva | PLOS Neglected Tropical Diseases [Internet]. [cited 2025 Aug 26]. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000084>
14. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods*. 1998 Dec 1;221(1–2):35–41.
15. Quinnell RJ, Soremekun S, Bates PA, Rogers ME, Garcez LM, Courtenay O. Antibody response to sand fly saliva is a marker of transmission intensity but not disease progression in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*. 2018 Jan 4;11(1):7.
16. Batista LFS, Utsunomiya YT, Silva TBF, Carneiro MM, Paiva JSF, Silva RB, et al. Canine leishmaniasis: Genome-wide analysis and antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva. Yurchenko V, editor. *PLOS ONE*. 2018 May 9;13(5):e0197215.
17. Vlkova M, Rohousova I, Drahota J, Stanneck D, Kruehwagen EM, Mencke N, et al. Canine Antibody Response to *Phlebotomus perniciosus* Bites Negatively Correlates with the Risk of *Leishmania infantum* Transmission. Bates PA, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Oct 11;5(10):e1344.

## Anexos

Figura 1- Detecção de imunoglobulina G anti-saliva de *Lutzomyia longipalpis* em cães expostos e não expostos ao inseto. Ensaio imunoenzimático utilizando diferentes diluições de soro (1:25; 1:100; 1:500) e anticorpo secundário (1:2.000; 1:4.000; 1:10.000).

Figura 2. Detecção de níveis de anticorpos IgG anti-saliva em cães não expostos (negativos) e expostos (positivos) ao inseto vetor *Lu. longipalpis*. As barras representam a densidade óptica (OD) média dos grupos. A linha tracejada indica o valor de corte.

Figura 3. Detecção de níveis de anticorpos IgG anti-saliva em cães. A) Níveis de anticorpos em cães não expostos e após exposição. B) Níveis de anticorpos em cães expostos ao repasto de *Lu. longipalpis* e cães de área endêmica.

Figura 4. Associação entre níveis de IgG anti-saliva e exposição ao *Lu. longipalpis*. A) Anticorpos × total de flebotomíneos. B) Anticorpos × fêmeas alimentadas. C) Anticorpos × taxa de repasto (%). D) Anticorpos × intervalo entre exposição e coleta. Círcu