

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE

**ESTUDO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA NATURAL À MILTEFOSINA
EM ISOLADOS DE *Leishmania (Leishmania) chagasi* OBTIDOS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL QUE APRESENTARAM
DIFERENTES RESPOSTAS AO TRATAMENTO**

VITÓRIA
2015

JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE

**ESTUDO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA NATURAL À MILTEFOSINA
EM ISOLADOS DE *Leishmania (Leishmania) chagasi* OBTIDOS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL QUE APRESENTARAM
DIFERENTES RESPOSTAS AO TRATAMENTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor (a) em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dra. Elenice Moreira Lemos (UFES).

Coorientadora: Dra. Suely Gomes de Figueiredo (UFES).

Colaborador: Professor Jeremy C. Mottram (University of Glasgow).

Colaboradora: Dra. Héliida Monteiro de Andrade (UFMG).

VITÓRIA
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

T832e Trindade, Juliana Brambilla Carnielli, 1983 -
Estudo do mecanismo de resistência natural à miltefosina em
isolados de *Leishmania (Leishmania) chagasi* obtidos de pacientes
com leishmaniose visceral que apresentaram diferentes respostas ao
tratamento / Juliana Brambilla Carnielli Trindade – 2015.
208 f. : il.

Orientador: Elenice Moreira Lemos.
Coorientador: Suely Gomes de Figueiredo.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Resistência Natural.
3. Proteoma. 4. Genoma. I. Lemos, Elenice Moreira.
II. Figueiredo, Suely Gomes de. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



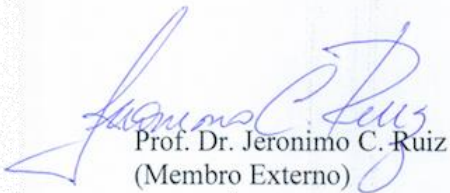
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

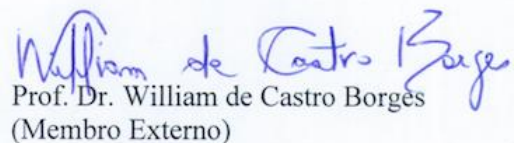
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
TESE DE DOUTORADO

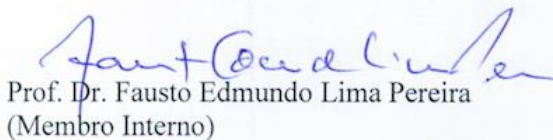
A doutoranda JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE apresentou a tese intitulada “ESTUDO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA NATURAL À MILTEFOSINA EM ISOLADOS DE *Leishmania (Leishmania) chagasi* OBTIDOS DE PACIENTES COM LEISMANIOSE VISCERAL QUE APRESENTARAM DIFERENTES RESPOSTAS AO TRATAMENTO” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a tese para habilitar a mestre em Doenças Infecciosas JULIANA BRAMBILLA CARNIELLI TRINDADE a obter o Grau de DOUTORA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

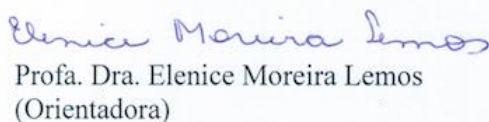
Vitória, ES, 16 de junho de 2015

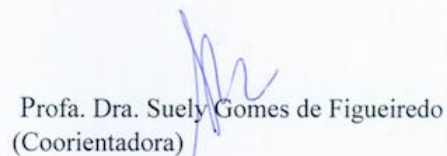

Prof. Dr. Jeronimo C. Ruiz
(Membro Externo)


Prof. Dr. William de Castro Borgés
(Membro Externo)


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Membro Interno)


Profa. Dra. Liliansa Cruz Spano
(Membro Interno)


Profa. Dra. Elenice Moreira Lemos
(Orientadora)


Profa. Dra. Suely Gomes de Figueiredo
(Coorientadora)

Aos meus pais e irmãos que, no decorrer da minha vida proporcionaram-me, além de carinho e amor incondicional, os conhecimentos da integridade e da perseverança. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer à vocês, que não mediram esforços para que eu alcançasse mais este objetivo, minha imensa gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas e por sua benção. Obrigada pelo Conhecimento e por todas suas maravilhosas formas de manifestação.

Às Professoras Elenice e Suely, minhas orientadoras, pela competência científica e acompanhamento deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação, compromisso, paciência, incentivo, entusiasmo, confiança, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada por apoiar minhas escolhas e me passar força e coragem para alcançar meus objetivos. Também agradeço muito pela amizade e o carinho de vocês. Para vocês eu deixo a frase de Isaac Newton: *“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”*, a qual reflete bem a importância de vocês na minha formação e na minha vida. Muito, muito obrigada!

Ao Dr. Reynaldo Dietze, por acreditar e confiar em mim. Obrigada por toda ajuda para eu conseguir o doutorado sanduíche e por todo o apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Helida da UFMG por abrir as portas de seu laboratório de forma tão generosa. Obrigada por partilhar seus conhecimentos, pela disponibilidade, dedicação e por sua alegria e amizade.

Ao Professor Jeremy C. Mottram, pela oportunidade do doutorado sanduíche sob sua cuidadosa orientação. Obrigada pelos ensinamentos e dedicação. Espero que possamos trilhar outras experiências profissionais juntos.

Ao Professor Michael Barrett e Dr. Richard Burchmore pela orientação durante o doutorado sanduíche e por contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

Aos bioinformatas Kathryn Crouch e Nick Dickens por toda a supervisão e acompanhamento das análises genômicas. Obrigada pela paciência e pela generosidade de compartilhar seus conhecimentos.

Ao Dr. Jonas Henrique Aguilar Perales e Dr. Alexander D. Chapeaurouge (Henk) pelo auxílio com as análises de espectrometria de massas na Fiocruz-RJ e, principalmente pela generosidade de compartilhar seus conhecimentos.

À Brodagi: Jeziel, Tiago, Lu, Mari e André! Amigos queridos que o doutorado sanduíche me permitiu conhecer. Muito obrigada por tornar esse período longe de casa mais acolhedor e muito divertido. Muito obrigada também pelos ensinamentos na área de biologia molecular e, em especial na área de *Single Malt*. Agradeço também por me ajudarem a não sumir, levando comidinhas maravilhosas para mim, que não consegui aprender a cozinhar!!

À Elaine Brown, por toda a ajuda e orientação no laboratório durante o doutorado sanduíche. Destaco aqui um ensinamento que vou levar para a vida: “*The voltage to run a gel depend on the time that you should be in the pub*”. O convívio com você foi muito divertido e enriquecedor. *Thank you very much!!*

Ao Jim Scott, por todo o apoio no laboratório durante o doutorado sanduíche, e por sempre me salvar com as compras de emergência! *Thank you very much.*

À Simone Pires do Lab Leish-BH por me ajudar nas análises proteômica. Obrigada por seu apoio, amizade, dedicação, paciência em me ensinar e pelos muitos momentos de descontração.

À amiga Marizinha pela amizade, ajuda, troca de ideias e cada momento de convivência/diversão. Obrigada por me receber em sua casa de forma tão acolhedora e por tornar meus dias no Rio muito mais fáceis.

Aos amigos Amy, Andreita, Catarina, Cíntia, Elena, Fernandita, Robyn, Ann, Sam, Elaine Brown, Jaspreet Singh Grewal, Elmarie Myburgh, Jim Scott, Carmen, Dan Paape, Fernando, Ryan, Lesley, Craig e Andreas do “*Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology*” (WTCMP) em Glasgow. Obrigada pela divertida convivência e por todo apoio.

Aos amigos Greg, Laura, Giu, Rê e Aline do Lab Leish-Tox-Dengue-Vix. Obrigada por todo apoio, amizade e sem dúvida nenhuma, pelos muitos momentos engraçados.

Aos amigos do Laboratório de química de proteínas da UFES: Léo, Tiago, Pedro H, Helena, Pedrinho, Gabi, Gigi e Filipe. Obrigada pela amizade e por toda ajuda no lab.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Liliana Cruz Spano, Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, Dr. William de Castro Borges e Dr. Jerônimo Conceição Ruiz pela disponibilidade e cuidadosa avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Fausto por sua generosidade em ensinar e pelas valiosas sugestões, esclarecimentos e correções.

Às amigas do CEFETES, Maressa, Thaís, Désirée e Beth. Muito obrigada por participarem da minha formação científica e pelos muito momentos de alegria.

Ao Lu e à Thê por me receberem de forma tão gentil e acolhedora em BH.

Aos professores da Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, pela confiança em nosso trabalho e estímulos para aprender e ir adiante.

A todos os funcionários do NDI, em especial a Láu, Carlinha, Rose, Leduk, Andriago e Maria Emília, pela atenção e disponibilidade sempre que necessário.

À Solange Vinhas, pelas valiosas sugestões e pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, em especial à Wayna, por todo auxílio durante o doutorado.

À CAPES, CNPq, FAPES e NDI pelo apoio financeiro.

A minha família, que sempre primaram pela minha educação, pelo incentivo e amor inigualáveis. Obrigada pela dedicação ao meu crescimento pessoal e profissional.

Àquelas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização e concretização desta pesquisa.

Tudo isso foi fundamental para o término deste trabalho. Muito obrigada!

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente”.

Isaac Newton

RESUMO

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica, fatal se não tratada, causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* complexo *donovani*, o qual abriga a espécie *L. (L.) chagasi*. O tratamento da LV conta com poucas opções terapêuticas, incluindo os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e a miltefosina. A miltefosina é a primeira droga de administração oral registrada para o tratamento da leishmaniose e tem sido utilizada com sucesso para o tratamento de LV na Índia. Contudo, diferenças na sensibilidade à miltefosina tem sido relatada em espécies de *Leishmania* clinicamente relevantes. Os mecanismos de resistência à miltefosina estão sendo elucidados em linhagens experimentais de *Leishmania* spp. resistentes a esta droga. Entretanto, os mecanismos de resistência natural à miltefosina em isolados clínicos de *Leishmania* são pouco conhecidos e explorados. Nesse contexto, o presente estudo utilizou as abordagens proteômica e genômica com o objetivo de identificar diferenças a nível molecular entre isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina, visando contribuir para o entendimento do mecanismo molecular envolvido na resistência natural a essa droga. A análise comparativa dos perfis proteicos obtidos por 2D-DIGE, detectou 46 *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os isolados obtidos de um paciente que apresentou cura e de um paciente que apresentou falha ao tratamento com miltefosina. A análise por espectrometria de massas (MALDI/ToF-ToF) permitiu a identificação de 32 *spots* com identificação de uma única proteína, os quais correspondem a 22 proteínas não redundantes. A maioria das proteínas com expressão aumentada no proteoma do isolado resistente à miltefosina estão associadas com a homeostase do sistema redox, resposta ao *stress*, proteção à apoptose e translocação de drogas. A análise genômica, realizada com isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram cura clínica (n=14, grupo cura) ou falha ao tratamento (n=12, grupo recidiva) com miltefosina, identificou um elevado número de SNPs e InDels entre os isolados analisados. Entretanto, assim como a análise do número de cópias de cromossomos, esses não foram capazes de discriminar completamente os isolados obtidos de pacientes que apresentaram diferentes desfechos clínicos ao tratamento com miltefosina. A análise de variação estrutural do número de cópias de genes (*dose*), entre os grupos cura e recidiva, identificou diferenças significativas ($p < 0,01$) em 93 grupos ortólogos (OG5). Dentre esses, foi avaliado o envolvimento da deleção dos genes *in tandem* LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no fenótipo de resistência de *L. (L.) chagasi* à miltefosina. Foi demonstrado

que o processo de deleção do locus contendo esses genes *in tandem* ocorre por recombinação homóloga e, aparentemente não é induzido por pressão da droga miltefosina. A reexpressão individual desses genes em um isolado do grupo recidiva que não os continham, revelou que nenhum desses genes interfere no fenótipo de susceptibilidade *in vitro* da forma promastigota à miltefosina. Além disso, a análise de clones separados de isolados de *L. (L.) chagasi* (heterogêneo em relação à presença desses genes), mostrou que as formas promastigotas de clones que possuem esses genes são menos susceptíveis à miltefosina do que clones que não os possuem. Esses dados, assim como os da análise proteômica, sugerem que o mecanismo de resistência natural à miltefosina nos parasitas *Leishmania* spp. é complexo e multifatorial.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral – *Leishmania (L.) chagasi* – Miltefosina – Resistência – Proteoma – Genoma.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic disease that is fatal if untreated and is caused by the *Leishmania donovani* complex, which include the *Leishmania (L.) chagasi*. Visceral leishmaniasis treatment relies on a few chemotherapeutic drugs including Sb(V), amphotericin B and miltefosine. Miltefosine is the first oral drug registered for leishmaniasis treatment and it has been highly active against VL in India. However, susceptibility differences to miltefosine have been observed in clinically relevant *Leishmania* species. Miltefosine resistance mechanisms are being elucidated in laboratory *Leishmania* spp. isolates but are less clear in clinical isolates. In this study, we used a comparative proteomics and genomics approaches to highlight molecular differences between *L. (L.) chagasi* isolates from visceral leishmaniasis patients with different miltefosine treatment outcomes. The high-resolution proteomes obtained from one isolate from a relapsed patient and the other isolate from a patient who relapsed after miltefosine treatment showed 46 spots that exhibited different abundances between the isolates. Out of these differentially expressed spots, MALDI/ToF-ToF mass spectrometry allowed the identification of 32 spots with unique protein identification that correspondent to 22 non-redundant proteins. Most of the proteins up-regulated in the proteome of the isolate from relapsed patient were associated with redox homeostasis, stress response, protection to apoptosis, and drug translocation. The whole genome sequence carried out with isolates from patients who displayed cure (n=14) and relapse (n=12) clinical outcome, identified a high number of SNPs and InDels. However, same as the chromosome copy number variation analysis, no SNPs and InDels completely discriminated between analysed groups. Against a background of relative genetic homogeneity, we found significant variation ($p < 0,01$) in gene dosage between the isolates from cure and relapse groups: 93 orthologs groups (OG5). Within these, we assessed the association between the deletion of the in tandem genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 with the resistance phenotype of the *L. (L.) chagasi*. It was demonstrated that this deletion process occurs by homologous recombination, and apparently is not induced by miltefosine pressure. The individual reexpression of these genes did not interfere in the *in vitro* miltefosine susceptibility phenotype of promastigote stage. Furthermore, the clones separated from clinical isolates of *L. (L.) chagasi* (heterogeneous with respect to the presence of these genes) showed that the promastigote stage of clones that present these genes are less susceptibility to miltefosine than clones that are absent from these genes. These data suggest, same as the proteomics approach,

that the natural miltefosine-resistance mechanism in *Leishmania* spp. is complex and multifactorial.

Keywords: Visceral leishmaniasis – *Leishmania (L.) chagasi* – Miltefosine – Resistance – Proteome – Genome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição mundial de casos reportados de leishmaniose visceral, 2013.** Adaptado de WHO (2013). 24
- Figura 2 – Ciclo evolutivo das espécies de *Leishmania* spp.** As formas promastigotas metacíclicas inoculadas na derme do hospedeiro, por fêmeas de flebotomíneos, são internalizadas por células fagocíticas residentes, e dentro do fagolisossomo se transformam em amastigotas. As formas amastigotas multiplicam-se, rompem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas. As formas amastigotas disseminam-se por meio dos sistemas linfático e vascular e, ocasionalmente infiltram a medula óssea, fígado e baço. Adaptado de Handman (2001). 26
- Figura 3 – Estrutura química das drogas atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose visceral.** Adaptado de Wikipedia (2010) e Croft e Coombs (2003). 27
- Figura 4 – Ligação e internalização da miltefosina em parasitas *Leishmania* spp.** (a) A miltefosina é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório da droga. A ligação da droga do lado extracelular da membrana plasmática. (b) A fração de droga ligada à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade *flip-flop*. Adaptado de Perez-Victória e outros (2006b). 33
- Figura 5 – Do genoma ao proteoma: um aumento na complexidade e na dinâmica.** A diversidade de produtos gênicos oriundos de um único gene é devida principalmente aos *splicing* alternativos dos transcritos e às modificações cotraducionais e pós-traducionais das proteínas. É predito no genoma humano cerca de 30.000 ORFs, cada um dos quais, origina em média 6 diferentes espécies de mRNA. Esses são traduzidos a proteínas que são processadas em diferentes vias, gerando cerca de 8 a 10 diferentes formas modificadas de proteínas. Portanto, o genoma humano pode potencialmente produzir cerca de (30.000 x 6 x 10) 1.8 milhões de diferentes espécies proteicas. Adaptado de Jensen (2004). 40
- Figura 6 – Diagrama esquemático da separação de proteínas por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas.** Na primeira dimensão, as proteínas de uma mistura complexa são resolvidas por focalização isoelétrica em tira com gradiente de pH imobilizado (IPG – *Immobilized pH Gradient*) de acordo com o pI de cada proteína e independente do seu tamanho. Após a focalização isoelétrica, as proteínas são separadas pela sua massa molecular (MM) no sistema SDS-PAGE. Os *spots* proteicos de interesse são identificados por análise de espectrometria de massas *in tandem*. A análise dos fragmentos trípticos resulta no espectro de massas MS, do qual são selecionados íons parentais para serem fragmentados ao longo de sua cadeia peptídica, gerando o espectro MS/MS. Por meio da diferença entre as massas dos fragmentos do íon parental, seqüências de aminoácidos do peptídeo podem ser determinadas. Adaptado de BIO-RAD (2015). 43
- Figura 7 – Geração da biblioteca de sequenciamento e tecnologia de sequenciamento por terminação reversível do Illumina GA.** (a) Preparo da amostra de DNA genômico. O DNA é aleatoriamente fragmentado e a cada extremidade dos fragmentos são acoplados adaptadores; (b) Após a desnaturação dos fragmentos acoplados aos adaptadores, esses são imobilizados nos canais da *Flow cell*, que contém moldes complementares aos adaptadores fixados em seu suporte sólido; (c) Geração dos *clusters* por amplificação em “ponte”. Nucleotídeos não marcados e a enzima DNA polimerase são utilizados para iniciar a amplificação de fase sólida, gerando fragmentos de fita dupla, em ponte; (d) Desnaturação das moléculas de fita dupla, gerando moldes de fita simples ancorados ao substrato. Ao Término da fase de amplificação, milhões de *clusters* de fragmentos de DNA de fita simples são gerados em cada canal da *Flow cell*; (e) Os *primers* de sequenciamento anelam nos adaptadores ligados às sequências a serem determinadas e a enzima DNA polimerase, especialmente habilitada para incorporar os nucleotídeos modificados, é utilizada para amplificar a seqüência complementar. A extensão da seqüência complementar ocorre pela incorporação de nucleotídeos bloqueados e

marcados com fluoróforos. Dessa forma, após a incorporação de um nucleotídeo a reação é imediatamente paralisada. Em seguida, a polimerase e os nucleotídeos livres são removidos por uma etapa de lavagem e, o nucleotídeo incorporado em cada sequência é detectado. Posteriormente, o fluoróforo e o bloqueador são quimicamente removidos e o sequenciamento prossegue com a incorporação da próxima base nitrogenada. Adaptado de Mardis (2008). 46

Figura 8 – Estratégia de PCR para validar os dados obtidos na análise de variação estrutural. Cinco reações de PCR independentes foram realizadas para verificar a presença ou ausência dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no cromossomo 31 de todos os isolados de *L. (L.) chagasi* e da cepa de referência PP75. As reações de PCR para cada gene individual (OL4613/OL4614; OL4615/OL4616; OL4617/OL4618; e OL4619/OL4620) foi realizada com enzima Phusion® DNA polimerase, enquanto que a PCR para verificar a presença simultânea desses quatro genes *in tandem* (OL4621/OL4622) foi realizada com a enzima DNA polimerase Long PCR Enzyme Mix e com a enzima Phusion® DNA polimerase. Para todas as reações foram realizados 35 ciclos..... 73

Figura 9 – Vetor pGL631 (pRib). PacI e PmeI, enzimas de restrição utilizadas para liberar o fragmento a ser transfectado; 5' 18S e 3' 18S, *18S ribosomal RNA locus* – região de integração por recombinação homóloga no locus ribossomal; pX SL: *Splicing Signal*; MCS: *Multiple cloning site*; NotI, enzima de restrição utilizada para preparar o vetor para a ligação com o inserto; PAS, *PolyA Site*; SAS: *Splice Acceptor Site*; PAC, marca de seleção (puromicina) para as células de transfectadas; CPB: região intergênica (IR) do locus da Cisteína Proteinase B de *L. Mexicana*; ORI, Origem de Replicação bacteriana; AMP, marca de seleção (ampicilina) para as células DH5 α transformadas. Imagem gerada no software CLC Genomics Workbench v.7. 78

Figura 10 – Estratégia de reexpressão dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no isolado MG11A. Com a finalidade de verificar a síntese do produto gênico reexpresso no isolado transfectado, os mesmos foram fusionados à *Tags* (Ty ou HA) para posterior detecção por *Western blotting*. Sabendo que as *Tags* podem interferir na atividade proteica, simultaneamente foi conduzida a estratégia de reexpressão dos referidos genes sem fusioná-los à *Tags*..... 82

Figura 11 – Susceptibilidade *in vitro* dos isolados de *L. (L.) chagasi* à miltefosina. Comparação entre os valores de IC₅₀ das formas intracelulares amastigotas (a) e das formas promastigotas (b) dos isolados de *L. (L.) chagasi*, obtidos antes do tratamento com miltefosina, de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina (cura: n=14; recidiva n=12). Perfil de susceptibilidade das formas amastigotas (c) e das formas promastigotas (d) dos isolados obtidos de um mesmo paciente antes e após o tratamento (MG14, MG17, MG19 e PI01) e durante a falha terapêutica (MG17 e PI01). A, antes do tratamento; B, depois do tratamento; e C, durante a falha terapêutica. IC₅₀ corresponde à concentração de miltefosina que reduz em 50% o número de macrófagos infectados ou que reduz em 50% a sobrevivência das formas promastigotas do parasita..... 87

Figura 12 – Análise proteômica comparativa (2D-DIGE) entre os isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina. (a) Gel bidimensional representativo do perfil proteico dos isolados dos grupos cura (C) e recidiva (R) e do controle interno. (b) Imagem derivada da sobreposição das imagens obtidas do Cy3 (C) e do Cy5 (R) de um mesmo gel. Em destaque estão representados os *spots* diferencialmente expressos entre os diferentes fenótipos: as linhas sólidas e pontilhadas indicam os *spots* com expressão aumentada e reduzida, respectivamente, no isolado do grupo recidiva. As informações de identificação das proteínas correspondentes aos números dos *spots* destacados estão listadas nas tabelas 7, 8 e 9. Obs.: O *spot* com ID 38 foi excluído das análises. 89

Figura 13 – Análise de correlação entre os valores experimentais e teóricos de massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas identificadas dos isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de massa molecular relativa (Mr). (b) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de pI. Essa análise foi realizada com todas as 50 proteínas identificadas. 90

Figura 14 – Categorização funcional das proteínas identificadas. Classes dos processos biológicos dos *spots* proteicos com presença de uma única proteína. A categorização funcional foi baseada nas anotações do Gene Ontology e Panther. Isolado de *L. (L.) chagasi* obtido de paciente que apresentou cura (C) e falha (R) ao tratamento com miltefosina..... 100

Figura 15 – Validação da análise proteômica. (a) Representação gráfica do nível de expressão do *spot* proteico EF-1 β entre os isolados obtidos de pacientes que apresentaram cura (C) e falha (R) ao tratamento com miltefosina ($p < 0,01$). A quantificação do *spot* proteico foi realizada pelo módulo “Differential In-gel Analysis” do *software* DeCyder 7.0. Cada círculo (azul ou vermelho) representa a abundância do referido *spot* em um gel individual, expressa como razão de volume em relação ao seu correspondente no controle interno. (b) Imagens do 2D-*western blotting* individualmente obtidas, para a verificação da expressão das proteínas EF-1 β e α -tubulina (normalizador) nas amostras dos isolados dos grupos cura (C) e recidiva (R). (c) Análise densitométrica das proteínas EF-1 β e α -tubulina (normalizador) nos isolados dos grupos cura (C) e recidiva (R)..... 103

Figura 16 – Variação no número de cópias de cromossomos entre os isolados de *L. (L.) chagasi*. O *heatmap* mostra o *status* do número de cópias dos 36 cromossomos para os 32 isolados analisados como: dissômico (2, amarelo), trissômico (3, laranja), tetrassômico (4, vermelho) e pentassômico (5, vermelho escuro). A, antes do tratamento; B, depois do tratamento; e C, durante a falha terapêutica..... 118

Figura 17 – Visualização da variação no número de cópias de genes entre os isolados de *L. (L.) chagasi*. *Heatmap* obtido a partir dos dados da análise estatística prévia (Mann-Whitney), a qual destacou genes/grupo ortólogos com números de cópias diferentes entre os grupos cura e recidiva ($p < 0,01$). Escala normalizada por coluna. 124

Figura 18 – Análise de enriquecimento. Processos biológicos (a) e vias metabólicas (b) que apresentaram significativa diferença entre os isolados dos grupos cura e recidiva, baseado na variação do número de cópias de genes (dose gênica). As análises de enriquecimento foram realizadas no site do TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), baseada nas anotações de processos biológicos do Gene Ontology e nas anotações de vias metabólicas do KEGG. Representação gráfica em referência ao grupo recidiva..... 126

Figura 19 – Cobertura de sequenciamento dos isolados de *L. (L.) chagasi*. Região do cromossomo 31 que contém os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. Estão apresentados apenas os dados dos isolados obtidos antes do tratamento. Imagem obtida no *software* Integrative Genomics Viewer (IGV, v.2.3.40)..... 128

Figura 20 – Validação dos dados de CNV da análise de bioinformática. (a) Estratégias de PCR utilizadas para verificar a presença dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400, individualmente ou simultaneamente. (b) Resultados das reações de PCR apresentadas em “a”. Os retângulos pontilhados em vermelho destacam os isolados do grupo cura que apresentaram perfil gênico heterogêneo para a presença desses genes e foram subsequentemente clonados. Os retângulos pontilhados em verde destacam os isolados selecionados como controles no processo de clonagem..... 131

Figura 21 – Genotipagem dos clones obtidos dos isolados de *L. (L.) chagasi* para a região do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. As amostras destacadas com retângulos verde e vermelho representam os isolados utilizados como controles, para a presença ou ausência dos genes, e os isolados que apresentaram genótipo heterogêneo, respectivamente. Os retângulos azul indicam os clones reclonados. Os clones estão identificados pelas ID dos respectivos isolados seguido das ID de clonagem (C1-C16). Reação de PCR realizada de acordo com o ID 7 da tabela 5. Produtos de PCR separados em gel de agarose-TAE 0,6%. **Isolado do grupo cura;** e **Isolado do grupo recidiva.** 133

Figura 22 – Caracterização de clones obtidos de isolados clínicos de *L. (L.) chagasi*. (a) Isolado PI05A e dois clones (C1 e C2) e uma população mista (C13) obtidos deste. (b) Isolado PI08A e dois clones (C3 e C4) e uma população mista (C7) obtidos deste. a/b.1 – gel de agarose com os produtos de PCR referentes à reação ID 7, mostrando a presença (14 kb) ou não (1,2 kb) do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380,

LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. a/b.2 – Susceptibilidade *in vitro* à miltefosina das formas promastigotas (* destaca diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados). a/b.3 – Curvas de crescimento em meio LIT suplementado com 10% de SFBi e 2% de urina..... 135

Figura 23 – Construções geradas a partir do vetor pGL631, verificação da integração das construções no locus ribossomal do isolado de *L. (L.) chagasi* (MG11A) e demonstração da expressão proteicas dos genes clonados. (a) pGL631. (b) pGL631-LinJ.31.2370. (c) pGL631-LinJ.31.2380. (d) pGL631-LinJ.31.2390. (e) pGL631-LinJ.31.2400. (f) pGL631-LinJ.31.2370-Ty. (g) pGL631-LinJ.31.2380-HA. (h) pGL631-LinJ.31.2390-Ty. (i) pGL631-LinJ.31.2400-HA. Os produtos de PCR foram separados e visualizados em gel de agarose-TAE 0,9%. Os valores de número de pares de bases dos produtos de PCR e de massa molecular das proteínas analisadas estão indicados ao lado das setas..... 139

Figura 24 – Caracterização dos clones reexpressando os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. Curvas de crescimento (a) e perfis de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina (b) do isolado MG11A e de seus mutantes reexpressando os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 ou LinJ.31.2400 na versão *Tagged* (Ty ou HA) e *Untagged*..... 140

Figura 25 – Alinhamento das sequências de nucleotídeos formadas pela junção das regiões intergênicas posicionadas logo acima do gene LinJ.31.2370 e logo abaixo do gene LinJ.31.2400 nos isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Visualização global do alinhamento dos fragmentos sequenciados dos isolados clínicos contra a sequência consenso de *L. (L.) chagasi* e o genoma de referência de *L. (L.) infantum* (JPCM5). (b) Zoom das extremidades das sequências alinhadas, destacando a posição onde ocorreu a perda do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. 142

Figura 26 – Mecanismo de perda dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 nos isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Localização das sequências repetidas no cromossomo 31 baseado na sequência formada pela junção das regiões intergênicas posicionadas logo acima do gene LinJ.31.2370 e logo abaixo do gene LinJ.31.2400. As sequências repetidas estão identificadas como “repeat1”, “repeat2”, “repeat3”, “repeat4”, “repeat5” e “repeat6” e o locus deletado do genoma está identificado como “Spliced Region”. (b) Processo de recombinação homóloga entre as regiões repetidas “repeat1” e “repeat2”, destacadas pelas setas em negrito e vermelha, levando à formação de um elemento extracromossomal, o qual contém os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400, destacados em azul. 143

Figura 27 – Indução de resistência à miltefosina e concomitante verificação de alteração no genoma em isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Avaliação da susceptibilidade *in vitro* das formas promastigotas de MA01A, MG11A e MG14A após cultivo em meio LIT contendo miltefosina em concentrações crescentes. (b) Perfil gênico dos isolados MA01A e MG14A quanto à presença do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 (isolados cultivados na ausência e na presença de miltefosina durante o processo de indução de resistência). As concentrações de miltefosina utilizadas em cada etapa do processo de indução de resistência estão especificadas nas figuras. Gel de agarose-TAE 0,6%. 145

Figura 28 – Modelo proposto para o mecanismo de resistência natural à miltefosina em *L. (L.) chagasi*. A miltefosina (círculos azuis) induz um aumento no nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), que leva ao *stress* oxidativo e então à morte celular (Moreira *et al.*, 2011). O aumento da abundância relativa das proteínas peroxirredoxina e fator de alongação 1-beta (EF-1 β) reduz o nível de ROS, fornecendo proteção contra o *stress* oxidativo. Além disso, o aumento na expressão das proteínas NADP-ADH (*NADP-dependent alcohol dehydrogenase*), chaperona Hsp60 e sti1 (*stress-induced protein*) também podem contribuir para manutenção da homeostase do sistema redox e assim inibir o *stress* oxidativo. A miltefosina também pode induzir o processo de morte celular por fragmentação do DNA (Paris *et al.*, 2004). Nessa via, o aumento da expressão da proteína PCNA (*Proliferative Cell Nuclear Antigen*) pode estar associado ao fenótipo de resistência à miltefosina, uma vez que essa proteína atua na reparação e replicação do DNA. A expressão aumentada da β -subunidade da ATPase (considerada elemento catalítico da bomba de efluxo ABC) também pode proteger a célula da morte celular induzida pela miltefosina, por redução do acúmulo intracelular da droga. N – núcleo; K – Kinetoplasto..... 151

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Técnicas de sequenciamento de nova geração..... | 45 |
| Tabela 2 – Isolados e cepa de referência de <i>L. (L.) chagasi</i> utilizados no presente estudo. | 57 |
| Tabela 3 – Desenho experimental do 2D-DIGE..... | 62 |
| Tabela 4 – Descrição dos <i>softwares</i> , linhas de comando e parâmetros utilizados nas análises de bioinformática. | 72 |
| Tabela 5 – Detalhes das reações de PCR utilizadas no presente estudo. | 74 |
| Tabela 6 – Informações dos iniciadores utilizados no presente estudo..... | 76 |
| Tabela 7 – <i>Spots</i> proteicos diferencialmente expressos entre os isolados de <i>L. (L.) chagasi</i> , obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina, identificados por espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF). | 91 |
| Tabela 8 – Proteínas identificadas com regulação aumentada no isolado de <i>L. (L.) chagasi</i> (MG11A) obtido do paciente que apresentou falha ao tratamento com miltefosina. | 101 |
| Tabela 9 – Proteínas identificadas com regulação reduzida no isolado de <i>L. (L.) chagasi</i> (MG11A) obtido do paciente que apresentou falha ao tratamento com miltefosina. | 102 |
| Tabela 10 – Resumo estatístico dos dados obtidos das análises de sequenciamento e mapeamento dos isolados/cepa de <i>L. (L.) chagasi</i> | 105 |
| Tabela 11 – Variações gênicas de SNPs entre os isolados de <i>L. (L.) chagasi</i> dos grupos cura e recidiva. | 107 |
| Tabela 12 – Variações gênicas de InDels entre os isolados de <i>L. (L.) chagasi</i> dos grupos cura e recidiva. | 116 |
| Tabela 13 – Genes com número aumentado de cópias nos isolados de <i>L. (L.) chagasi</i> do grupo recidiva. | 120 |
| Tabela 14 – Genes com número aumentado de cópias nos isolados de <i>L. (L.) chagasi</i> do grupo cura.... | 121 |
| Tabela 15 – Correlação entre os dados das análises de CNV de genes e proteômica. | 127 |
| Tabela A1 – Grupos ortólogos/Genes com variação no número de cópias (dose gênica) entre os isolados de <i>L. (L.) chagasi</i> dos grupos cura e recidiva ($p < 0,05$). | 184 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-DIGE – *Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis* (Gel de Eletroforese Bidimensional Diferencial).

2DE – *Two Dimensional Electrophoresis* (Eletroforese Bidimensional).

ABC – *ATP Binding Cassette*.

AmB – Anfotericina B.

BAM – *Binary Alignment/Map* (Alinhamento/Mapa binário).

CE₅₀ – Concentração da droga que produz 50% do efeito máximo.

CNV – *Copy Number Variation* (Variação do número de cópias).

DE₅₀ – Quantidade de droga que gera a resposta terapêutica em 50% da população analisada.

DIGE – *Differential Gel Electrophoresis* (Gel de Eletroforese Diferencial).

f_{pkm} – *Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped* (Fragmentos Por Kilobase de exon por Milhão de fragmentos mapeados).

GFF – *General Feature Format* (Formato de Características Gerais).

GM-CSF – Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor.

GO – *Gene Ontology*.

IEF – *Isoelectric Focusing* (Focalização Isoelétrica).

IFN- γ – Interferon γ .

InDel – *Insertion-Deletion* (Inserção e/ou Deleção).

IPG – *Immobilized pH Gradient* (Gradiente de pH imobilizado).

LbMT – *Leishmania (V.) brasiliensis Miltefosine Transporter* (Transportador de Miltefosina em *Leishmania (V.) brasiliensis*).

LbRos3 – *Leishmania (V.) brasiliensis β subunit for LbMT* (subunidade β de LbMT em *Leishmania (V.) brasiliensis*).

LdMT – *Leishmania (L.) donovani Miltefosine Transporter* (Transportador de Miltefosina em *Leishmania (L.) donovani*).

LdRos3 – *Leishmania (L.) donovani* β subunit for LdMT (subunidade β de LdMT em *Leishmania (L.) donovani*).

LV – Leishmaniose Visceral.

m/z – Relação massa/carga.

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (Ionização/Dessorção a Laser assistida por Matrix).

MT – *Miltefosine Transporter* (Transportador de Miltefosina).

NCBI nr – *National Center for Biotechnology Information non-redundant* (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundantes).

NGS – *Next-Generation Sequencing* (Sequenciamento de Próxima/Nova Geração).

ORF – *Open Reading Frame* (Fase de Leitura Aberta).

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase).

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium* (meio de cultura Roswell Park Memorial Institute).

SAM – *Sequence Alignment/Map* (Alinhamento/Mapa de sequências).

Sb(III) – Antimonial trivalente.

Sb(V) – Antimonial pentavalente.

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliácridamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio).

SFBi – Soro Fetal Bovino inativado.

SNP – *Single-Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Nucleotídeo Único ou Polimorfismo de Nucleotídeo Simples).

ToF – *Time of Flight* (Tempo de Voo).

TSV – *Tab-Separated Values* (Valores Separados por Tabulação).

$\Delta\Psi_m$ – Potencial da membrana mitocondrial.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 24 |
| 1. LEISHMANIOSE VISCERAL | 24 |
| 2. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL | 27 |
| 2.1. ANTIMONIAIS PENTAVALENTES | 28 |
| 2.2. ANFOTERICINA B | 29 |
| 2.3. MILTEFOSINA | 30 |
| 2.3.1. Mecanismo de Ação Anti- <i>Leishmania</i> da Miltefosina | 32 |
| 2.3.2. Variação de Susceptibilidade à Miltefosina entre as Formas Evolutivas e entre as Diferentes Espécies de <i>Leishmania</i> | 35 |
| 2.3.3. Mecanismos de Resistência à Miltefosina | 37 |
| 3. ANÁLISE PROTEÔMICA | 40 |
| 4. ANÁLISE GENÔMICA | 44 |
| OBJETIVOS | 50 |
| 1. OBJETIVO GERAL | 50 |
| 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 51 |
| METODOLOGIA | 53 |
| 1. ASPECTOS ÉTICOS | 53 |
| 2. REAGENTES | 54 |
| 3. ISOLADOS DE <i>Leishmania (L.) chagasi</i> E CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS | 56 |
| 4. CARACTERIZAÇÃO <i>in vitro</i> DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA | 58 |
| 4.1. SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> DE FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> À MILTEFOSINA | 58 |
| 4.2. SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> À MILTEFOSINA | 59 |

| | |
|--|----|
| 5. ANÁLISE PROTEÔMICA | 61 |
| 5.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO..... | 61 |
| 5.2. 2D-DIGE (<i>TWO-DIMENSIONAL DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS</i>) | 61 |
| 5.2.1. Marcação e Focalização Isoelétrica das Amostras | 62 |
| 5.2.2. Redução e Alquilação das Proteínas | 63 |
| 5.2.3. Segunda Dimensão – SDS-PAGE | 63 |
| 5.2.4. Processamento e Análise das Imagens | 63 |
| 5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS..... | 64 |
| 5.3.1. Digestão das Proteínas, Extração dos Peptídeos e Análise por Espectrometria de Massas | 64 |
| 5.3.2. Pesquisa em Banco de Dados | 65 |
| 5.4. VALIDAÇÃO DA ANÁLISE PROTEÔMICA | 66 |
| 6. ANÁLISE GENÔMICA..... | 67 |
| 6.1. OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO..... | 67 |
| 6.2. SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO | 67 |
| 6.3. ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS OBTIDOS POR NGS | 68 |
| 6.3.1. Alinhamento e Realinhamento | 68 |
| 6.3.2. Análise de Variação Estrutural: Variação no Número de Cópias de Genes e de Cromossomos..... | 69 |
| 6.3.3. Análise de SNPs e InDels..... | 70 |
| 6.4. VALIDAÇÃO DAS PREDIÇÕES DA ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA | 73 |
| 6.5. VERIFICAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DOS ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 77 |
| 6.6. REEXPRESSION GÊNICA NO LOCUS RIBOSSOMAL DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 77 |
| 6.6.1. Obtenção das Construções | 78 |
| 6.6.2. Transfecção | 80 |
| 6.6.3. Verificação da Integração das Construções e da Reexpressão dos Produtos Gênicos..... | 81 |
| 6.7. INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE PERDA DE GENES EM <i>L. (L.) chagasi</i> | 83 |

| | |
|--|------------|
| 6.8. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA EM ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 84 |
| RESULTADOS | 86 |
| 1. CARACTERIZAÇÃO <i>in vitro</i> DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA DOS ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 86 |
| 2. ANÁLISE PROTEÔMICA | 88 |
| 2.1. COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEICO ENTRE ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> OBTIDOS DE PACIENTES QUE APRESENTARAM DIFERENTES RESPOSTAS AO TRATAMENTO COM MILTEFOSINA..... | 88 |
| 2.2. IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS PROTÉICOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS..... | 90 |
| 2.3. VALIDAÇÃO DA ANÁLISE PROTEÔMICA..... | 103 |
| 3. ANÁLISE GENÔMICA..... | 104 |
| 3.1. PADRÃO GENÔMICO DE DIVERSIDADE DE SNPs E InDels NOS ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 106 |
| 3.2. VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS DE CROMOSSOMOS E GENES NOS ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 117 |
| 3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES OBTIDOS DOS ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 134 |
| 3.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REEXPRESSÃO DOS GENES LINJ.31.2370, LINJ.31.2380, LINJ.31.2390 E LINJ.31.2400 NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA EM <i>L. (L.) chagasi</i> | 136 |
| 3.5. MECANISMO DE PERDA DOS GENES LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 E LinJ.31.2240 EM ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 141 |
| 3.6. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA EM ISOLADOS DE <i>L. (L.) chagasi</i> | 144 |
| DISCUSSÃO | 147 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 159 |
| PERSPECTIVAS | 161 |
| REFERÊNCIAS | 163 |
| ANEXOS | 184 |
| ANEXO 1 – DADOS DA ANÁLISE GENÔMICA DE CNV..... | 184 |
| ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO | 198 |

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. LEISHMANIOSE VISCERAL

Leishmaniose visceral (LV), também conhecida como “Kala-azar” (pele negra) ou “Kala-jwar” (febre negra), é uma doença sistêmica causada por parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* complexo *donovani* (Lasion e Shaw, 1987), que engloba as espécies: (i) *Leishmania (L.) donovani* (Laveran e Mesnil, 1903), agente causador de uma antroponose no sul do continente Asiático (Índia, Bangladesh e Nepal) e no leste africano; (ii) *Leishmania (L.) infantum* (Nicolle e Comte, 1908), encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e parte do continente Asiático; (iii) e *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937), agente etiológico de uma zoonose nas Américas (Bern *et al.*, 2008), recentemente considerada por alguns autores sinonímia da espécie *L. (L.) infantum* (Lukes *et al.*, 2007).

A leishmaniose visceral é endêmica em 65 países (Figura 1), com uma estimativa de 500.000 novos casos por ano. Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Etiópia apresentam os maiores índices epidemiológicos, que em conjunto perfazem 90% dos casos (WHO, 2010). Nas Américas, a LV humana ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina, sendo que 90% dos casos registrados ocorrem no Brasil (Brasil, 2014).

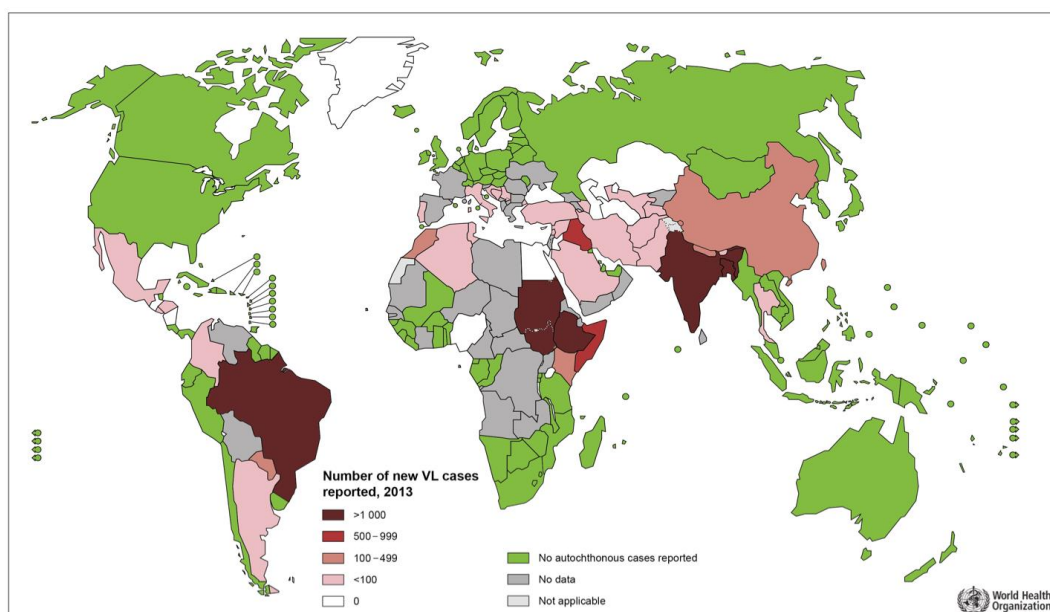


Figura 1 – Distribuição mundial de casos reportados de leishmaniose visceral, 2013. Adaptado de WHO (2013).

O ciclo evolutivo do parasita compreende duas formas principais distintas: promastigota, forma flagelada presente no tubo digestivo do vetor; e amastigota, forma imóvel, que se desenvolve no interior de células do sistema fagocitário mononuclear dos hospedeiros mamíferos (Figura 2). As formas infectantes (promastigotas metacíclicas) inoculadas na pele do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo de fêmeas do flebotomíneo infectadas, são internalizadas por células dendríticas e macrófagos residentes. Dentro do vacúolo parasitóforo dessas células, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, que sobrevivem e multiplicam-se no fagolisossomo por meio de uma complexa relação parasito-hospedeiro. Após intensa multiplicação das amastigotas, ocorre o rompimento das células infectadas e subsequente liberação dessas formas que vão infectar outras células fagocíticas. As células fagocíticas da pele, provavelmente células de Langerhans, são responsáveis pela disseminação dos parasitas por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos para os linfonodos, baço, fígado e medula óssea. A infecção do vetor ocorre por ingestão de macrófagos contendo formas amastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo anterior do inseto ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação dessas formas, que se diferenciam em promastigotas em aproximadamente 13 a 15 horas. As formas promastigotas multiplicam-se por divisão binária e transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em formas infectantes - promastigotas metacíclicas (Rittig e Bogdan, 2000; Besteiro *et al.*, 2007; Chappuis *et al.*, 2007).

Após o período de incubação, que ocorre geralmente entre 2 a 6 meses, os pacientes que não evoluíram para a cura clínica, apresentam sinais e sintomas de infecção sistêmica persistente (incluindo febre, calafrios, fadiga, fraqueza, perda de apetite e de peso) e invasão parasitária do sangue e do sistema fagocitário mononuclear (linfonodos, baço e fígado). A fadiga e fraqueza podem ser agravados pela anemia, a qual é causada por um estado inflamatório persistente, aumento da destruição periférica dos eritrócitos devido à esplenomegalia e, ocasionalmente, por sangramento. Com o avanço da doença, distensão abdominal e dor podem ser observadas em decorrência da intensificação da esplenomegalia e concomitante hepatomegalia. A LV, se não tratada evolui para óbito na quase totalidade dos casos (>95%) (Chappuis *et al.*, 2007).

A observação de que as infecções primárias, quando curadas, na maioria dos casos levam à proteção contra infecções futuras, sugere a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra leishmaniose (Chappuis *et al.*, 2007). Entretanto, até o momento não foi produzida uma vacina efetiva contra essa parasitose, sendo a quimioterapia a principal forma de controle/tratamento da leishmaniose visceral.

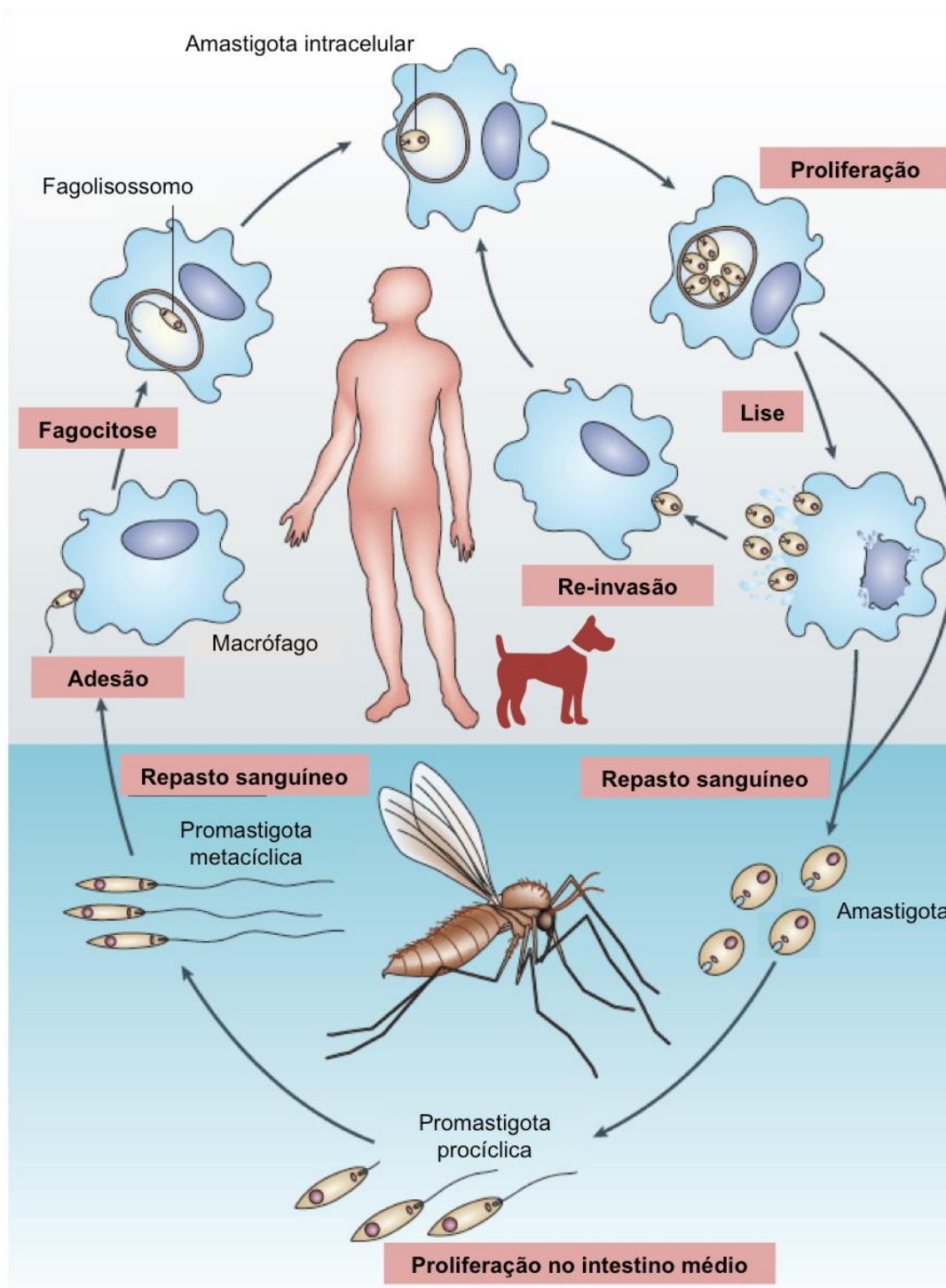


Figura 2 – Ciclo evolutivo das espécies de *Leishmania* spp. As formas promastigotas metacíclicas inoculadas na derme do hospedeiro, por fêmeas de flebotomíneos, são internalizadas por células fagocíticas residentes, e dentro do fagolisossomo se transformam em amastigotas. As formas amastigotas multiplicam-se, rompem a célula hospedeira e infectam outras células fagocíticas. As formas amastigotas disseminam-se por meio dos sistemas linfático e vascular e, ocasionalmente infiltram a medula óssea, fígado e baço. Adaptado de Handman (2001).

2. TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Com o desenvolvimento de novas drogas e o aperfeiçoamento de suas formulações já em uso, a terapia contra leishmaniose visceral vem se mostrando mais promissora nas últimas décadas. Contudo, as drogas atualmente disponíveis apresentam limitações quanto ao número de opções terapêuticas, eficácia, via de administração (parenteral, exceto para miltefosina), toxicidade, tempo prolongado de tratamento e necessidade de hospitalização e monitoramento. As drogas preconizadas para a terapia da LV incluem os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina, cujas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 3.

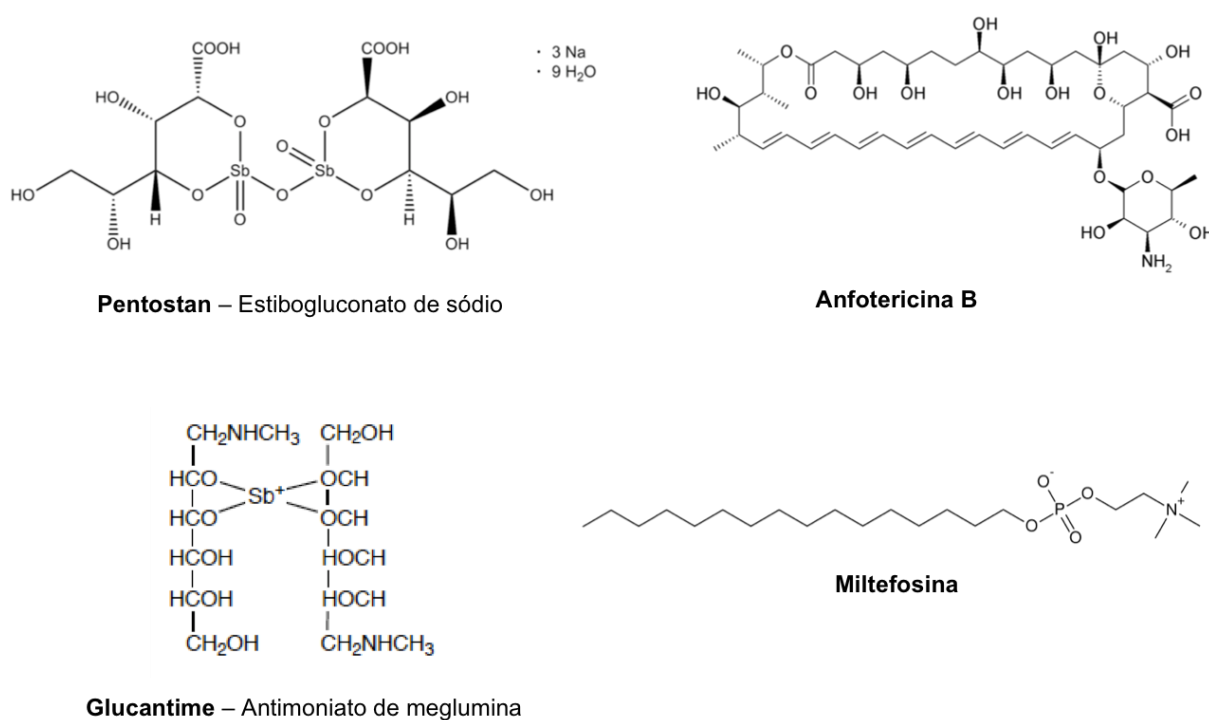


Figura 3 – Estrutura química das drogas atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose visceral. Adaptado de Wikipedia (2010) e Croft e Coombs (2003).

2.1. ANTIMONIAIS PENTAVALENTES

Os antimoniais pentavalentes (Sb(V)) (estibogluconato de sódio – Pentostam; e antimoniato de meglumina – Glucantime) foram introduzidos na terapia da leishmaniose visceral no ano de 1945 e ainda permanecem como droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses em diversas partes do mundo. Apesar de décadas de uso o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi completamente elucidado.

Os Sb(V) são caracterizados como pró-drogas, pois para desencadear sua atividade anti-*Leishmania* eles devem ser convertidos a antimonial trivalente (Sb(III)) (Carter *et al.*, 2006; Singh, 2006; Kothari *et al.*, 2007). Evidências de estudos *in vitro* indicam que essas drogas atuam por: (i) indução de apoptose em *Leishmania* spp. (Lee *et al.*, 2002; Singh, 2006); (ii) e inibição da tripanotona redutase, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio devido à perda intracelular de tióis (Singh, 2006; Wyllie *et al.*, 2008).

Os antimoniais têm se tornado obsoletos em certas áreas da Índia e arredores, onde a resistência à droga aumentou drasticamente nos últimos anos, como demonstrado pela redução significativa de sua eficácia (a dose e/ou duração do tratamento aumentou 10 vezes em relação ao tratamento usual) e pelo aumento na porcentagem de falha terapêutica (>60%) (Sundar, 2001). Apesar do uso dos Sb(V) ter sido abandonado na Índia, essas drogas ainda permanecem como tratamento de primeira escolha na maioria das outras áreas endêmicas para LV, onde a taxa de cura excede a 90% e poucos casos de recidiva são reportados (Minodier *et al.*, 1998; Maltezou *et al.*, 2000; Raguenaud *et al.*, 2007; Gradoni *et al.*, 2008). Entretanto, a terapia com Sb(V) apresenta desvantagens devido à ação teratogênica e cardiopéssica, as quais limitam seu uso em grávidas e pacientes cardíacos (Thakur e Narayan, 2004; Pagliano *et al.*, 2005), e aos efeitos adversos ocasionais (náusea, vômito, artralgia, disritmia cardíaca, hepatites, aumento dos níveis das transaminases hepáticas, pancreatites e pneumonites) (Minodier *et al.*, 1998; Maltezou *et al.*, 2000; Sundar *et al.*, 2000; Raguenaud *et al.*, 2007; Moore e Lockwood, 2010).

2.2. ANFOTERICINA B

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico poliênico que vem sendo utilizado desde a década de 60 como tratamento de segunda escolha para as leishmanioses e, em áreas com alto índice de resistência aos antimoniais já é usada como droga de primeira escolha. Esse composto apresenta atividade seletiva contra *Leishmania* spp. devido à sua maior afinidade pelo ergosterol (esteróide predominante nas células de *Leishmania* spp.) que pelo colesterol (esteróide predominante nas células de mamíferos) (Goad *et al.*, 1984; Croft *et al.*, 2006). A anfotericina B apresenta alta efetividade como droga anti-*Leishmania*, mesmo no tratamento dos casos de resistência aos antimoniais (Thakur *et al.*, 1999). Contudo, a sua formulação convencional (desoxicolato) apresenta desvantagens, como administração parenteral lenta e elevada toxicidade associada com graves efeitos adversos (febre e calafrios durante a infusão, nefrotoxicidade, hipocalcemia e queda do nível de hemoglobina), que limitam sua utilização (Sundar *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de formulações lipídicas da AmB (Ambisome, lipossomal; Abelcet, complexo lipídico; e Amphocil, dispersão de colesterol) tem sobrepujado as desvantagens da formulação convencional, tornando as reações adversas negligenciáveis com melhoria da qualidade terapêutica dessa droga. Estas formulações apresentam seletividade pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando a atividade anti-*Leishmania* localizada e a efetividade com doses menores (Adler-Moore e Proffitt, 2003; Croft e Coombs, 2003; Maltezou, 2010). A formulação lipossomal tem mostrado taxa de cura superior a 95% em pacientes da Índia com LV (Sundar *et al.*, 2004) e seu esquema terapêutico vem sendo otimizado quanto ao tempo de tratamento (3 a 5 dias) com o objetivo de reduzir custos com cuidados hospitalares, necessários durante o período de tratamento (Thakur *et al.*, 1996; Sundar *et al.*, 2002b; Gradoni *et al.*, 2008). Entretanto, o elevado custo dessa formulação, mesmo utilizando os esquemas terapêuticos mais curtos, limita sua utilização.

Embora alguns casos de recidivas tenham sido observados após o tratamento com AmB, especialmente em pacientes HIV positivos, a ocorrência de resistência em isolados clínicos ainda não é considerada um problema (Durand *et al.*, 1998; Di Giorgio *et al.*, 1999; Lachaud *et al.*, 2009). Contudo, com a disseminação do uso dessa droga, especialmente das formulações lipídicas, que apresentam elevada meia-vida plasmática, a possibilidade de ocorrência de resistência não pode ser ignorada.

2.3. MILTEFOSINA

O avanço mais significativo na terapia da leishmaniose visceral nos últimos anos foi a descoberta de uma droga oral efetiva, a miltefosina (hexadecilfosfocolina), um análogo de fosfolipídio. A miltefosina é a primeira droga de administração oral registrada para o tratamento da leishmaniose visceral e mais recentemente para tratamento da leishmaniose cutânea (Croft e Engel, 2006; Chrusciak-Talhari *et al.*, 2011; Monge-Maillo e Lopez-Velez, 2015).

O desenvolvimento de derivados de fosfolipídios como droga baseou-se essencialmente em relatos prévios de sua atividade antineoplásica. A miltefosina foi sintetizada de forma independente pelos pesquisadores Bill Pendergast e Joseph Chan em 1982 na Fundação Burroughs Wellcome (EUA) e pelo pesquisador Hansjoerg Eibl no Instituto Max-Planck (Alemanha) (Eibl e Unger, 1990). Esta droga foi usada com sucesso no tratamento de metástases cutâneas de câncer de mama, sendo a primeira droga antineoplásica de aplicação tópica (Miltex) registrada (Burk *et al.*, 1994).

Em 1984, esta droga, juntamente com outros alquil-fosfocolinas e um alquil-fosfoetanolamina, foi selecionada para um *screening* contra parasitas *Leishmania* spp. e tripanossomas, realizado em Beckenham, Reino Unido (Croft e Engel, 2006). Dentre as substâncias avaliadas, sete (incluindo a miltefosina) apresentaram atividade contra formas amastigotas e promastigotas de *L. (L.) donovani* (Croft *et al.*, 1987). A miltefosina apesar de não ter apresentado atividade muito elevada (5,0 µg/mL), no modelo *in vitro* de macrófagos de camundongos, apresentou a vantagem de ser bem tolerada pelas células hospedeiras e, portanto, foi uma das drogas selecionadas para a avaliação *in vivo* em camundongos BALB/c. Nesse estudo, foi determinada a DE₅₀ (quantidade de droga que gera a resposta terapêutica em 50% da população analisada) de 12,8 mg/kg/dia para a miltefosina administrada por via subcutânea durante 5 dias.

Subsequentemente, Unger e Kuhlencord, conhecendo os resultados de Croft e colaboradores (1987) e a biodisponibilidade oral da miltefosina (de estudos de fase II em pacientes com câncer) realizaram testes para verificar a eficácia oral da miltefosina em modelos *in vivo* (BALB/c) contra *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*. Os resultados desse estudo demonstraram que a miltefosina apresentou excelente atividade anti-*Leishmania*, alcançando níveis superiores a 95% de supressão da carga parasitária de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no fígado, baço e medula óssea após administração oral de 20 mg/kg/dia durante 5 dias. Ainda nesse estudo foi verificada uma maior atividade anti-*Leishmania* da miltefosina quando comparada ao estibogluconato de sódio (tratamento padrão) (Kuhlencord

et al., 1992). Esses resultados foram a base para a decisão do início do programa de desenvolvimento da miltefosina, para o tratamento da leishmaniose visceral, pela ASTA Medica (atual Zentaris) (Croft e Engel, 2006).

O primeiro ensaio clínico de fase I/II da miltefosina, o qual envolveu 30 pacientes com LV, foi iniciado por H. Murray, S. Sundar e ASTA Medica na Índia em 1997. Esse estudo estabeleceu que doses diárias de 100-150 mg da droga durante 28 dias foram bem toleradas e conduziram à elevada taxa de cura (Sundar *et al.*, 1998). Em seguida, outros estudos de fase II foram realizados, confirmando os resultados do estudo piloto descrito acima e acrescentando informações favoráveis à eficácia da miltefosina nos casos refratários aos antimoniais pentavalentes (Jha *et al.*, 1999; Sundar *et al.*, 1999). Esses resultados levaram a um estudo multicêntrico de fase III, envolvendo a Organização Mundial da Saúde (WHO/TDR – World Health Organization/Tropical Diseases Research), o governo indiano, e a indústria farmacêutica. Os dados obtidos nesse estudo de fase III mostraram um índice de cura de 94%, o que estabeleceu de forma inquestionável a eficácia anti-*Leishmania* da miltefosina (Engel, 2002; Ganguly, 2002; Sundar *et al.*, 2002a). Em março de 2002 a miltefosina (Impavido™) foi aprovada como a primeira droga de administração oral para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia (Sundar e Chatterjee, 2006) e, atualmente é também licenciada na Alemanha e Colômbia para o tratamento da leishmaniose visceral e cutânea, respectivamente (Maltezou, 2010).

Resultados satisfatórios da eficácia da miltefosina também têm sido relatados em pacientes portadores de LV coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Thakur *et al.*, 2000). Contudo, um estudo mais recente observou elevada taxa de recidiva entre esses pacientes após o tratamento com miltefosina (Sindermann *et al.*, 2004).

Os eventos adversos observados nos estudos clínicos da miltefosina para o tratamento da leishmaniose visceral em geral são brandos e toleráveis, sendo representados principalmente por desconforto gastrointestinal transitório como vômito e diarreia, e aumento dos níveis das transaminases hepáticas e da creatinina (Sundar *et al.*, 2002a; Bhattacharya *et al.*, 2007). As principais preocupações para o uso disseminado da miltefosina incluem o seu potencial teratogênico e sua elevada meia vida (150-200 h), a qual pode facilitar a emergência de parasitas resistentes, devido à permanência de níveis subterapêuticos da droga na corrente sanguínea por algumas semanas após o tratamento (Berman, 2005).

2.3.1. Mecanismo de Ação Anti-*Leishmania* da Miltefosina

O mecanismo a nível molecular da atividade anti-*Leishmania* da miltefosina ainda não está totalmente esclarecido e, parte do conhecimento desse mecanismo, tem sido obtido de estudos utilizando linhagens experimentais resistentes a essa droga. Contudo, a elucidação dos mecanismos de resistência tem claramente mostrado que o acúmulo intracelular da droga é um pré-requisito para a ação da miltefosina (Perez-Victoria *et al.*, 2006b), o qual ocorre em três diferentes etapas (Figura 4):

- *Ligação da droga no lado extracelular da membrana plasmática.* Sob condições normais de cultura, a miltefosina se liga à albumina, a qual atua como reservatório para a droga. Devido ao seu caráter anfifílico a miltefosina é capaz de se solubilizar em água e de se ligar à monocamadas lipídicas (Rakotomanga *et al.*, 2005), o que estabelece um equilíbrio entre a fração ligada à albumina e a fração ligada à membrana plasmática. Esse equilíbrio é deslocado pela concentração da droga, quantidade de albumina e pelo número de células (membrana plasmática) (Perez-Victoria *et al.*, 2003a).
- *Internalização da droga.* Apesar das moléculas fosfolipídicas se difundirem rapidamente na monocamada lipídica, o movimento *flip-flop* na bicamada lipídica é geralmente muito lento (Pomorski *et al.*, 2003). Dois possíveis mecanismos de internalização da miltefosina têm sido descritos: (i) endocitose dos monômeros de miltefosina integrados na membrana plasmática como membros da vesícula endocítica. Os parasitas *Leishmania* spp. apresentam elevada atividade endocítica, a qual é restrita a uma região especializada da bolsa flagelar (Mcconville *et al.*, 2002). Entretanto, essa via de internalização é importante apenas em circunstâncias em que a quantidade de droga ligada à membrana é extremamente alta; (ii) e translocação dos monômeros de miltefosina por atividade de proteínas flipases específicas. Esse é o mecanismo de internalização da miltefosina mais importante e depende de duas proteínas (transportador de miltefosina (MT – *Miltefosine Transporter*) e sua subunidade beta Ros3) que, provavelmente, formam um complexo de translocação na membrana plasmática (Perez-Victoria *et al.*, 2003a; Perez-Victoria *et al.*, 2006a).
- *Alvo intracelular, metabolismo e eliminação da miltefosina.* Os monômeros de miltefosina na face citosólica da membrana podem se desprender desta e estabelecer um equilíbrio com as membranas das organelas citoplasmáticas devido à sua solubilidade em água. Contudo, ainda não é conhecida a distribuição intracelular da miltefosina, assim como o seu acúmulo em organelas (Perez-Victoria

et al., 2006b). Enquanto a capacidade de internalizar a miltefosina é muito elevada, o metabolismo da droga dentro das células do parasita *Leishmania* é muito lento ou até mesmo negligenciável (Perez-Victoria *et al.*, 2003a), o que resulta em elevada concentração intracelular. Por fim, mecanismos de eliminação da droga, como exocitose ou atividade flopase por translocadores proteicos (membros da família de transportadores ABC), podem reduzir a concentração da droga dentro da célula do parasita (Perez-Victoria *et al.*, 2001; Rybczynska *et al.*, 2001).

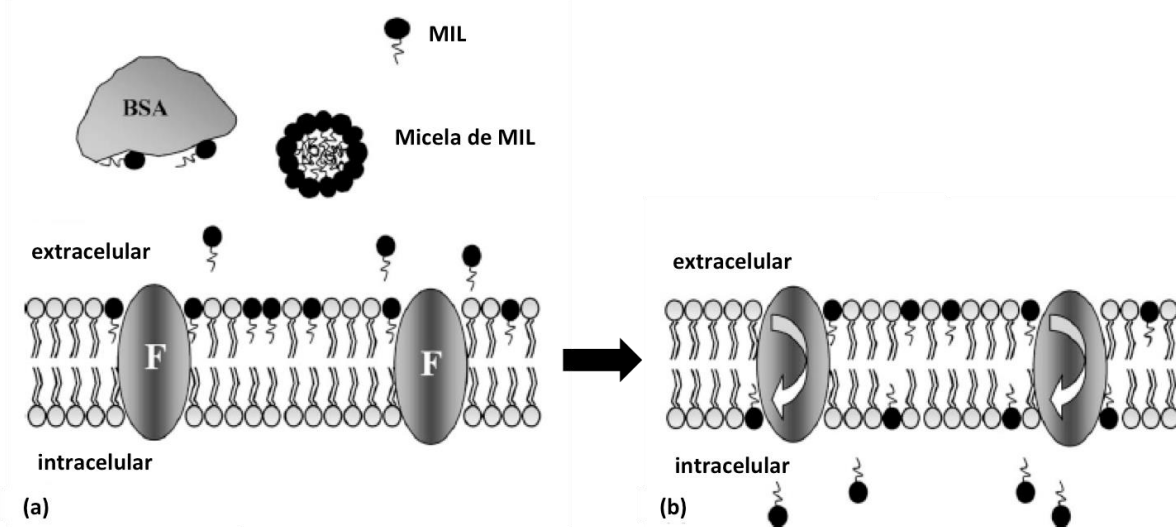


Figura 4 – Ligação e internalização da miltefosina em parasitas *Leishmania* spp. (a) A miltefosina é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório da droga. A ligação da droga do lado extracelular da membrana plasmática. (b) A fração de droga ligada à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade *flip-flop*. Adaptado de Perez-Victória e outros (2006b).

Estudos experimentais vêm demonstrando que o mecanismo de ação da miltefosina pode interferir com lipídios de membrana do parasita em diferentes níveis:

- Causando danos à membrana flagelar, com extensiva formação de protuberâncias (Santa-Rita *et al.*, 2000).
- Interferindo no metabolismo de alquil-lipídio e de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (Lux *et al.*, 1996) e no remodelamento de éter-lipídios, por meio de inibição (dose-dependente) da atividade da enzima alquil-liso-fosfatidilcolina aciltransferase específica (Lux *et al.*, 2000). Contudo a concentração de miltefosina necessária para

esta inibição é muito maior que a concentração capaz de matar os parasitas, o que sugere outro alvo primário da droga (Perez-Victoria *et al.*, 2006b).

- Inibindo a síntese *de novo* de fosfatidilcolina (Lira *et al.*, 2001). Fosfatidilcolina é o principal lipídio da membrana de *Leishmania* spp., representando 33% do total de lipídios e 50% dos fosfolipídios nesse parasita (Wassef *et al.*, 1985). Tem sido postulado que a colina possui função essencial no desenvolvimento dos parasitas *Leishmania*, implicando que esses possuam uma maquinaria para síntese *de novo* de fosfocolina a partir da colina e requer um transportador para incorporação de colina do hospedeiro, que é inibido pela miltefosina (Chaudhuri *et al.*, 1982; Zufferey e Mamoun, 2002).

A miltefosina também pode exercer sua atividade anti-*Leishmania* por modulação do processo de morte celular semelhante a apoptose, visto que fenômenos relacionados a esse processo (encarquilhamento celular, condensação do DNA nuclear, fragmentação do DNA e exposição de fosfatidilserina) têm sido reportados após o tratamento de tripanossomídeos com miltefosina (Paris *et al.*, 2004; Verma e Dey, 2004). Contudo, os estudos realizados por van der Sanden e colaboradores (2004) mostraram que a indução desse tipo de morte celular por essa droga não possui como via primária a inibição da síntese de fosfatidilcolina. Mais recentemente Azzouz e colaboradores (2005) sugeriram que a miltefosina também pode exercer sua ação leishmanicida por meio da inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, sendo esta última a mais afetada.

Outro possível alvo intracelular dos fosfolipídios em tripanossomídeos é a mitocôndria. Estudos experimentais demonstraram uma redução substancial do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após o tratamento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi* por miltefosina e edelfosina, respectivamente (Santa-Rita *et al.*, 2004; Santa-Rita *et al.*, 2005; Santa-Rita *et al.*, 2006). Associado a isto, Vergnes e colaboradores (2007) observaram variação nos níveis de expressão de HSP83 e SKCRP14.1, proteínas envolvidas no processo de manutenção do $\Delta\Psi_m$, em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* o que foi relacionada com o fenótipo de resistência *in vitro* à miltefosina. Luque-Ortega e Rivas (2007) também verificaram uma redução do nível intracelular de ATP e do consumo de oxigênio, em *L. (L.) donovani* após incubação com miltefosina, a qual foi relacionada com a inibição da fosforilação oxidativa (inibição específica da enzima citocromo c oxidase), principal fonte de síntese de ATP em *Leishmania* spp. (Van Hellemond e Tielens, 1997).

Também tem sido descrito que a miltefosina pode desempenhar sua ação anti-*Leishmania* de forma indireta, por meio de seu efeito imunomodulador, o qual tem sido relacionado com sua atividade coestimulatória *in vitro* sobre células T e macrófagos (Vehmeier *et al.*, 1991; Eue *et al.*, 1995; Safa *et al.*, 1997), assim como com o aumento da síntese de IFN- γ e GM-CSF por células mononucleares periféricas humanas (Hochhuth *et al.*, 1992). Em sua formulação lipossomal, a miltefosina foi capaz de induzir a síntese de óxido nítrico em linhagem U937 de histiócitos humanos ou em macrófagos peritoneais (Eue *et al.*, 1995; Zeisig *et al.*, 1995). Adicionalmente, o tratamento oral com altas doses de miltefosina (45 mg/kg/dose por 5 dias) levou a um aumento significativo no recrutamento de células endoteliais, macrófagos, células T *helper*, células T citotóxicas e de células B no baço de camundongos sem timo (Safa *et al.*, 1997). Recentemente, foi observado que macrófagos infectados com *L. (L.) donovani* e posteriormente tratados com miltefosina, aumentam a resposta ao IFN- γ , por meio do aumento do número de receptores para IFN- γ , e revertem a resposta imunológica do tipo Th2 para Th1 por meio da indução de IL-12 (Wadhone *et al.*, 2009).

Contudo, estudos da atividade da miltefosina contra *L. (L.) donovani* em camundongos imunodeficientes em células T e B e em macrófagos ativados, têm mostrado que esses tipos de respostas imunes não são necessárias para a atividade da miltefosina sobre *L. (L.) donovani* (Murray e Delph-Etienne, 2000; Escobar *et al.*, 2001). Dessa forma, a miltefosina pode ser uma droga potencialmente útil no tratamento de leishmanioses em pacientes com imunodeficiência, como, por exemplo, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

2.3.2. Variação de Susceptibilidade à Miltefosina entre as Formas Evolutivas e entre as Diferentes Espécies de *Leishmania*

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* mostraram que a miltefosina apresenta atividade antiparasitária contra as formas amastigotas e promastigotas de várias espécies de *Leishmania* (Croft *et al.*, 1987; Kuhlencord *et al.*, 1992; Croft *et al.*, 1996; Le Fichoux *et al.*, 1998; Unger, 1998; Escobar *et al.*, 2001; Escobar *et al.*, 2002), apresentando, entretanto, variação na sua eficácia dependendo da forma evolutiva e da espécie do parasita.

Escobar e colaboradores (2002) avaliaram a sensibilidade *in vitro* à miltefosina de seis diferentes espécies de *Leishmania* (*L. (L.) donovani*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) major*), e observaram que a espécie *L. (L.) donovani*

apresentou maior susceptibilidade, tanto na forma amastigota quanto na forma promastigota (CE_{50} de 4,6 – 3,3 μM e 0,4 – 0,5 μM , respectivamente), enquanto a espécie *L. (L.) major* apresentou menor susceptibilidade (CE_{50} de 31,6 – 37,2 μM para a forma amastigota e de 4,8 – 13,1 μM para a forma promastigota). Esses mesmos autores também observaram que, independente da espécie de *Leishmania*, formas promastigotas apresentaram maior susceptibilidade à miltefosina que as suas respectivas formas amastigotas.

Por outro lado, Azzous e colaboradores (2005) verificaram que as formas promastigotas foram menos susceptíveis (CE_{50} de 26,73 – 33,31 μM) que as formas amastigotas (CE_{50} de 16,46 – 23,16 μM) de *L. (L.) donovani*, e sugeriram que os alquil-fosfolípidios aumentam a citotoxicidade dos macrófagos e conseqüentemente ajudam a eliminar os parasitas dentro das células infectadas, uma vez que já foi demonstrado que lisofosfolípidios estimulam a explosão respiratória em macrófagos peritoneais (Brachwitz e Vollgraf, 1995).

Utilizando o modelo experimental de infecção de macrófagos, Yardley e colaboradores (2005) também observaram uma variação significativa na sensibilidade à miltefosina em isolados clínicos de diferentes espécies de *Leishmania* do Peru e do Nepal. Todos os isolados de *L. (L.) donovani* oriundos de pacientes Nepaleses, respondedores ou não-respondedores ao antimoniato pentavalente, apresentaram sensibilidade intrínseca à miltefosina com CE_{50} variando de 0,1 a 14 μM . Já os isolados de pacientes com leishmaniose cutânea do Peru, pertencentes ao complexo *L. (Viannia) braziliensis*, apresentaram-se resistentes à miltefosina até 73 μM , com exceção da espécie *L. (V.) lainsoni*, a qual apresentou CE_{50} comparável (4,6 – 8,3 μM) aos valores encontrados para *L. (L.) donovani*.

Diferenças na eficácia do tratamento com a miltefosina, em relação a diferentes espécies de *Leishmania*, também foram observadas em um ensaio clínico controlado realizado na Colômbia e Guatemala, onde os pacientes receberam 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias para o tratamento de leishmaniose cutânea (Soto *et al.*, 2004). Na Colômbia, onde a espécie *L. (V.) panamensis* é predominante, foi observado taxas de cura de 91% para o grupo tratado com miltefosina, enquanto na Guatemala, onde as espécies predominantes são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, taxa de cura de apenas 53% foi alcançada.

Outro estudo realizado na Bolívia revelou que a eficácia da miltefosina também pode variar dentro de uma mesma espécie de *Leishmania*, distribuídas em diferentes regiões geográficas, uma vez que uma taxa de cura superior (88%) àquela encontrada na Guatemala (53%) foi observada após o tratamento com miltefosina em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) braziliensis* (Soto *et al.*, 2008). Dessa forma, a

miltefosina tem se mostrado mais efetiva para isolados de *L. (V.) braziliensis* dessa região do que para *L. (V.) braziliensis* encontrada na Guatemala (Soto *et al.*, 2004).

Da mesma forma, um ensaio clínico desenvolvido por nosso grupo de pesquisa para avaliar a eficácia da miltefosina em pacientes portadores de LV no Brasil, observou uma alta taxa de recidiva após o tratamento com 2,5 mg de miltefosina/kg/dia durante 28 (Montes Claros – MG) ou 42 dias (Piauí) (dados não publicados). Diferente dos resultados encontrados nos ensaios clínicos desenvolvidos na Índia, em que apenas 6% de falha terapêutica foram reportados (Sundar *et al.*, 2002a), cerca de 50% dos pacientes avaliados no Brasil apresentaram recidiva após o tratamento com miltefosina, o que levou à interrupção do estudo. Uma hipótese investigada foi a ocorrência de sensibilidade variada à miltefosina entre isolados de *L. (L.) chagasi*, justificando a alta taxa de recidiva dos pacientes portadores de LV tratados no Brasil. Os resultados obtidos de ensaios de infecção *in vitro* de macrófagos murinos demonstraram que, na maioria dos casos, os isolados de pacientes que apresentaram recidiva eram resistentes à miltefosina, enquanto todos os isolados de pacientes que evoluíram para a cura eram sensíveis à miltefosina. Esses dados corroboram, portanto, a hipótese de que a recidiva da LV em pacientes tratados com miltefosina no Brasil pode ser devida à resistência primária desses isolados à droga (Monti-Rocha, 2012).

2.3.3. Mecanismos de Resistência à Miltefosina

Na tentativa de elucidar os mecanismos de resistência de *Leishmania* spp. à miltefosina, vários estudos têm sido realizados utilizando principalmente parasitas resistentes à droga obtidos experimentalmente. A indução facilitada de linhagens resistentes à miltefosina, em laboratório, revela a magnitude biológica do parasita em evadir essa droga. A caracterização dessas linhagens resistentes indica que a redução no acúmulo intracelular da miltefosina no parasita está relacionada com os fenótipos de resistência observados (Perez-Victoria *et al.*, 2001; Perez-Victoria *et al.*, 2003b; Seifert *et al.*, 2003).

O primeiro estudo do mecanismo de resistência à miltefosina foi realizado utilizando uma linhagem experimental de *L. (L.) tropica* multidroga resistente (MDR), a qual apresentava elevada atividade de efluxo da droga. A caracterização desse parasita revelou que a redução intracelular dos análogos de fosfolipídios (miltefosina e edelfosina) estava associada com a expressão aumentada da glicoproteína-P MDR1, um membro da superfamília dos transportadores ABC (ATP Binding Cassette), que externaliza substâncias hidrofóbicas da célula (Perez-Victoria *et al.*, 2001). Apesar do envolvimento das proteínas

ABC na translocação de fosfolipídios, incluindo fosfatidilcolina, estar bem estabelecido em células de mamíferos (Bosch *et al.*, 1997; Borst *et al.*, 2000), os estudos realizados em parasitas *Leishmania* se limitam aos transportadores MDR1, ABCA1 e ABCA2.

Contudo, os estudos de Perez-Victória e colaboradores (2003a) demonstraram que, em uma linhagem experimental de *L. (L.) donovani* resistente à miltefosina, a redução no acúmulo intracelular da droga é principalmente devida a alterações na habilidade do parasita em internalizá-la, uma vez que, a taxa de efluxo e de endocitose da droga foram similares entre as linhagens selvagem e resistente. Essa linhagem resistente também apresentou menor acúmulo de um análogo de glicerofosfolípideo, sugerindo que a internalização de miltefosina e a translocação de lipídios podem compartilhar o mesmo transportador. Esses autores também demonstraram que o metabolismo da miltefosina pelo parasita *Leishmania* pode ser considerado negligenciável, o que descarta alterações nessa via como mecanismo de evasão à droga.

Em um trabalho posterior, esses mesmos autores (Perez-Victoria *et al.*, 2003b) identificaram e clonaram um transportador de miltefosina, LdMT (*L. donovani* Miltefosine Transporter), com um *Open Reading Frame* (ORF) que codifica uma proteína com 1.097 aminoácidos, que apresenta homologia com a ATPase II humana. Esse transportador pertence à subfamília de translocases de aminofosfolípeos e está localizado na membrana plasmática e na bolsa flagelar. LdMT é responsável pela translocação de miltefosina e de glicerofosfolípeos em parasitas *Leishmania*, modulando, portanto, a internalização e a potência de drogas análogas de fosfolipídios. Esses pesquisadores verificaram que as bases moleculares para o fenótipo de resistência consistiu na aquisição de distintas mutações pontuais em cada um dos alelos LdMT presente na linhagem resistente, levando, portanto, à perda de função do transportador. Nesse contexto, esses autores sugerem que qualquer mutação capaz de inativar o transportador LdMT resultará em perda de sensibilidade à miltefosina e, portanto, o gene completo deve ser analisado para o monitoramento de resistência à droga. Investigações complementares realizadas por Seifert e colaboradores (2007) revelaram que o fenótipo de resistência induzido, por mutação pontual ou por *knockout* do gene LdMT, em formas promastigotas de *L. (L.) donovani*, permaneceu após a transformação para o estágio amastigota intracelular.

Contudo, foi observado que apenas MT não é suficiente para exercer a atividade de translocação de fosfolipídios e da miltefosina pela membrana plasmática. A atividade de LdMT é dependente de uma β subunidade específica denominada LdRos3 (pertencente a família das proteínas CDC50/Lem3 – uma β subunidade de P_4 -ATPases) (Perez-Victoria *et al.*, 2006a). LdMT e LdRos3, provavelmente por fazerem parte de uma mesma maquinaria

de translocação do parasita, são mutuamente dependentes para alcançarem suas localizações adequadas na membrana plasmática (seu local de ação), assim como para exercerem sua atividade de flipase (Perez-Victoria *et al.*, 2006a). A menor capacidade de internalizar a miltefosina também foi relacionada com o baixo nível de expressão da subunidade LbRos3 e com a menor atividade do transportador LbMT em *L. (V.) brasiliensis*, os quais correspondem ao LdRos3 e ao LdMT em *L. (L.) donovani* (Sanchez-Canete *et al.*, 2009).

Outros possíveis mecanismos de resistência à miltefosina descritos são: alterações no conteúdo lipídico e no nível de insaturações de ácidos graxos e redução no nível de ergosterol, as quais foram observadas em formas promastigotas de *L. (L.) donovani* resistentes (Rakotomanga *et al.*, 2005); e aumento da expressão de proteínas (HSP83 e SKCRP14.1) relacionadas com a manutenção do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) a qual foi associada com o fenótipo de resistência à miltefosina em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* (Vergnes *et al.*, 2007).

Alguns fatores intrínsecos da droga também podem contribuir para a emergência disseminada de parasitas resistentes à miltefosina: (i) o longo tempo de tratamento (28 dias); (ii) a elevada meia-vida da miltefosina (150 – 200 h), a qual resulta em níveis sub-terapêuticos por algumas semanas após o tratamento; (iii) e o mecanismo de ação da miltefosina, que apesar de desconhecido até o momento, apresenta como pré-requisito a internalização da droga.

Na ausência de novas drogas, o conhecimento sobre as bases moleculares da falência do tratamento e o desenvolvimento de novas ferramentas para detecção desse fenômeno podem contribuir para o uso racional da miltefosina e para traçar novas estratégias terapêuticas para o seu uso no tratamento da LV. Nesse contexto, a análise de expressão proteica, por abordagem proteômica, assim como a análise do genoma, por sequenciamento de nova geração, têm se mostrado estratégias efetivas na identificação de marcadores moleculares envolvidos no fenótipo de resistência a drogas em parasitas do gênero *Leishmania* (Drummelsmith *et al.*, 2004; Vergnes *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008; El Fadili *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Downing *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2012; Ritt *et al.*, 2013).

3. ANÁLISE PROTEÔMICA

O termo proteoma foi utilizado primeiramente por Wasinger e colaboradores (1995) como proteínas complementares ao genoma. Tradicionalmente, proteômica é definido como a análise do conjunto completo de proteínas (proteoma) expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinada situação, podendo ser modificado pelas condições e estímulos os quais esse organismo está exposto.

Estudos em eucariotos e procariotos têm mostrado que o paradigma “um gene – uma proteína” é incorreto, visto que múltiplos produtos gênicos podem ser obtidos a partir de um único gene. Um produto gênico pode se apresentar em diversas formas (Figura 5), como resultado de *splicing* alternativo e de modificações cotraducionais e pós-traducionais (como fosforilações, glicosilação, acilação, etc.) (Jensen, 2004).

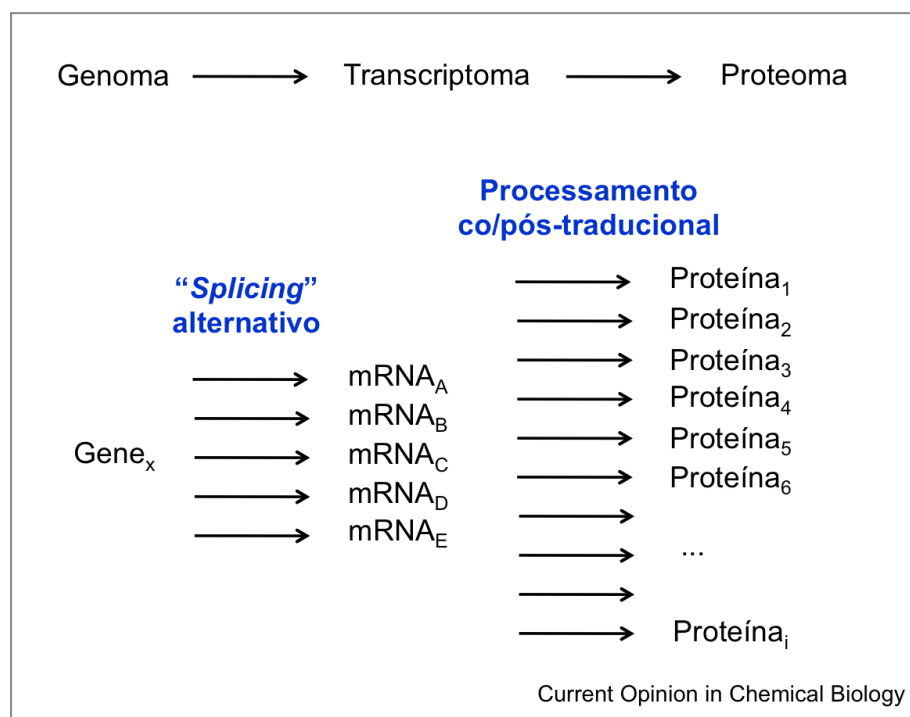


Figura 5 – Do genoma ao proteoma: um aumento na complexidade e na dinâmica. A diversidade de produtos gênicos oriundos de um único gene é devida principalmente aos *splicing* alternativos dos transcritos e às modificações cotraducionais e pós-traducionais das proteínas. É predito no genoma humano cerca de 30.000 ORFs, cada um dos quais, origina em média 6 diferentes espécies de mRNA. Esses são traduzidos a proteínas que são processadas em diferentes vias, gerando cerca de 8 a 10 diferentes formas modificadas de proteínas. Portanto, o genoma humano pode potencialmente produzir cerca de (30.000 x 6 x 10) 1.8 milhões de diferentes espécies proteicas. Adaptado de Jensen (2004).

As espécies pertencentes à ordem Kinetoplastida, como *Leishmania* spp., por exemplo, não apresentam interrupções (íntrons) entre as regiões codificantes, exceto para o gene que codifica a polimerase poli-A (Mair *et al.*, 2000), não ocorrendo, portanto, *splicing* alternativo do mRNA (RNA mensageiro). Dessa forma, modificações pós-traducionais e alguns tipos de modificações pós-transcricionais são as principais responsáveis pela variedade de produtos gênicos observados nesses organismos.

É importante ressaltar que em muitos casos os níveis de mRNA transcritos não apresentam uma correlação direta com a expressão proteica (Anderson e Seilhamer, 1997; Gygi *et al.*, 1999; Mcnicoll *et al.*, 2006). Nos tripanossomatídeos essa falta de correlação pode estar associada à transcrição policistrônica da maior parte dos genes, fazendo com que o controle da expressão do mRNA maduro, gerado a partir dos transcritos primários por *trans-splicing*, ocorra a nível pós-transcricional, dependendo: (i) da estabilidade do mRNA; (ii) do início da tradução; (iii) e da estabilidade da proteína traduzida (Gibson *et al.*, 1988; Agabian, 1990; Clayton, 2002; Haile e Papadopoulou, 2007). Dessa forma, o proteoma reflete a expressão das moléculas que influenciam mais diretamente a bioquímica e o funcionamento celular.

A análise proteômica clássica fornece métodos que permitem determinar a identidade e a abundância de proteínas constituintes do proteoma e o conhecimento da função proteica pode ser inferido pela variação de sua expressão. A abordagem proteômica foi estabelecida na década passada com o desenvolvimento de métodos de sequenciamento de proteínas, baseado na espectrometria de massas (MS), acoplado com métodos de eletroforese em gel ou cromatografia, para resolver misturas proteicas. O parâmetro crítico que define o sucesso ou não da análise proteômica é a habilidade de resolver proteínas de uma mistura complexa. Uma das técnicas mais efetivas para atingir esse objetivo é a eletroforese bidimensional (2DE), que apesar de apresentar algumas limitações relacionadas com a solubilização de proteínas de membrana (altamente hidrofóbicas) e segregação de proteínas de pontos isoelétricos (pI) e tamanhos extremos (geralmente limitada entre 10 e 120 kDa), é uma abordagem com capacidade de analisar milhares de proteínas simultaneamente (Gorg *et al.*, 2004; Vercauteren *et al.*, 2007).

Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas de acordo com sua carga líquida, por meio da focalização isoelétrica (IEF – *IsoElectric Focusing*), na primeira dimensão. Durante essa fase, as proteínas migram em direção ao eletrodo carregado, através de um gradiente específico de pH presente no gel, até alcançar seu pI, no qual a carga líquida da proteína é zero. Após a focalização isoelétrica, as proteínas são separadas na segunda dimensão baseada em sua massa molecular, usando a técnica padronizada de eletroforese

em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) (Figura 6) (O'farrell, 1975).

Uma inovação da técnica de 2DE clássica é a eletroforese diferencial (DIGE – *Differential Gel Electrophoresis*). Essa abordagem, por empregar corantes fluorescentes para marcar as proteínas antes das separações eletroforéticas, possibilita a análise de múltiplas amostras em um único gel (Unlu *et al.*, 1997). Além de reduzir a variabilidade entre as corridas de eletroforese, a metodologia 2D-DIGE apresenta resposta linear à abundância proteica, elevada sensibilidade (detecção na faixa de nanogramas de proteínas) e é compatível com a análise subsequente de identificação proteica por espectrometria de massas.

Após a separação, as proteínas reveladas são removidas e digeridas no gel com tripsina. Os fragmentos trípticos resultantes são extraídos do gel e analisados por espectrometria de massas (MS), sendo a tecnologia MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) uma das mais utilizadas. Para análise dos fragmentos trípticos, estes são ionizados pelo sistema e resolvidos com base na razão massa/carga (m/z). Do espectro de massas resultante, íons parentais são selecionados para segunda análise de MS, *in tandem*. Esses íons passam por uma célula de colisão, onde são submetidos a uma fragmentação ao longo da cadeia peptídica, produzindo um padrão predito de fragmentos (MS/MS). Diferenças entre as massas desses fragmentos no espectro MS/MS podem ser usados para determinar sequências de aminoácidos da proteína analisada (Figura 6). Os resultados de massas obtidos são comparados com dados depositados em bancos internacionais, utilizando *softwares* que identificam proteínas. A identificação pode ser feita pelo padrão obtido das massas intactas dos fragmentos trípticos (PMF – *Peptide Mass Fingerprinting*), pela sequência específica de fragmentos do MS/MS ou pela combinação desses.

Em geral, a abordagem proteômica por eletroforese 2D-MS, é utilizada com a finalidade de obter um mapa de referência e/ou o perfil de expressão proteica de um determinado organismo. O perfil de expressão proteica pode ser utilizado para identificar proteínas envolvidas em determinados processos fisiológicos como: proteínas reguladas em patógenos resistentes à drogas (Mcatee *et al.*, 2001; Drummelsmith *et al.*, 2003); comparação da expressão proteica em resposta a estímulos externos (Guina *et al.*, 2003; Kan *et al.*, 2004); mapeamento de alvos moleculares de drogas (Singh *et al.*, 2001); e proteínas específicas para cada estágio de vida de parasitas dimórficos (El Fakhry *et al.*, 2002; Bente *et al.*, 2003; Mojtahedi *et al.*, 2008).

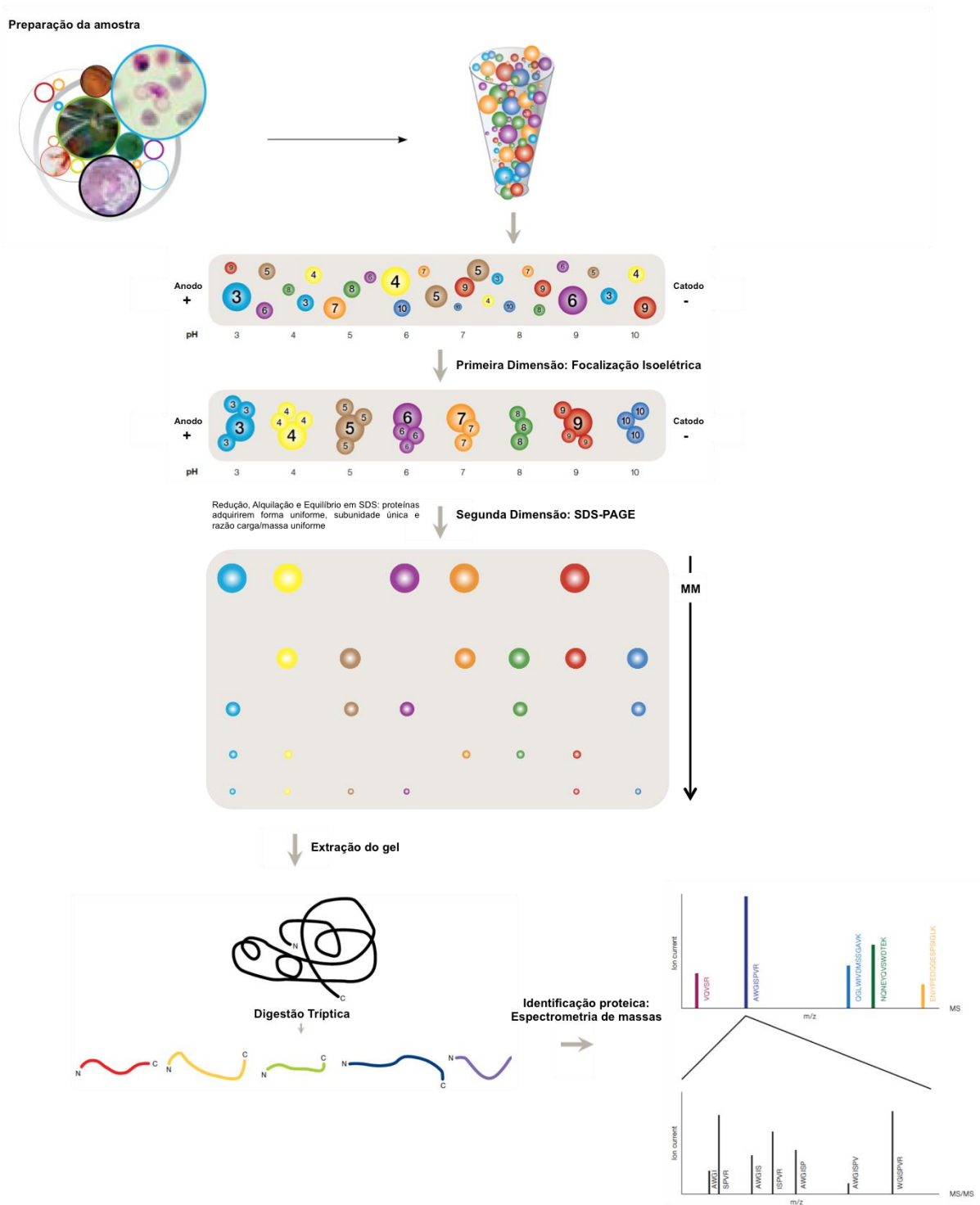


Figura 6 – Diagrama esquemático da separação de proteínas por eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas. Na primeira dimensão, as proteínas de uma mistura complexa são resolvidas por focalização isoelétrica em tira com gradiente de pH imobilizado (IPG – *Immobilized pH Gradient*) de acordo com o pI de cada proteína e independente do seu tamanho. Após a focalização isoelétrica, as proteínas são separadas pela sua massa molecular (MM) no sistema SDS-PAGE. Os spots proteicos de interesse são identificados por análise de espectrometria de massas *in tandem*. A análise dos fragmentos trípticos resulta no espectro de massas MS, do qual são selecionados íons parentais para serem fragmentados ao longo de sua cadeia peptídica, gerando o espectro MS/MS. Por meio da diferença entre as massas dos fragmentos do íon parental, sequências de aminoácidos do peptídeo podem ser determinadas. Adaptado de BIO-RAD (2015).

4. ANÁLISE GENÔMICA

Embora as abordagens “ômicas” como proteômica e metabolômica reflitam a expressão das moléculas que influenciam mais diretamente o fenótipo celular, o genoma é a fonte primária de informação de uma célula/organismo e, atualmente a genômica apresenta menos limitações técnicas, permitindo visualizar o conjunto de dados completo de um organismo, o qual pode prover informações relevantes sobre a biologia celular/molecular do mesmo.

A análise genômica é definida como a identificação, quantificação ou comparação das características genômicas como sequência do DNA, variação estrutural, expressão gênica, e/ou anotação dos elementos funcionais ou regulatórios em escala genômica (Nature, 2015).

A primeira tecnologia de sequenciamento de DNA foi desenvolvida em 1977 por Sanger e colaboradores. Essa técnica foi utilizada para gerar o primeiro genoma completamente sequenciado, do bacteriófago de fita simples ϕ X174, o qual apresenta 5.386 nucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977). Contudo, a tecnologia de sequenciamento de DNA disponível naquele momento até quase uma década depois só permitia o sequenciamento de algumas centenas de nucleotídeos por vez (Kircher e Kelso, 2010). Um significativo avanço na tecnologia de sequenciamento ocorreu após 1990 com o desenvolvimento da eletroforese de matriz capilar e sistemas de detecção apropriados (Zagursky e McCormick, 1990; Huang *et al.*, 1992; Kambara e Takahashi, 1993; Kim *et al.*, 1996). Contudo ainda não era possível realizar o sequenciamento de DNA em larga escala. Somente durante a última década que estratégias de sequenciamento de alto fluxo (*high-throughput sequencing*) tornaram-se disponíveis.

A tecnologia de sequenciamento de alto fluxo realiza o sequenciamento direto e paralelo de diversos fragmentos de DNA independentes, permitindo uma maior cobertura de sequenciamento. Contudo, os produtos de sequenciamento gerados são de pequena extensão, variando de 30 a 700 bp. As estratégias de sequenciamento de alto fluxo superaram as tecnologias prévias de sequenciamento por um fator de 100 – 1.000 no rendimento diário. Dessa forma, pesquisadores e empresas distribuidoras de equipamentos preferem utilizar o termo “Sequenciamento de Nova Geração” (*Next Generation Sequencing* – NGS) para refletir melhor as grandes mudanças tecnológicas desta área (Kircher e Kelso, 2010; Di Bella *et al.*, 2013). A tabela 1 mostra as técnicas de NGS atualmente disponíveis e algumas informações sobre as mesmas.

Tabela 1 – Técnicas de sequenciamento de nova geração.

| Sequenciador | Química | Tamanho dos reads (bp) | Tempo de corrida | Pares de bases por corrida | Reads por corrida |
|--|-------------------------------------|------------------------|--|---|---|
| Sequenciadores de grande porte | | | | | |
| 454 GS FLX + (Roche) | Pirossequenciamento | 700 | 23 h | 700 Mb | ~1.000.000 <i>shotgun</i> ~700.000 <i>amplicons</i> |
| HiSeq 2000/2500 (Illumina) | Terminação reversível | 2 x 150 | ↑ Rendimento: ~11 dias Análise rápida: ~27h | ↑ Rendimento: 600 Gb Análise rápida: 120Gb | ↑ Rendimento: 3 bilhões x 2 Análise rápida: 600 milhões x 2 |
| 5500xl W Solid (Life Technologies) | Ligação e codificação em duas bases | 1 x 75, 2 x 50 | 8 dias | ~320 Gb | 1,4 bilhões x 2 |
| Sequenciadores de bancada | | | | | |
| 454 GS Junior (Roche) | Pirossequenciamento | 400 | 8 h | 35 Mb | 100.000 <i>shotgun</i> 70.000 <i>amplicons</i> |
| Ion PMG (Life Technologies) | Detecção de prótons | 100 ou 200 | 3 h | 100 Mb (314 chip) 1Gb (316 chip) 2Gb (318 chip) | 400-550 mil (314 chip) 2-3 milhões (316 chip) 4-5,5 milhões (318chip) |
| MiSeq (Illumina) | Terminação reversível | 2 x 250 | 27 h | 8,35 Gb | 6,8 milhões |
| Adaptado de Di Bella e colaboradores (2013). | | | | | |

Abaixo, será feita uma descrição da técnica de sequenciamento de nova geração baseado na tecnologia utilizada pelo Illumina Genome Analyzer (GA), a qual foi empregada no sequenciamento do genoma dos isolados de *L. (L.) chagasi* analisados neste estudo.

O sequenciamento pelo Illumina GA inicia com a geração de uma biblioteca formada a partir do DNA fragmentado de forma aleatória (sonicação, por exemplo). Nessa técnica são utilizados dois diferentes adaptadores, os quais se ligam em cada uma das extremidades dos fragmentos obtidos. Em seguida, esses fragmentos são desnaturados e aleatoriamente distribuídos e imobilizados (por uma das extremidades) em uma superfície sólida proprietária da tecnologia denominada *Flow cell*, a qual é revestida por uma camada densa de oligonucleotídeos complementares aos dois tipos de adaptadores ligados às extremidades dos fragmentos (Mardis, 2008; Ansorge, 2009). Após a imobilização dos fragmentos, esses são amplificados pelo processo conhecido como PCR de fase sólida, utilizando a técnica de amplificação em “ponte”. Esse processo forma pequenos aglomerados de um mesmo fragmento (*clusters*), devido ao fato das novas cópias produzidas se ligarem à placa em regiões muito próximas ao fragmento original. Cada *cluster* contém aproximadamente um milhão de cópias do fragmento original, número suficiente para gerar uma intensidade de sinal seguramente detectável durante o sequenciamento (Figura 7) (Mardis, 2008).

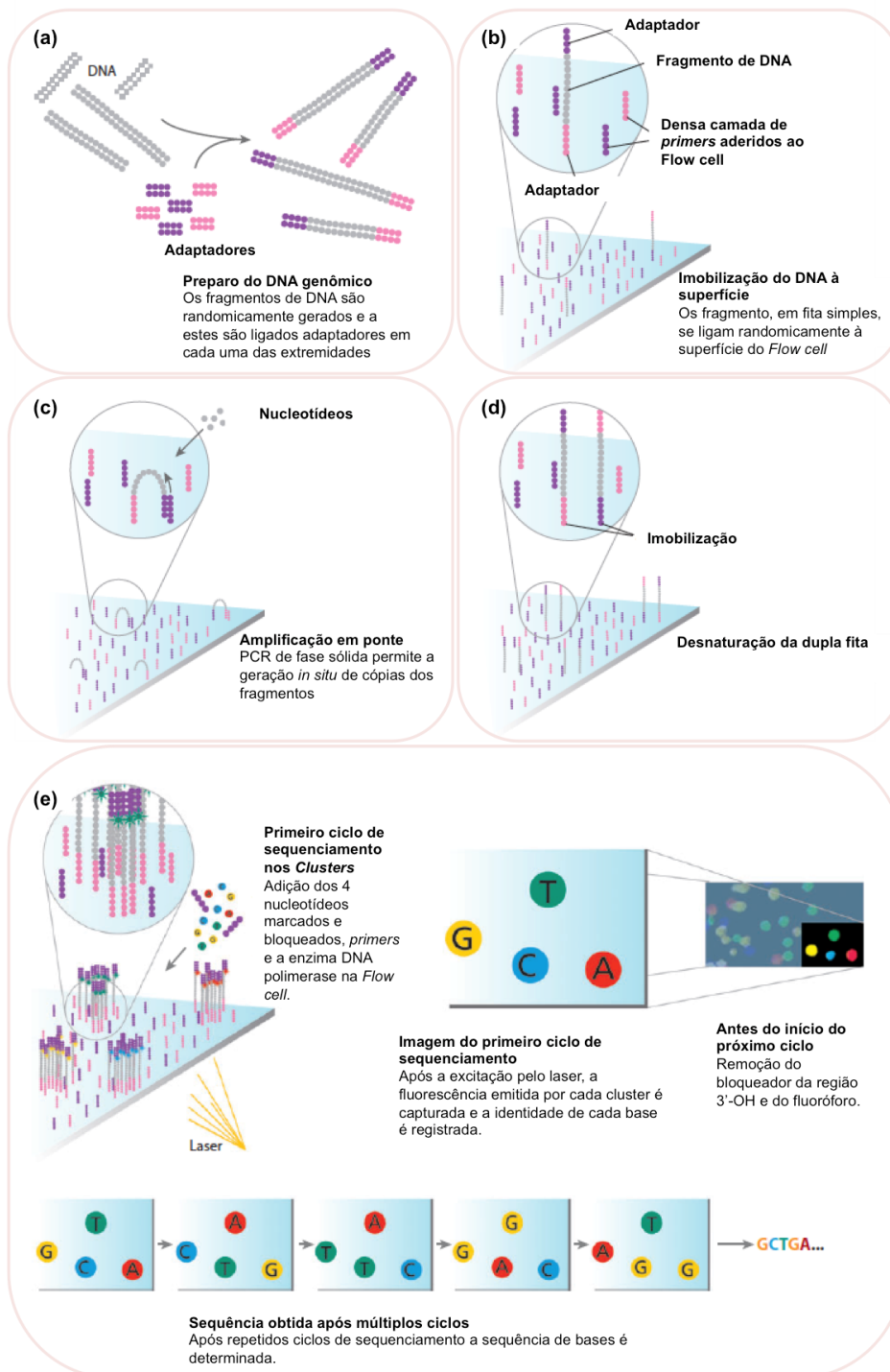


Figura 7 – Geração da biblioteca de sequenciamento e tecnologia de sequenciamento por terminação reversível do Illumina GA. (a) Preparo da amostra de DNA genômico. O DNA é aleatoriamente fragmentado e a cada extremidade dos fragmentos são acoplados adaptadores; (b) Após a desnaturação dos fragmentos acoplados aos adaptadores, esses são imobilizados nos canais da *Flow cell*, que contém moldes complementares aos adaptadores fixados em seu suporte sólido; (c) Geração dos *clusters* por amplificação em “ponte”. Nucleotídeos não marcados e a enzima DNA polimerase são utilizados para iniciar a amplificação de fase sólida, gerando fragmentos de fita dupla, em ponte; (d) Desnaturação das moléculas de fita dupla, gerando moldes de fita simples ancorados ao substrato. Ao término da fase de amplificação, milhões de *clusters* de fragmentos de DNA de fita simples são gerados em cada canal da *Flow cell*; (e) Os *primers* de sequenciamento anelam nos adaptadores ligados às sequências a serem determinadas e a enzima DNA polimerase, especialmente habilitada para incorporar os nucleotídeos modificados, é utilizada para amplificar a sequência complementar. A extensão da sequência complementar ocorre pela incorporação de nucleotídeos bloqueados e

marcados com fluoróforos. Dessa forma, após a incorporação de um nucleotídeo a reação é imediatamente paralisada. Em seguida, a polimerase e os nucleotídeos livres são removidos por uma etapa de lavagem e, o nucleotídeo incorporado em cada sequência é detectado. Posteriormente, o fluoróforo e o bloqueador são quimicamente removidos e o sequenciamento prossegue com a incorporação da próxima base nitrogenada. Adaptado de Mardis (2008).

Após a geração da biblioteca, o sequenciamento propriamente dito é iniciado. O Illumina GA utiliza a tecnologia de terminação reversível e emprega o conceito de sequenciamento por síntese, similar ao utilizado no sequenciamento de Sanger, ou seja: a reação de incorporação é reversivelmente paralisada após a incorporação de cada um dos nucleotídeos, os quais são quimicamente bloqueados na posição 3'-OH e individualmente marcados com diferentes fluoróforos. Após a detecção da base incorporada por cada *cluster*, o agente bloqueador e o fluoróforo são quimicamente removidos e a reação de amplificação prossegue em ciclos para que as próximas bases sejam incorporadas e determinadas (Bentley *et al.*, 2008; Turcatti *et al.*, 2008). É importante ressaltar que as sequências de milhões de *clusters* espalhados pela placa podem ser determinadas simultaneamente, resultando em uma vasta produção de dados de sequenciamento (Ansorge, 2009). A figura 7 (e) mostra essa parte do processo.

A tecnologia de sequenciamento de nova geração está revolucionando a investigação em biologia molecular com uma ampla e crescente gama de aplicações. Dentre as diversas aplicações do NGS, destacam-se: sequenciamento *de novo*, resequenciamento, RNA-seq (expressão gênica), detecção e caracterização de transcritos codificantes e não codificantes, identificação de perfil epigenético, metagenômica e análise genômica. Na análise genômica os dados gerados por essa abordagem podem ser utilizados para detectar mutações somáticas (SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*; InDel – *Insertion-Deletion*), assim como variações estruturais (CNV – *Copy Number Variation*, alteração no número de cópias de cromossomo e/ou gene) por todo o genoma de uma célula e/ou organismo (Mardis, 2008; Minoche *et al.*, 2011).

Utilizando o sequenciamento de nova geração Roger e colaboradores (2011) determinaram o genoma de referência para a espécie *L. (L.) mexicana* e refinaram os genomas de referência para as espécies *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*. Os resultados desse estudo mostram que, diferente de muitos organismos, os parasitas *Leishmania* spp. apresentam uma significativa plasticidade gênica, uma vez que uma elevada heterogeneidade em termos de amplificação gênica e de número de cópias de cromossomos entre as espécies de *Leishmania* analisadas foi observada. Outros estudos demonstraram que essa instabilidade na ploidia também pode ser observada entre isolados

de uma mesma espécie (*L. (L.) donovani*) (Downing *et al.*, 2011), e até mesmo entre células de uma mesma cepa (*L. (L.) major*) (Sterkers *et al.*, 2011). Esses dados sugerem que a ploidia nos parasitas *Leishmania* spp. é instável e pode flutuar em resposta às modificações nas condições ambientais. Essa variação na ploidia tem sido discutida nos últimos 20 anos, levando a classificação dos parasitas *Leishmania* spp. oscilar entre diploide e aneuploide (Sterkers *et al.*, 2012).

Os genomas haploides das espécies *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* estão organizados em 36 cromossomos (Wincker *et al.*, 1996), enquanto que os genomas das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* apresentam 35 e 34 cromossomos, respectivamente (resultado da fusão entre os cromossomos 20 e 34 na espécie *L. (V.) braziliensis* e das fusões entre os cromossomos 8 e 29 e, 20 e 36 na espécie *L. (L.) mexicana*) (Britto *et al.*, 1998). Os genomas dos parasitas *Leishmania* spp., semelhantes aos dos demais tripanossomatídeos, são caracterizados pelo elevado grau de sintonia, genes organizados em unidades de transcrição policistrônica e por apresentarem raros íntrons. Além disso, os genomas desses parasitas não possuem grandes regiões subteloméricas, as quais codificam genes espécie-específicos nos tripanossomatídeos Africanos (Berriman *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007).

Downing e colaboradores (2011) também utilizaram a abordagem por NGS para comparar o genoma de isolados de *L. (L.) donovani* obtidos de pacientes com LV, com diferentes susceptibilidades *in vitro* ao antimonial. Apesar de não identificarem um marcador molecular de resistência, esses autores observaram uma extensiva variação no número de cópias de cromossomos entre os isolados sensíveis e resistentes à droga, mostrando que o NGS é uma ferramenta capaz de prover informações adicionais para o entendimento do mecanismo de resistência a drogas em patógenos de importância médica.

Nesse cenário, no presente estudo foi empregado as metodologias 2D-DIGE-MS/MS e Illumina-NGS, que permitem identificar alterações no proteoma e no genoma dos isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes com LV que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina. Tendo como objetivo principal identificar marcadores de resistência em isolados de *L. (L.) chagasi*, visando contribuir para o entendimento do mecanismo molecular envolvidos na resistência natural à miltefosina.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Comparar o proteoma e o genoma de isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes com leishmaniose visceral que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina, visando contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência natural do parasita à esta droga.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de sensibilidade *in vitro* das formas promastigotas de isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina.
- Detectar e identificar, por meio de 2D-DIGE/MS, proteínas diferencialmente expressas em isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina.
- Analisar a diversidade genômica de isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina.
- Correlacionar os dados obtidos das abordagens proteômica e genômica, as quais os isolados de *L. (L.) chagasi* foram submetidos.
- Verificar por meio da técnica de clonagem a homogeneidade dos isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes com LV.
- Caracterizar o perfil de sensibilidade *in vitro* à miltefosina das formas promastigotas de clones, com diferentes genótipos, obtidos de isolados de *L. (L.) chagasi*.
- Caracterizar o perfil de sensibilidade *in vitro* à miltefosina das formas promastigotas dos mutantes de *L. (L.) chagasi* reexpressando genes no locus ribossomal.
- Caracterizar o mecanismo de perda de genes nos isolados de *L. (L.) chagasi*.
- Verificar o evento de deleção gênica após indução de resistência *in vitro* à miltefosina em isolados de *L. (L.) chagasi*.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

1. ASPECTOS ÉTICOS

A utilização dos isolados de *L. (L.) chagasi* de pacientes para o desenvolvimento deste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, sob o registro no CEP-066/07. Título: “Avaliação da sensibilidade *in vitro* à miltefosina de cepas de *Leishmania chagasi* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose visceral”.

Os experimentos em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número de registro 009/2010. Título: “Avaliação da sensibilidade *in vitro* à miltefosina de cepas de *Leishmania chagasi* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose visceral”.

2. REAGENTES

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água purificada em sistema Milli-Q e, todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica. As origens dos reagentes são:

Cultivo Celular e Teste de Susceptibilidade *in vitro*: Ágar, triptose e LIB (*Liver Infusion Broth*) da Becton, Dickinson and Company, (Brasil); cloreto de sódio, cloreto de potássio e fosfato dibásico de sódio da Merck S.A. (Brasil); Soro Fetal Bovino inativado (SFBi) da Cultiab (Brasil); bicarbonato de sódio, solução antibiótica (10.000 unidades de penicilina/mL e 10 mg estreptomicina /mL), RPMI-1640 (com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio), D(+)glucose, hemina, trietanolamina, resazurina, HEPES e 6-Biopterin da Sigma-Aldrich (EUA); miltefosina gentilmente doada pela Zentaris Inc. (Canadá); corante hematológico Panótico Rápido da Laborclin (Brasil); e puromicina 10 mg/mL da InvivoGen (Reino Unido); SDM79 da Gibco® – Life Technologies (Reino Unido).

Análise Proteômica: Bicarbonato de amônio e acetonitrila grau HPLC da Merck S.A. (Brasil); ácido fórmico, ácido trifluoracético (TFA), coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250), *cocktail* inibidor de proteases (para células mamíferas e extratos de tecidos) e anticorpo policlonal anti- α -tubulin (camundongo) da Sigma-Aldrich (EUA); anfólitos (Bio-Lyte 3 – 10), ureia, tiras com gradiente linear de pH imobilizado (*IPG strip*), 3-([3-*cholamidopropyl*] *dimethylammonio*)-1-*propanesulfonate* (CHAPS), *dithiothreitol* (DTT) e padrão de peso molecular para SDS-PAGE (*Broad Range*) da Bio-Rad Laboratories Inc. (EUA); tioureia, hidroximetil aminoetano (Tris), glicerol, iodoacetamida, glicina, kit de dosagem de proteína (2-D Quant Kit), tampão de reidratação (Destreak) e kit de marcação de proteínas (CyDye DIGE fluor labeling kit) da GE Healthcare (Reino Unido); *sodium dodecyl sulfate* (SDS) da J.T. Baker (EUA); solução de acrilamida-bis (*Acrylamide/Bis Solution* – 37,5:1 (30%T, 2.6%C)) da Serva Electrophoresis (Alemanha); agarose da BioAmérica Inc (EUA); *matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid* (CHCA) da Aldrich, (EUA); tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade*) da Promega (EUA); e anticorpo policlonal anti-EF-1 β (coelho) da Cedarlane (Canada).

Análise Genômica: Agarose grau biologia molecular da Bio-Rad Laboratories Inc. (EUA); betaína 5M, ampicilina, acetato de sódio e anticorpo monoclonal IgG Anti-HA (camundongo) da Sigma-Aldrich (EUA); Taq DNA Polimerase com ThermoPol® Buffer 5.000 U/mL, Phusion® High-Fidelity DNA Polimerase 2.000 U/mL, T4 DNA Ligase 400.000 U/mL, Quick-

Load 1kb Extend DNA Ladder 50 µg/mL, Scal-HF 20.000 U/mL, NotI-HF 20.000 U/mL, XbaI 20.000 U/mL, PaeI 10.000 U/mL, PmlI 10.000 U/mL e fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal* – CIP) 10.000 U/mL da New England BioLabs®inc (Reino Unido); pGem®-T Easy e anticorpo secundário monoclonal anti-IgG conjugado com peroxidase (camundongo) da Promega (EUA); UltraPure™ 10x TAE Buffer (400 mM Tris-Acetato; 10 mM EDTA), dNTPs Set 100 mM, SYBR® Safe DNA Gel Stain, Células competentes (Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells) e 1 kb plus da invitrogen – Life Technologies (Reino Unido); DNeasy® Blood & Tissue Kit, QIAprep® Spin Miniprep Kit, MinElute® Gel Extraction Kit, MinElute® PCR purification Kit e QIAquick® Gel Extraction Kit da QIAGEN® (Reino Unido); Human T Cell Nucleofector® Kit da Amaxa Biosystems (EUA); Long PCR Enzyme Mix da Thermo Scientific (EUA); NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (1,0 mm x 12 wells), NuPAGE, MOPS SDS Running Buffer (20X) e NuPAGE LDS sample Buffer (4x) da novex – Life Technologies (Reino Unido); Amersham™ Hybond™ P 0.45 µm PVDF e ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent da GE Healthcare (Reino Unido); anticorpo monoclonal anti-Ty (camundongo - *home made*); e filme Medical X-ray Blue / MXBE Film da Carestream (EUA).

3. ISOLADOS DE *Leishmania (L.) chagasi* E CULTIVO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS

Os isolados de *L. (L.) chagasi* utilizados neste estudo foram obtidos de pacientes com LV que participaram de um estudo clínico para avaliar a eficácia e a segurança da miltefosina no tratamento da LV no Brasil. Os isolados foram obtidos de aspirado de medula óssea em 3 diferentes tempos: (i) antes do tratamento; (ii) após o tratamento com 2,5 mg de miltefosina/kg/dia (durante 28 dias em Minas Gerais, ou durante 42 dias no Piauí e Maranhão); (iii) e, no caso de recidiva, durante a avaliação da mesma. Os pacientes arrolados foram acompanhados por seis meses após o término do tratamento. Cura foi definida pela ausência de sinais e sintomas da doença durante todo o período de acompanhamento e recidiva foi definida pela presença de sinais e sintomas da doença após o término do tratamento ou durante o período de acompanhamento. Neste estudo foram caracterizados 26 isolados obtidos antes do tratamento, quatro isolados obtidos após o tratamento e 2 isolados obtidos durante a falha do tratamento. Também foi utilizado neste estudo a cepa de referência para a espécie *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) (Tabela 2). Todos os isolados foram previamente identificados como *L. (L.) chagasi* por meio da técnica PCR-RFLP (Segatto *et al.*, 2012).

As formas promastigotas criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e cultivadas em meio bifásico ágar-sangue, Novy-MacNeal-Nicolle – NNN (Novy e Mcneal, 1903; Nicolle, 1908) associado ao meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) com 10% de SFBi. Após 3 – 4 dias de cultivo a 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) em estufa B.O.D., os parasitas foram examinados quanto à motilidade, morfologia e ausência de contaminação e reinoculadas em meio LIT suplementado com 10% de SFBi e 2% de urina masculina estéril (Howard *et al.*, 1991). Para análise proteômica e genômica, foram utilizados parasitas na fase logarítmica tardia de crescimento, a qual correspondeu ao 6º dia de cultivo.

A curva de crescimento, dos isolados em cultivo (densidade inicial = 1×10^6 células/mL) em meio LIT suplementado com 10% SFBi e 2% de urina masculina estéril, foi obtida a partir da determinação diária do número de células (promastigotas) por mL, em câmara de Neubauer.

Tabela 2 – Isolados e cepa de referência de *L. (L.) chagasi* utilizados no presente estudo.

| Isolado / cepa ^a | ID ^b | Região de coleta ^c | Tempo de tratamento | Resposta clínica ^d |
|-----------------------------|-----------------|--|---------------------|-------------------------------|
| MHOM/BR/06/MA01 | MA01A | Paraibano-MA | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/MA02 | MA02A | Codó-MA | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/MA03 | MA03A | Timon-MA | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/MA04 | MA04A | Codó-MA | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/MA05 | MA05A | Timon-MA | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/MA07 | MA07A | Caxias-MA | 42 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG11 | MG11A | Montes Claros-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG12 | MG12A | Montes Claros-MG | 28 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/MG13 | MG13A | São Francisco-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG14 | MG14A | Montes Claros-MG | 28 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/MG14 | MG14B | Bocaiúva-MG | 28 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/MG15 | MG15A | Porteirinha-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG16 | MG16A | São Francisco-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG17 | MG17A | Montes Claros-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG17 | MG17B | Montes Claros-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG17 | MG17C | Montes Claros-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG18 | MG18A | Montes Claros-MG | 28 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/MG19 | MG19A | Catuni-MG | 28 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/MG19 | MG19B | Catuni-MG | 28 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/PI01 | PI01A | José de Freitas-PI | 42 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/06/PI01 | PI01B | José de Freitas-PI | 42 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/06/PI01 | PI01C | José de Freitas-PI | 42 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/06/PI02 | PI02A | Valença do Piauí-PI | 42 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/06/PI03 | PI03A | Cabeceiras-PI | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/PI04 | PI04A | Valença do Piauí-PI | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/PI05 | PI05A | Valença do Piauí-PI | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/PI07 | PI07A | Piripiri-PI | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/PI08 | PI08A | Altos-PI | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/05/PI09 | PI09A | Nova Santa Rita-PI | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/PI10 | PI10A | Teresina-PI | 42 dias | Cura |
| MHOM/BR/06/PI11 | PI11A | José de Freitas-PI | 42 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/05/PI12 | PI12A | Lima Campos-PI | 42 dias | Recidiva |
| MHOM/BR/74/PP75 | PP75 | Cepa de referência para a espécie <i>L. (L.) chagasi</i> | | |

^a Código dos isolados/cepa de referência de *L. (L.) chagasi*.

^b Denominação dos isolados/cepa de referência de *L. (L.) chagasi* utilizados neste estudo. A, B e C correspondem à denominação estabelecida de acordo com o momento em que os isolados de *L. (L.) chagasi* foram obtidos dos pacientes. A – antes do tratamento; B – depois do tratamento; e C – durante a recidiva.

^c Regiões do Brasil em que foram realizadas o ensaio clínico e obtidos os isolados. MG – Minas Gerais; PI – Piauí; e MA – Maranhão.

^d Resposta clínica apresentada pelos pacientes com LV tratados com miltefosina.

4. CARACTERIZAÇÃO *in vitro* DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA

4.1. SENSIBILIDADE *in vitro* DE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania* À MILTEFOSINA

Os isolados de *L. (L.) chagasi* oriundos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina foram submetidos à análise de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina utilizando ensaios de infecção de macrófagos (Monti-Rocha, 2012).

Macrófagos peritoneais residentes foram obtidos de camundongos Suíços por lavagem com meio RPMI-1640. Os macrófagos foram plaqueados em lâminas de cultura de 16 poços (Lab-Tec™ – Chamber Slide – NUNC) com 8×10^4 células/poço (100 μ L de uma suspensão de macrófagos em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFBi) e incubados por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células não-aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI-1640 e os macrófagos aderentes foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, em fase logarítmica tardia, na razão de 7:1 (promastigotas:macrófagos) diluídas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFBi. A cultura foi mantida a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. Os parasitas extracelulares foram removidos da cultura por lavagem das células com meio RPMI-1640 e, em seguida, foram adicionadas diferentes concentrações da droga (0,55; 1,67; 5,0; e 15 μ M de miltefosina – maior concentração tolerada pelos macrófagos neste ensaio) preparadas em meio RPMI-1640/10% SFBi. Culturas não tratadas (0,0 μ M de miltefosina) foram utilizadas como controle. Após 72 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂, as células da cultura foram fixadas e coradas com o corante hematológico Panótico Rápido e 100 macrófagos/poço foram microscopicamente avaliados.

A atividade da droga foi avaliada pela porcentagem de células infectadas nas culturas tratadas com miltefosina em relação ao controle não-tratado de acordo com a Equação 1. A concentração de miltefosina que reduz em 50% o número de macrófagos infectados (IC₅₀) foi determinada por meio de análise de regressão logarítmica, utilizando o *software* Microsoft® Excel® 2008 v.12.1.0, e expressa como média \pm desvio padrão. Três ensaios independentes foram realizados em triplicata para cada isolado.

$$\%inibição = 100 - \left(\frac{C_{i \text{ tratado}}}{C_{i \text{ controle}}} \times 100 \right) \quad \text{Eq.1}$$

Onde:

- $C_{i \text{ tratado}}$ = número de células infectadas, em 100 células avaliadas, na cultura tratada com miltefosina.
- $C_{i \text{ controle}}$ = número de células infectadas, em 100 células avaliadas, no controle sem droga.

A diferença de susceptibilidade à miltefosina entre os grupos cura e recidiva, dos isolados de *L. (L.) chagasi*, foi determinada pelo teste estatístico bicaudal *t-student* (GraphPad Prism v.5.0b), assumindo significância estatística $\alpha < 0,05$.

4.2. SENSIBILIDADE *in vitro* DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* À MILTEFOSINA

A sensibilidade *in vitro* das formas promastigotas dos isolados/clones de *L. (L.) chagasi* foi determinada pelo método colorimétrico, empregando a resazurina/AlamarBlue® (indicador redox), de acordo com a metodologia proposta por Kulshrestha e colaboradores (2013). Em placa de 96 poços foi realizada diluição seriada (2x) da miltefosina, em volume final de 100 μL em meio LIT suplementado com 10% SFBi, de forma que, após a adição de 100 μL de cultura (1×10^6 células/mL em meio LIT suplementado com 10% de SFBi e 4% de urina estéril) as concentrações finais de miltefosina nos poços foram: 60, 30, 15, 7,5, 3,75 e 1,875 μM . Cultura na ausência da droga (0,0 μM de miltefosina) foram utilizadas como controle e poços contendo apenas meio LIT foram utilizados como branco do sistema. Após 72 horas de incubação a 24°C, foi adicionado a cada poço 50 μL de solução estéril de resazurina (0,0125% (p/v) em PBS). A placa foi incubada por 4 horas a 37°C para conversão da resazurina em resorufin, composto fluorescente e colorimétrico, detectado pela absorvância em 570 e 600 nm e/ou a intensidade de fluorescência (λ_{ex} 540 nm; λ_{em} 590 nm).

A porcentagem de inibição da miltefosina foi determinada pela relação entre a absorvância/intensidade de fluorescência da cultura tratada com a droga e a absorvância/intensidade de fluorescência do controle não-tratado de acordo com a Equação 2 (densidade ótica) ou 3 (fluorescência). A concentração de miltefosina que reduz em 50% a sobrevivência do parasita (IC_{50}) foi determinada por meio de análise de regressão não-linear (curva dose-resposta), utilizando o *software* GraphPad Prism v.5.0b, e expressa como média \pm desvio padrão. Três ensaios independentes foram realizados em triplicata para cada isolado/clone.

$$\%inibição = \left(1 - \left(\frac{(\varepsilon_{OX\lambda_2} \times ABS_{\lambda_1}) - (\varepsilon_{OX\lambda_1} \times ABS_{\lambda_2}) TRATADO}{(\varepsilon_{OX\lambda_2} \times ABS_{\lambda_1}) - (\varepsilon_{OX\lambda_1} \times ABS_{\lambda_2}) CONTROLE} \right) \right) \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

Onde:

- $\varepsilon_{OX\lambda_1}$ = Coeficiente de extinção molar para a forma oxidada da resazurina em 570nm (80,586).
- $\varepsilon_{OX\lambda_2}$ = Coeficiente de extinção molar para a forma oxidada da resazurina em 600nm (117,216)
- ABS_{λ_1} = Densidade ótica obtida em 570nm.
- ABS_{λ_2} = Densidade ótica obtida em 600nm.

$$\%inibição = \left(1 - \left(\frac{IF_{tratado}}{IF_{controle}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Eq.3}$$

Onde:

- $IF_{tratado}$ = Intensidade de Fluorescência obtida na cultura tratada com miltefosina.
- $IF_{controle}$ = Intensidade de Fluorescência obtida na cultura controle.

A diferença de susceptibilidade à miltefosina entre grupos foi determinada pelo teste estatístico bicaudal *t-student* (GraphPad Prism v.5.0b), assumindo significância estatística $\alpha < 0,05$.

5. ANÁLISE PROTEÔMICA

5.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTEICO

Os parasitos na fase logarítmica tardia de crescimento (6^o dia) foram obtidos por centrifugação a 1.000 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com meio RPMI-1640 (pH 7,5), sob as mesmas condições de centrifugação, por três vezes, e acondicionadas na forma de *pellet* úmido a -80°C até extração proteica.

A massa dos parasitos na forma de *pellet* úmido foi ressuspensa em tampão de lise 2D (8 M de ureia, 2 M de tiourea, 40 mM de Tris, 4% (p/v) de CHAPS e 1% (v/v) *cocktail* inibidor de proteases) na proporção de 1:3 (v:v). As células foram lisadas sob agitação branda por 2 horas à temperatura ambiente, seguida por passagem do homogenato em agulha 26 G por 10 vezes. Para obtenção do extrato proteico solúvel o material insolúvel do lisado celular foi removido por centrifugação a 20.000 g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram aliqüotados e armazenados a -80°C até sua utilização (Andrade *et al.*, 2008). O conteúdo proteico do extrato solúvel obtido das amostras foi determinado pelo kit 2-D Quant Kit, conforme as indicações do fabricante.

5.2. 2D-DIGE (*TWO-DIMENSIONAL DIFFERENCE GEL ELECTROPHORESIS*)

Em um estudo prévio, três géis bidimensionais de Coomassie foram preparados a partir de três replicatas biológicas independentes para cada um dos isolados de *L. (L.) chagasi* (MG14A e MG11A) e em seguida foram analisados pelo *software* Image Master 2D Platinum v.7.05 (GE Healthcare Life Sciences). Esse estudo preliminar mostrou que os perfis proteicos das replicatas biológicas de cada isolado foram altamente reprodutíveis em termos do número total de *spots*, posição relativa e intensidade (resultados não mostrados, mas disponíveis em Carnielli (2011)). Diante desses dados, a análise proteômica por 2D-DIGE conduzida no presente estudo, utilizou um *pool* das três replicatas biológicas para compor o proteoma de cada isolado clínico. Esta análise proteômica foi realizada com isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina: (i) um isolado de paciente que apresentou cura terapêutica (MG14A), representado por “C”; (ii) e um isolado de paciente que apresentou falha ao tratamento (MG11A), representado por “R”.

5.2.1. Marcação e Focalização Isoelétrica das Amostras

O valor de pH dos extratos proteicos foram verificados, e se necessário foi ajustado para 8,5 com NaOH 50 mM. Em seguida as amostras foram marcadas com os corantes fluoróforos (CyDye) de acordo com as indicações do fabricante (GE Healthcare). As amostras (50 µg) foram alternativamente marcadas com 400 pmol de Cy3 ou Cy5 e o controle interno (50 µg), o qual corresponde a uma mistura com quantidades iguais das amostras analisadas, foi marcado com 400 pmol de Cy2. Após 30 minutos de incubação, a reação de marcação foi paralisada pela adição de 1 µL de solução de lisina 10 mM por 10 minutos. Essas etapas foram realizadas no escuro e em banho de gelo. Em seguida, as amostras marcadas com Cy3 e Cy5 e o controle interno (Cy2) foram combinados de acordo com o desenho experimental apresentado na tabela 3, e o volume final de cada combinação ajustado para 350 µL com solução de reidratação (Destreak) contendo 0,2% de anfólitos 4 – 7.

Tabela 3 – Desenho experimental do 2D-DIGE.

| Gel | Fluoróforo / amostra | | |
|-----|----------------------|-----|-------|
| | Cy3 | Cy5 | Cy2 |
| 1 | C | R | C e R |
| 2 | R | C | C e R |
| 3 | C | R | C e R |

C: amostra obtida do isolado de *L. (L.) chagasi* de um paciente que apresentou cura terapêutica (MG14A); R: amostra obtida do isolado de *L. (L.) chagasi* de um paciente que apresentou falha ao tratamento (MG11A).

As amostras obtidas das combinações foram transferidas para bandeja de reidratação e as IPG *strip* desidratadas (18 cm, pH 4 – 7) foram colocadas e permaneceram sobre estas durante 30 minutos. Em seguida, foram realizadas as etapas de reidratação passiva (12 horas a 20°C) e focalização isoeletrica (1ª etapa: 300 V por 5 horas; 2ª etapa: aumento gradual da voltagem até 10.000 V em 2 horas; 3ª etapa: acúmulo de 60.000 Vh; 4ª etapa: 500 V por 5 horas) no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) a 20°C com corrente máxima de 50 mA/IPG *strip*.

5.2.2. Redução e Alquilação das Proteínas

Após a primeira dimensão, as proteínas eletrofocalizadas foram submetidas à redução e alquilação. O processo consistiu de incubação sequencial com: (i) tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M de ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 0,002% de azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL de DTT, durante 15 minutos; (ii) e tampão de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodoacetamida, durante 15 minutos.

5.2.3. Segunda Dimensão – SDS-PAGE

A segunda dimensão foi realizada em sistema SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970), utilizando o sistema Ettan DaltSix com placas de vidro de baixa fluorescência (GE Healthcare). As IPG *strips* contendo as proteínas reduzidas e alquiladas foram transferidas para superfície do gel de poliacrilamida (12%) e seladas com solução de agarose 0,5% preparada em tampão Tris/Glicina/SDS (TGS). A migração das proteínas ocorreu a 16 mA/gel por 30 minutos e, em seguida a 40 mA/gel até o término da corrida.

5.2.4. Processamento e Análise das Imagens

Os géis, entre as placas de baixa fluorescência, foram digitalizados utilizando *scanner* Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare) com resolução de 100 μ m. Os valores do fotomultiplicador (PTM) foram ajustados para otimizar a sensibilidade e prevenir a saturação. Para a obtenção das imagens foram utilizados os comprimentos de onda de excitação/emissão de 488/520, 532/580 e 633/670 para o Cy2, Cy3 e Cy5, respectivamente. Posteriormente os géis DIGE foram corados com coomassie coloidal (Brilliant Blue G-250) (Neuhoff *et al.*, 1988) para permitir a detecção visual dos *spots*.

As imagens foram analisadas pelo *software* DeCyder v.7.0 (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. A autenticidade de cada *spot* foi validada por inspeção visual e editada quando necessário. A diferença quantitativa na expressão proteica dos *spots* foi determinada pelo teste estatístico *t-student*, com correção da taxa de *false discovery*, assumindo significância estatística $\alpha < 0,05$.

5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os isolados analisados foram selecionados para análise de identificação por espectrometria de massas.

5.3.1. Digestão das Proteínas, Extração dos Peptídeos e Análise por Espectrometria de Massas

Os *spots* proteicos selecionados conforme descrito no item 5.2.4 foram manualmente removidos do gel, fragmentados e, posteriormente descorados com 400 μ L de solução de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 (três etapas de 15 minutos cada, sob agitação). Após a remoção do descorante, os *spots* foram tratados com 200 μ L de acetonitrila P.A. até o gel se tornar opaco. Esse solvente foi removido da amostra por concentração a vácuo (Concentrador Plus, Eppendorf), e os fragmentos dos géis foram reidratados com 10 μ L de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 20 ng/ μ L de tripsina por 30 minutos em banho de gelo. Em seguida, 20 μ L de solução de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados para manter os pedaços de gel úmido durante a digestão trípica (37°C por 16 horas). Após esse período de incubação, a solução não incorporada ao gel foi recolhida e os pedaços do gel foram submetidos a lavagens sucessivas com 30 μ L de solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (duas etapas de 30 minutos cada, sob agitação) para completa remoção dos fragmentos trípticos. As três soluções foram agrupadas e o volume resultante foi reduzido à aproximadamente 10 μ L por concentrador a vácuo. As amostras resultantes foram dessalinizadas em micro coluna Zip-Tip (resina C₁₈; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA) equilibrada com ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. Os fragmentos trípticos foram eluídos da resina em 6 μ L de solução de acetonitrila 50%, contendo 0,1% de TFA (Vergote *et al.*, 2005). Um fragmento do gel sem *spot* proteico e um fragmento do gel correspondente à albumina bovina (BSA) do padrão de peso molecular foram utilizados, respectivamente, como controle negativo e positivo para as análises. Alíquotas de 0,5 μ L das amostras dessalinizadas foram aplicadas na placa do sistema MALDI-ToF-ToF AB Sciex 5800 (AB Sciex, Foster City, CA) e cocrystalizada com 0,25 μ L de solução saturada da *matrix* (5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70% / TFA 0,1%) a temperatura ambiente.

Os espectros de MS e MS/MS foram obtidos no sistema MALDI-ToF-ToF AB Sciex 5800 (AB Sciex, Foster City, CA), operando no modo positivo/refletor para assegurar uma melhor acurácia e resolução. A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando a mistura de

cinco peptídeos: des-Arg1-Bradicinina ($m/z = 904,468$), angiotensina I ($m/z = 1296,685$), Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z = 1570,677$), ACTH (18–39) ($m/z = 2465,199$) e ACTH (7–38 clip) ($m/z = 3657,929$). Similarmente, a calibração externa do modo MS/MS foi realizada *in tandem*, utilizando os fragmentos ionizados com massas conhecidas gerados a partir do Glu1-fibrinopeptídeo B. Os 15 íons com sinais mais intensos no MS, e com razão sinal/ruído acima de 2, foram selecionados como precursor para aquisição do MS/MS. Durante a análise de MS e MS/MS foi aplicado uma lista de exclusão referente às massas oriundas dos fragmentos trípticos de tripsina e queratina. Para gerar a lista de massas (*peaklist*) detectadas pelo aparelho foi utilizado a ferramenta “peaks to mascot” presente no *software* Explore do sistema ABSciex 5800. Para esta análise foi estabelecido os seguintes critérios: razão sinal/ruído ≥ 2 ; e área mínima do pico de 10.

5.3.2. Pesquisa em Banco de Dados

Os espectros de massas (MS e MS/MS) obtidos de cada *spot* proteico foram investigados contra um banco de dados previamente criado (*in-house* – 103.645 sequências) pelo MASCOT® a partir do genoma de referência da espécie *L. (L.) infantum* JPCM5. Os parâmetros de busca utilizados no MASCOT® foram: (i) ausência de restrições no peso molecular da proteína; peptídeos trípticos com ausência de até dois fragmentos; (ii) modificações variável na metionina (oxidação), cisteína (carbamidometilação), asparagina e glutamina (desamidação) e formação de piroglutamato na glutamina do N-terminal do peptídeo; (iii) e valores de massa monoisotópica. *Score* global do MASCOT® correspondente à significância estatística de $\alpha < 0,05$ foi utilizado para validação da identificação das proteínas. É importante ressaltar que, apesar da análise de *Decoy* ter revelado uma taxa de *false discovery* de 0,8% na identificação dos peptídeos, a análise do mesmo conjunto de dados contra todas as entradas (32.611.672 sequências) do NCBI nr (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não redundante, www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html) revelou um resultado muito similar, sem perda de sensibilidade na identificação de proteínas. Os índices de correlação entre o *pI* e *MM* experimental e teórico foram calculados pelo *software* GraphPad Prism v.5.0b, por meio da análise de correlação de Spearman.

A categorização funcional das proteínas identificadas foi realizada por meio das anotações do processo biológico obtidas do Gene Ontology (GO) para *L. (L.) infantum* e confirmadas pela base de dados do Panther (<http://www.pantherdb.org/panther/globalSearch.jsp?>).

5.4. VALIDAÇÃO DA ANÁLISE PROTEÔMICA

A validação da análise proteômica foi realizada por *western blotting* referente às proteínas EF-1 β (com expressão aumentada no isolado resistente) e α -tubulina (não apresentou diferença no nível de expressão proteica entre os isolados dos grupos cura e recidiva). Para isto, 150 μ g de extratos proteicos de cada isolado foram individualmente fracionados em gel 2D SDS-PAGE (IPG *strip* 7 cm, pH 4 – 7, gel 12%) como descrito por Carnielli (2011). As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Hybond, Amersham, UK) na unidade de transferência semiseco (GE Healthcare) por aplicação de 1,6 mA/cm² durante 2 h. Em seguida as membranas foram lavadas com solução PBS-Tween 0,1% e incubadas com o tampão de bloqueio (PBS-Tween 0,1% acrescido de 5% de leite em pó desnatado) a 4°C *overnight*. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas a 4°C *overnight* com os anticorpos primários anti-EF-1 β e anti- α -tubulina (normalizador) nas diluições de 1:50 e 1:1.000, respectivamente. Após três etapas de lavagem com PBS-Tween 0,5% por 5 minutos cada, as membranas foram incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase na diluição de 1:2.000. As ligações específicas foram reveladas com o sistema Western blotting detection ECL e detectadas por exposição em câmera CCD (Kodak Gel Logig 1500 imaging system, USA). Os sinais gerados pela câmera CCD, a partir dos 2-DE *blotting*, foram processados pelo *software* ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As intensidades de sinal foram mensuradas em áreas delimitadas de mesmo tamanho para cada membrana e expressas como unidades arbitrárias.

6. ANÁLISE GENÔMICA

A análise genômica foi realizada com 32 isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que participaram do ensaio clínico para avaliar a eficácia da miltefosina no tratamento da LV no Brasil e com a cepa de referência para a espécie *L. (L.) chagasi* PP75 (tabela 2).

6.1. OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para obtenção do DNA genômico foram utilizados 5×10^7 células de parasitas na forma promastigota na fase logarítmica tardia de crescimento (6º dia). O DNA genômico foi extraído do *pellet* de células, obtido por centrifugação a 1.000 g por 3 minutos a 4°C, utilizado o kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN) conforme as indicações do fabricante. Para isto, o *pellet* foi ressuspenso em 200 µL de PBS e em seguida foi adicionado 20 µL de solução da proteinase K e 200 µL do tampão AL. Após agitação em *vortex* o homogenato foi incubado à 56°C por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados ao homogenato 200 µL de etanol (96 – 100%) e esse foi agitado em *vortex*. Para a purificação do DNA o homogenato foi transferido para a mini coluna (DNeasy Mini spin column) acoplada ao tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 6.000 g por 1 minuto. Em seguida, foram realizadas 2 etapas de lavagem sequenciais: (i) com 500 µL de tampão de lavagem AW1 (1 minuto a 6.000 g); (ii) e com 500 µL de tampão de lavagem AW2 (3 minutos a 20.000 g). Em seguida a mini coluna foi acoplada a um tubo de 1,5 mL e ao centro desta foi adicionado 100 µL do tampão de eluição AE. Após incubação por 3 minutos à temperatura ambiente, o DNA genômico foi obtido por centrifugação a 6.000 g por 1 minuto. Para aumentar o rendimento do processo de purificação do DNA genômico, a etapa de eluição de DNA foi realizada novamente sob as mesmas condições previamente descritas. Em seguida o conteúdo de DNA genômico extraído foi mensurado em nanodrop a 260 nm e a pureza do mesmo foi avaliada pelas razões 260/280 e 260/230.

6.2. SEQUENCIAMENTO DO DNA GENÔMICO

Os DNA genômico dos isolados de *L. (L.) chagasi* e da cepa de referência (MHOM/BR/74/PP75) foram enviados para o instituto de pesquisa Glasgow Polyomics (University of Glasgow. Wolfson Wohl Cancer Research Centre. Garscube Campus. Bearsden G61 1QH – UK), o qual preparou a biblioteca de DNA para cada isolado,

utilizando o kit Nexter DNA Library (Illumina) e realizou o sequenciamento de toda a biblioteca no sistema Illumina MiSeq. Os dados do sequenciamento foram reportados em arquivo Fastq.

6.3. ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS OBTIDOS POR NGS

A qualidade do sequenciamento do DNA genômico dos isolados de *L. (L.) chagasi* foi verificada, nos arquivos Fastq gerados pelo Illumina Genome Analyzer, pelo *software* FastQC, o qual reportou: tamanho das sequências; conteúdo de GC; qualidade das sequências por base; *score* de qualidade das sequências por base; conteúdo das sequências por base; conteúdo de GC por base; conteúdo de GC por sequência; conteúdo de “N” por base; distribuição do tamanho das sequências; sequências duplicadas; sequências sobre-representadas; e Kmer sobre-representados.

Em seguida foi utilizado o *software* FastqMcf para detectar e remover: as sequências de adaptadores utilizados no sequenciamento; os “N” presentes nas extremidades dos *reads*; os nucleotídeos de baixa qualidade (<10) localizados nas extremidades dos *reads*; os *reads* com qualidade média baixa; e *reads* menores que 20 bp após o processo de *trimming*.

As linha de comando, assim como as informações referentes ao *softwares* e parâmetros utilizados nas análises de bioinformática estão descritas na tabela 4.

6.3.1. Alinhamento e Realinhamento

O genoma de referência utilizado neste estudo foi o da espécie *L. (L.) infantum* (JPCM5) (TritypDB-8.0_LinfantumJPCM5_Genome.fasta, v.5) obtido do site do TriTryDB (http://tritrypdb.org/common/downloads/Current_Release/LinfantumJPCM5/fasta/data/, acesso em 24/06/2014). O index desse genoma foi criado pelo *software* bowtie2, o qual também foi utilizado para realizar o alinhamento dos *reads*, obtidos do sequenciamento dos isolados de *L. (L.) chagasi*, contra o genoma de referência, utilizando os parâmetros para análise muito sensível (Tabela 4).

Após o alinhamento, foram utilizados os *software*: (i) SAMtools para realizar o *sort* e remover as duplicatas dos arquivos; (ii) e PICARD para adicionar a informação “LB=1 PL=Illumina PU=x SM=<filename>” no cabeçalho de cada arquivo, permitindo assim que o *software*

GATK seja capaz de ler arquivos .BAM. Em seguida, o arquivo .fasta do genoma de referência foi indexado e o dicionário das sequências deste foi criado pelos *softwares* samtools' faidx e PICARD, respectivamente, para serem utilizados no realinhamento dos *reads* em torno dos sítios de InDels, utilizando o *software* GATK.

6.3.2. Análise de Variação Estrutural: Variação no Número de Cópias de Genes e de Cromossomos

As anotações do genoma de referência da espécie *L. (L.) infantum* (JPCM5) (TriTrypDB_8.0_LinfantumJPCM5.gff, v.5) foram obtidas do site do TriTrypDB (http://tritrypdb.org/common/downloads/Current_Release/LinfantumJPCM5/gff/data/, acesso em 03/07/2014) em arquivo formato .gff. O *script* gffread do pacote do Cufflinks (v. 2.2.1) foi utilizado para converter este arquivo .gff em .gtf. As informações adicionais de descrição do produto gênico e ID do grupo ortólogo, para todos os genes descritos para *L. (L.) infantum* JPCM5, também foram recuperadas do TriTrypDB v.8.0. em arquivo formato *tab-delimited*. Em seguida esse arquivo foi convertido para a extensão .tsv.

Esses arquivos em conjunto com os arquivos TriTrypDB_8.0_LinfantumJPCM5.fa, TriTrypDB_8.0_LinfantumJPCM5.fa.fai (ambos obtidos por conversão da extensão do arquivo TriTrypDB_8.0_LinfantumJPCM5.fasta) e com os arquivos .BAM dos isolados (gerados no item 6.3.1) foram utilizados para realizar a análise de variação no número de cópias. Essa análise foi realizada por um *script* customizado baseado na metodologia descrita por Downing e colaboradores (2011) e Rogers e colaboradores (2011). A estimativa da ploidia para cada cromossomo foi obtida dos valores mediano de *read depth* de cada cromossomo e do genoma completo de acordo com a equação 4. A estimativa do número de cópias para cada gene utilizou a cobertura normalizada de cada transcrito (*fpkm – fragments per kilobase of exon per million mapped reads*), obtida pelo *software* Cufflinks, e foi calculada de acordo com a equação 5. Por fim, foi considerado que genes no mesmo cromossomo e com o mesmo ID ortólogo correspondem à duplicações e, portanto, as informações desses genes foram reunidas. Dessa forma, as informações correspondentes aos genes membro de um mesmo grupo foram adicionadas em conjunto para obter o número de cópias, de acordo com a equação 5. Esse *script* reporta o número de cópias de genes haploide (número de genes por grupo ortólogo em uma única cópia do cromossomo) e a dose gênica (número total de genes por grupo ortólogo multiplicado pela ploidia do respectivo cromossomo).

$$Ploidia = \frac{Chr\ read\ depth}{(Genome\ read\ depth/ploidia\ base)} \quad Eq.4$$

Onde:

- Ploidia = número de cópias do cromossomo em análise;
- Chr read depth = mediana do read depth do cromossomo em análise;
- Genome read depth = mediana do read depth do genoma;
- Ploidia base é ploidia esperada para a maioria dos cromossomos (2 nos parasitas *Leishmania* spp.).

$$Gene\ CN = \frac{fpkm}{(Chr\ read\ depth/Chr\ ploidia)} \quad Eq.5$$

Onde:

- Gene CN = número de cópias de genes (haploide);
- fpkm = fragments per kilobase of exon per million mapped reads;
- Chr read depth = mediana do read depth do cromossomo em que o gene está localizado;
- Chr ploidia = ploidia do cromossomo em que o gene está localizado.

A diferença da dose gênica, para cada gene por grupo ortólogo, entre os isolados do grupo cura e recidiva foi avaliada pelo teste não paramétrico Mann-Whitney U. Em seguida foi realizada a correção desta análise por permutações randômicas (1.000.000) entre os dados de um mesmo grupo ortólogo, recalculando concomitantemente o teste de Mann-Whitney. O p-valor empírico foi calculado como o número de vezes que o teste de permutação retornou um p-valor \leq do que o teste inicial, dividido pelo número de permutações realizadas (PLINK v.1.07). Os grupos ortólogos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos cura e recidiva, após o teste de permutação, foram plotados em um *heatmap*, escalonado por colunas, utilizando o programa R, o qual também foi empregado para plotar os dados do número de cópias de cromossomos (não escalonado).

6.3.3. Análise de SNPs e InDels

O *software* GATK UnifiedGenotyper foi utilizado para identificar as variações de SNPs e InDels no genoma dos isolados de *L. (L.) chagasi*, tendo como base o genoma de referência da espécie *L. (L.) infantum* (JPCM5). Essa análise utilizou os arquivos gerados na etapa de alinhamento (descrito no item 6.3.1). Como foi observada variação na ploidia entre os isolados, o *software* GATK UnifiedGenotyper foi empregado de forma a melhor utilizar os

dados estimados de ploidia: para cada cromossomo, os isolados foram agrupados de acordo com a ploidia observada e então foi realizada a análise de identificação de SNPs e InDels por grupos. Os parâmetros utilizados pelo GATK VariantFiltration para descartar variantes com baixa qualidade foram: (i) SNP, $QD < 2.0$, $MQ < 40.0$, $FS > 60.0$, $MQRankSum < -12.5$ e $ReadPosRankSum < -8.0$; (ii) e InDel, $QD < 2.0$, $FS > 200$, $ReadPosRankSum < -8.0$. Variantes que não são informativas para o estudo de resistência à miltefosina, ou seja, aquelas presentes em todos ou apenas em um dos isolados analisados em relação ao genoma de referência, foram excluídas das análises posteriores.

O *software* SnpEff foi utilizado para anotar e prever os efeitos das variações genéticas identificadas nos isolados e, em seguida, o *software* SnpSIFT foi empregado para extrair as variantes de NON_SYNONYMOUS_CODING para SNP e de STOP_GAINED e FRAME_SHIFT para InDel.

As variações diferencialmente distribuídas entre os isolados dos grupos cura e recidiva (obtidos antes do tratamento com miltefosina) foram destacadas pelo teste estatístico Chi-quadrado e confirmados pela análise de permutação (1.000.000), ambos realizados pelo *software* PLINK v.1.07, assumindo significância estatística $\alpha \leq 0,05$.

Tabela 4 – Descrição dos softwares, linhas de comando e parâmetros utilizados nas análises de bioinformática.

| Software | Versão | Finalidade | Linha de comando / Parâmetros | Referência |
|------------------------|----------|---|--|--|
| FastQC | 0.11.2 | Controle de qualidade | fastqc <input.fastq> | (Cock <i>et al.</i> , 2010) |
| FastqMcf | 1.04.676 | Trimming | fastq-mcf -o <output.fastq R1> -o <output.fastq R2> adaptors.fa <input.fastq R1> <input.fastq R2> | (Ea-Utils, 2011) |
| Bowtie2 | 2.2.1 | Index | bowtie2-build <input.fasta> <output> | (Langmead e Salzberg, 2012) |
| Bowtie2 | 2.2.1 | Alinhamento reads contra o genoma de referência | --local -D 20 -R 3 -N 1 -L 20 -i S,1,0,5 -K 1 -I 200 -X 800 | (Langmead e Salzberg, 2012) |
| SAMtools | 0.1.19 | Sort e remoção de duplicatas | samtools sort -o <input.bam> samtools rmdup - <output.bam> | (Li <i>et al.</i> , 2009) |
| SAMtools | 0.1.19 | Index | samtools index <input.bam> | (Li <i>et al.</i> , 2009) |
| SAMtools | 0.1.19 | Index | samtools faidx <reference.fasta> | (Li <i>et al.</i> , 2009) |
| GATK UnifiedGenotyper | 3.1-1 | Re-alinhamento | -T RealignerTargetCreator -R <reference.fasta> -I <input-1.bam> -o <output-1.bam>; JAVA -jar \$GATK -T IndelRealigner -R <reference.fasta> -I <input-1.bam> -targetInterval <output-1.bam> -o <output-2.bam> | (Depristo <i>et al.</i> , 2011; Van Der Auwera <i>et al.</i> , 2013) |
| CNV custom script | --- | CNV | cufflinksOpts="-u -N"; UnifiedGenotyperOpts="-stand_call_conf 10 --stand_emit_conf 5"; refTag=< LinfJPMC5.tsv>; ploidy=2; bamfile=<input.bam>; paired=1; runName=<output.bam>; qualities=1; ignoreBamStatus=1; noBamRmdup=1; noBamSort=1; gzipFastqOnSuccess=0; singleCopyThreshold=1.85 | (Downing <i>et al.</i> , 2011; Rogers <i>et al.</i> , 2011; Trapnell <i>et al.</i> , 2012) |
| GATK UnifiedGenotyper | 3.1-1 | Identificação de SNPs | -T UnifiedGenotyper -nt 4 -rf ReassignMappingQuality -DMQ 60 -R <referenceGenome.fasta>-I <bamfile> -glm SNP -ploidy <estimated ploidy> -o <output.vcf> -L <chromosome> -stand_call_conf 10 -stand_emit_conf 5 | (Depristo <i>et al.</i> , 2011; Van Der Auwera <i>et al.</i> , 2013) |
| GATK UnifiedGenotyper | 3.1-1 | Identificação de InDels | -T UnifiedGenotyper -nt 4 -rf ReassignMappingQuality -DMQ 60 -R <referenceGenome.fasta> -I <bamfile>-glm INDEL -ploidy <estimated ploidy> -o <output.vcf>-L <chromosome> -- -stand_call_conf 10 -stand_emit_conf 5 | (Depristo <i>et al.</i> , 2011; Van Der Auwera <i>et al.</i> , 2013) |
| GATK VariantFiltration | 3.1-1 | Filtro SNPs | -T VariantFiltration -R reference.fasta -V <input.vcf> -o <output.vcf> --filterExpression "QD<2.0" --filterName "QDFilter" --filterExpression "MQ<40.0" --filterName "MQFilter" --filterExpression "FS>60.0" --filterName "FSFilter" --filterExpression " | (Depristo <i>et al.</i> , 2011; Van Der Auwera <i>et al.</i> , 2013) |
| GATK VariantFiltration | 3.1-1 | Filtro InDels | -T VariantFiltration -R reference.fasta -V <input.vcf> -o <output.vcf> --filterExpression "QD<2.0" --filterName "QDFilter" --filterExpression "FS>200" --filterName "FSFilter" --filterExpression "ReadPosRankSum<-20.0" --filterName "ReadPosFilter" | (Depristo <i>et al.</i> , 2011; Van Der Auwera <i>et al.</i> , 2013) |
| SNPEFF | 3.6b | Anotação de variantes de SNPs e InDels | eff -c <configFile> -s <output.html> <Reference_Genome> <input.vcf> > <output.vcf> | (Cingolani <i>et al.</i> , 2012) |
| PLINK | 1.07 | Análise estatística | plink --file <inputPrefix> --assoc --perm --allow-no-sex | (Purcell <i>et al.</i> , 2007) |

6.4. VALIDAÇÃO DAS PREDIÇÕES DA ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

A análise de variação estrutural, descrita no item 6.3.2., destacou diferenças significativas entre os grupos cura e recidiva quanto a presença de quatro genes *in tandem*, localizados no cromossomo 31. A presença desses genes nos isolados de *L. (L.) chagasi* foi verificada por PCR individual de cada gene, assim como por PCR para amplificar o fragmento contendo os quatro genes de acordo com a figura 8.

As reações de PCR individuais para cada gene foram conduzidas com a enzima Phusion® DNA polimerase, utilizando o tampão HF (*High Fidelity*) de acordo com as recomendações do fabricante (ID 1, ID 2, ID 3 e ID 4 – tabela 5). A reação de PCR para amplificar o fragmento correspondente aos quatro genes *in tandem* (LinJ.31.2370-LinJ.31.2400) foi conduzida com a enzima Long PCR Enzyme Mix de acordo com as indicações do fabricante (ID 7 – Tabela 5). Os detalhes de cada reação de PCR e os detalhes sobre os iniciadores utilizados estão descritos nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Os produtos de PCR foram separados e visualizados em gel de agarose-TAE (0,6% – 1,0%, indicado nas respectivas figuras) contendo SYBR® Safe.

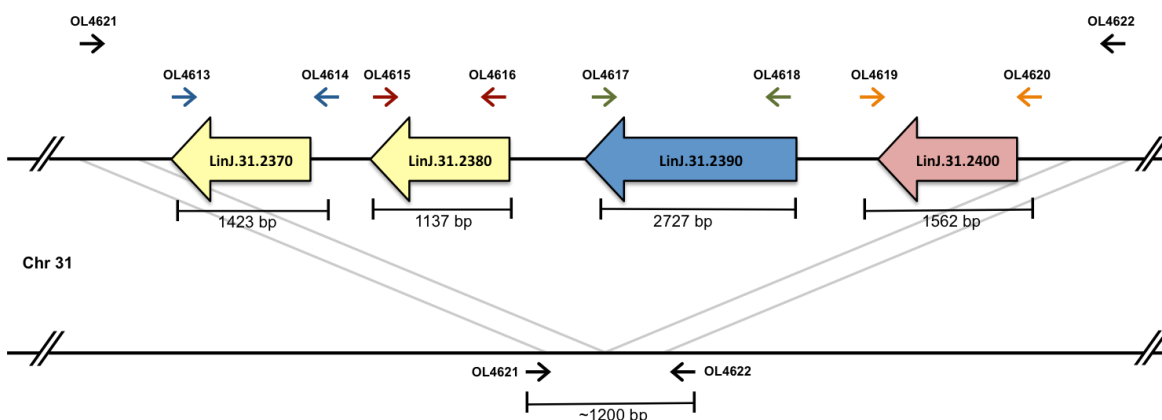


Figura 8 – Estratégia de PCR para validar os dados obtidos na análise de variação estrutural. Cinco reações de PCR independentes foram realizadas para verificar a presença ou ausência dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no cromossomo 31 de todos os isolados de *L. (L.) chagasi* e da cepa de referência PP75. As reações de PCR para cada gene individual (OL4613/OL4614; OL4615/OL4616; OL4617/OL4618; e OL4619/OL4620) foi realizada com enzima Phusion® DNA polimerase, enquanto que a PCR para verificar a presença simultânea desses quatro genes *in tandem* (OL4621/OL4622) foi realizada com a enzima DNA polimerase Long PCR Enzyme Mix e com a enzima Phusion® DNA polimerase. Para todas as reações foram realizados 35 ciclos.

Tabela 5 – Detalhes das reações de PCR utilizadas no presente estudo.

| PCR | | Mistura reacional | Vol. final ^a | Condições de ciclagem | | | Aplicação |
|-----|--|--|-------------------------|-----------------------|------------------|---------|--|
| ID | Produto de PCR (bp) | | | Etapa | T°C ^b | Tempo | |
| 1 | LinJ.31.2370 (1423 bp) | 30 ng de DNA genômico / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4614, 0,5 µM Rv OL4613, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL ou 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Triagem para a presença do referido gene nos isolados clínicos. Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 30 - 35 ciclos | 61°C | 30 sec. | |
| | | | | | 72°C | 2 min. | |
| | | | Extensão final | 72°C | 10 min. | | |
| 2 | LinJ.31.2380 (1137 bp) | 30 ng de DNA genômico / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4616, 0,5 µM Rv OL4615, 400 µM betaina, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Triagem para a presença do referido gene nos isolados clínicos. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 35 ciclos | 60°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 1 min. | |
| | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | | |
| 3 | LinJ.31.2380 (1137 bp) | 30 ng de DNA genômico, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4616, 0,5 µM Rv OL4615, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 30 ciclos | 60°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 1 min. | |
| | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | | |
| 4 | LinJ.31.2390 (2727 bp) | 30 ng de DNA genômico / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4618, 0,5 µM Rv OL4617, 400 µM betaina, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Triagem para a presença do referido gene nos isolados clínicos. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 35 ciclos | 60°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 3 min. | |
| | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | | |
| 5 | LinJ.31.2390 (2727 bp) | 30 ng de DNA genômico, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4618, 0,5 µM Rv OL4617, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 30 ciclos | 60°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 3 min. | |
| | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | | |
| 6 | LinJ.31.2400 (1562 bp) | 30 ng de DNA genômico / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4620, 0,5 µM Rv OL4619, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL ou 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Triagem para a presença do referido gene nos isolados clínicos. Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 30 - 35 ciclos | 63°C | 30 sec. | |
| | | | | | 72°C | 2 min. | |
| | | | Extensão final | 72°C | 10 min. | | |
| 7 | LinJ.31.2370-LinJ.31.2400 (~ 14kb e/ou ~1,2 kb) | 10 ng de DNA genômico, 200 µM dNTPs, 0,4 µM Fw OL4622, 0,4 µM Rv OL4621, DMASO 4%, tampão (Long PCR com 15mM MgCl ₂) 1x e 2,5 U de Long PCR Enzyme Mix | 25 µL | Desnaturação inicial | 94°C | 5 min. | Triagem para a presença (fragmento de ~14 kb) e/ou ausência (fragmento de ~1,2 kb) do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 nos isolados clínicos. |
| | | | | 10 ciclos | 96°C | 30 sec. | |
| | | | | | 63°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 10 min. | |
| | | | 25 ciclos | 96°C | 30 sec. | | |
| | | | | 63°C | 30 sec. | | |
| | | | | 68°C | 11,5 min. | | |
| | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | | |
| 8 | LinJ.31.2370-LinJ.31.2400 (~1200 bp) | 30 ng de DNA genômico, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4622, 0,5 µM Rv OL4621, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL ou 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Amplificação da região gênica onde ocorreu a perda do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 para ser ligado no pGEM T easy e posteriormente sequenciado |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 30 - 35 ciclos | 63°C | 30 sec. | |
| | | | | | 72°C | 1 min. | |
| | | | Extensão final | 72°C | 10 min. | | |
| 9 | LinJ.31.2370-Ty (1089 bp) | 15 ng de DNA (pGEM+LinJ.31.2370) / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4738, 0,5 µM Rv OL4639, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL ou 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | | 98°C | 30 sec. | |
| | | | | 30 ciclos | 68°C | 30 sec. | |
| | | | | | 72°C | 1 min. | |
| | | | Extensão final | 72°C | 10 min. | | |

| PCR | | Mistura reacional | Vol. final ^a | Condições de ciclagem | | | Aplicação |
|-----|--|---|-------------------------|-----------------------|------------------|----------|--|
| ID | Produto de PCR (bp) | | | Etapa | T°C ^b | Tempo | |
| 10 | LinJ.31.2380-HA (1179 bp) | 15 ng de DNA (pGEM+LinJ.31.2380) / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4740, 0,5 µM Rv OL4741, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL ou 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | 30 ciclos | 68°C | 30 sec. | |
| | | | | | 72°C | 1 min. | |
| | | | | Extensão final | 72°C | 10 min. | |
| 11 | LinJ.31.2390-Ty (2771 bp) | 15 ng de DNA (pGEM+LinJ.31.2390) / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4742, 0,5 µM Rv OL4743, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL ou 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | 30 ciclos | 68°C | 30 sec. | |
| | | | | | 72°C | 3 min. | |
| | | | | Extensão final | 72°C | 10 min. | |
| 12 | LinJ.31.2400-HA (1071 bp) | 15 ng de DNA (pGEM+LinJ.31.2400) / colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw OL4744, 0,5 µM Rv OL4745, tampão HF 1x e 0,2 U de Phusion®. | 20 µL ou 50 µL | Desnaturação inicial | 98°C | 3 min. | Amplificação do referido gene para montagem do constructo a ser transfectado. Triagem, por PCR de colônia, do referido gene na etapa de subclonagem em células DH5α. |
| | | | | 30 ciclos | 68°C | 30 sec. | |
| | | | | | 72°C | 1 min. | |
| | | | | Extensão final | 72°C | 10 min. | |
| 13 | pGL631-LinJ.31.2370 (1506 bp) pGL631-LinJ.31.2380 (1220 bp) pGL631-LinJ.31.2390 (2810 bp) pGL631-LinJ.31.2400 (1645 bp) | Colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw (OL4614 ou OL4616 ou OL4618 ou OL4620), 0,5 µM Rv OL4747, tampão ThermoPol® 1x e 1,5 U de Taq DNA polimerase. | 20 µL | Desnaturação inicial | 95°C | 3 min. | PCR de colônia para triagem simultânea da positividade da etapa de transformação em células DH5α e da posição do inserto sem TAG ligado ao vetor final pGL631 (pRib) |
| | | | | 30 ciclos | 60°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 1-3 min. | |
| | | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | |
| 14 | pGL631-LinJ.31.2370-Ty (1172 bp) pGL631-LinJ.31.2380-HA (1262 bp) pGL631-LinJ.31.2390-Ty (2852 bp) pGL631-LinJ.31.2400-HA (1154 bp) | Colônia, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw (OL4738 ou OL4740 ou OL4742 ou OL4744), 0,5 µM Rv OL4747, tampão ThermoPol® 1x e 1,5 U de Taq DNA polimerase. | 20 µL | Desnaturação inicial | 95°C | 3 min. | PCR de colônia para triagem simultânea da positividade da etapa de transformação em células DH5α e da posição do inserto com TAG ligado ao vetor final pGL631 (pRib) |
| | | | | 30 ciclos | 60°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 1-3min. | |
| | | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | |
| 15 | 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2370 (2049 bp) 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2380 (1763 bp) 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2390 (3356 bp) 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2400 (2186 bp) 5' promotor ribossomal-pGL631 (671 bp) | 30 ng DNA genômico, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw (OL2380), 0,5 µM Rv OL4613 ou OL4615 ou OL4617, OL4619 ou OL4747, tampão ThermoPol® 1x e 1,5 U de Taq DNA polimerase. | 20 µL | Desnaturação inicial | 95°C | 3 min. | Verificação da integração do constructo linearizado no locus ribossomal do isolado MG11A. Construções sem TAG |
| | | | | 30 ciclos | 64°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 3 min. | |
| | | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | |
| 16 | 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2370-Ty (1697 bp) 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2380-HA (1787 bp) 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2390-Ty (3377 bp) 5' promotor ribossomal-LinJ.31.2400-HA (1700 bp) | 30 ng DNA genômico, 200 µM dNTPs, 0,5 µM Fw (OL2380), 0,5 µM Rv OL4739 ou OL4741 ou OL4743 ou OL4745, tampão ThermoPol® 1x e 1,5 U de Taq DNA polimerase. | 20 µL | Desnaturação inicial | 95°C | 3 min. | Verificação da integração do constructo linearizado no locus ribossomal do isolado MG11A. Construções com TAG |
| | | | | 30 ciclos | 64°C | 30 sec. | |
| | | | | | 68°C | 3 min. | |
| | | | | Extensão final | 68°C | 10 min. | |

^a Vol. Final, volume reacional final para a reação de PCR.

^b T°C, temperatura em ° C.

min., minuto; sec., segundos

Tabela 6 – Informações dos iniciadores utilizados no presente estudo.

| Iniciadores (Primers) | | | | Utilização |
|-----------------------|--|-------------------|-----------------|--|
| ID ^a | Sequência ^b | Tipo ^c | Tm ^d | |
| OL4613 | ATCTAGATTATAAATCCAGTGCATCG | Rv | 60 °C | Identificação e/ou amplificação do gene LinJ.31.2370 sem TAG. Fw anela na região intergênica. |
| OL4614 | TATAAGCTTCTGTCACTACTCTGTTAATGCG | Fw | 63 °C | |
| OL4615 | ATCTAGACTAGAGGGCGACGTGCTCAT | Rv | 67 °C | Identificação e/ou amplificação do gene LinJ.31.2380 sem TAG |
| OL4616 | TATAAGCTTATGGCTCGAGCTCGTTTCC | Fw | 67 °C | |
| OL4617 | ATCTAGACTGCTACGCGCTCCTGTG | Rv | 65 °C | Identificação e/ou amplificação do gene LinJ.31.2390 sem TAG. |
| OL4618 | TATAAGCTTATGACCCTGCAGTGCGAT | Fw | 66 °C | |
| OL4619 | ATCTAGACAGATTGCAGAATTCACGC | Rv | 62 °C | Identificação e/ou amplificação do gene LinJ.31.2400 sem TAG. Fw anela na região intergênica. |
| OL4620 | TATAAGCTTGCCTGTTATATACGTGAGCG | Fw | 64 °C | |
| OL4621 | AGTTGAGTCTGCTCCGGTG | Rv | 63 °C | Identificação da presença simultânea dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.24000. |
| OL4622 | TTCACGTCACGGCCAAAG | Fw | 63 °C | |
| OL4716 | GCCGTCGTGTTCTGAAGG | Rv | 65 °C | Sequenciamento da parte interna do gene LinJ.31.2370. |
| OL4717 | GCGGATTGAAATCACCGTC | Rv | 65 °C | Sequenciamento da parte interna do gene LinJ.31.2390. |
| OL4718 | CTTCTCCGCCTGCCTGTC | Rv | 66 °C | Sequenciamento da parte interna do gene LinJ.31.2390. |
| OL4719 | GATGGATGCAGCATTTTCG | Rv | 64 °C | Sequenciamento da parte interna do gene LinJ.31.2390. |
| OL4720 | CGTGACTGAAAATCTGCGG | Rv | 64 °C | Sequenciamento da parte interna do gene LinJ.31.2390. |
| OL4721 | GCGACGAGTCTAGTTTCG | Rv | 63 °C | Sequenciamento da parte interna do gene LinJ.31.2400. |
| OL4738 | TACCGGTATGGCCGTGCCCTCATT | Fw | 70 °C | Identificação e/ou amplificação da ORF do gene LinJ.31.2370. TAGGED. |
| OL4739 | ATCTAGACTAGTCAAGTGGATCTGGTTAGTATGGACCTC TAAATCCAGTCCGATCGGCTC | Rv | 68 °C | |
| OL4740 | TACCGGTATGTACCCGTACGACGTCCCGACTACGCT ATGGCTCGAGCTCGTTTCC | Fw | 67 °C | Identificação e/ou amplificação da ORF do gene LinJ.31.2380. TAGGED. |
| OL4741 | ATCTAGACTAGAGGGCGACGTGCTCATAG | Rv | 67 °C | |
| OL4742 | TACCGGTATGACCCCTGCAGTGCATG | Fw | 68 °C | Identificação e/ou amplificação da ORF do gene LinJ.31.2390. TAGGED. |
| OL4743 | ATCTAGACTAGTCAAGTGGATCTGGTTAGTATGGACCTC CGCGCTCCTGTGCGG | Rv | 70 °C | |
| OL4744 | TACCGGTATGTACCCGTACGACGTCCCGACTACGCT ATGCGCCGCGCCATAT | Fw | 69 °C | Identificação e/ou amplificação da ORF do gene LinJ.31.2400. TAGGED. |
| OL4745 | ATCTAGACTACTTACGAGAGCGGCTCTTGAGG | Rv | 69 °C | |
| OL4747 | GCAGAAGCACTGTGAATAGG | Rv | 64 °C | Sequenciamento de insertos no vetor pGL631 (pRib) |
| OL4794 | CGATAAGCTTGATATCGAATT | Fw | 57 °C | Sequenciamento de insertos no vetor pGL631 (pRib) |
| OL2380 | CATCCGTGCGAAAGCCGG | FW | 73°C | Verificação da integração no locus ribossomal. |
| T7 | GTAATACGACTCACTATAGGGC | Fw | 60 °C | Sequenciamento de insertos no vetor pGEM T easy |
| SP6 | ATTTAGGTGACACTATAG | Rv | 49 °C | Sequenciamento de insertos no vetor pGEM T easy |

^a ID, identificação dos iniciadores.

^b As regiões da sequência de nucleotídeo destacadas correspondem a sítios de restrição para nucleases (XbaI: vermelho (TCTAGA); HindIII: Azul (AAGCTT); AgeI: laranja (ACCGGT)) e Tags fusionadas (C-terminal Ty – EVHTNQDPLD; e N-terminal HA Human influenza hemagglutinin – YPYDVPDYA). Códon sublinhado/negrito e em itálico/negrito correspondem aos códons de iniciação e terminação para a transcrição, respectivamente.

^c Fw, forward (senso); Rv, reverse (antissenso).

^d Temperatura de anelamento do iniciador calculada no site NEB (<http://tmcator.neb.com/#/>), considerando a reação de PCR com a enzima Phusion®.

6.5. VERIFICAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DOS ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

Em relação à presença ou ausência dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400, a homogeneidade dos isolados de *L. (L.) chagasi* utilizados neste estudo foi verificada por clonagem. O processo de clonagem foi conduzido em meio sólido SDM79 acrescido de 10% SFBi, 5 µg/mL de hemina e 10 µM de 6-biopterina (Ubeda *et al.*, 2014). Para cada isolado, diferentes quantidades de células (500, 10³ e 10⁴) foram plaqueadas, incubadas a 25°C e diariamente monitorada para o aparecimento de colônias (6 – 12 dias). É importante ressaltar que não foi possível separar clones no meio líquido LIT (suplementado com 10% SFBi e 2% de urina masculina estéril) e, em sua forma sólida apenas foi possível visualizar clones em placas com pelo menos 10⁷ células, dessa forma o meio SDM79 foi selecionado para o processo de clonagem.

Para cada isolado submetido ao processo de clonagem, 16 clones foram expandidos em meio LIT (suplementado com 10% SFBi e 2% de urina masculina estéril) e, o DNA genômico destes foi extraído de acordo com o item 6.1. A presença dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 foi verificada pela reação de PCR ID 7 (Tabela 5).

6.6. REEXPRESSÃO GÊNICA NO LOCUS RIBOSSOMAL DE *L. (L.) chagasi*

A reexpressão individual dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no isolado clínico MG11A, que naturalmente os perdeu, foi alcançada por integração das construções no locus ribossomal do parasita, utilizando o vetor pGL631 (pRib – figura 9) (Mißlitz *et al.*, 2000).

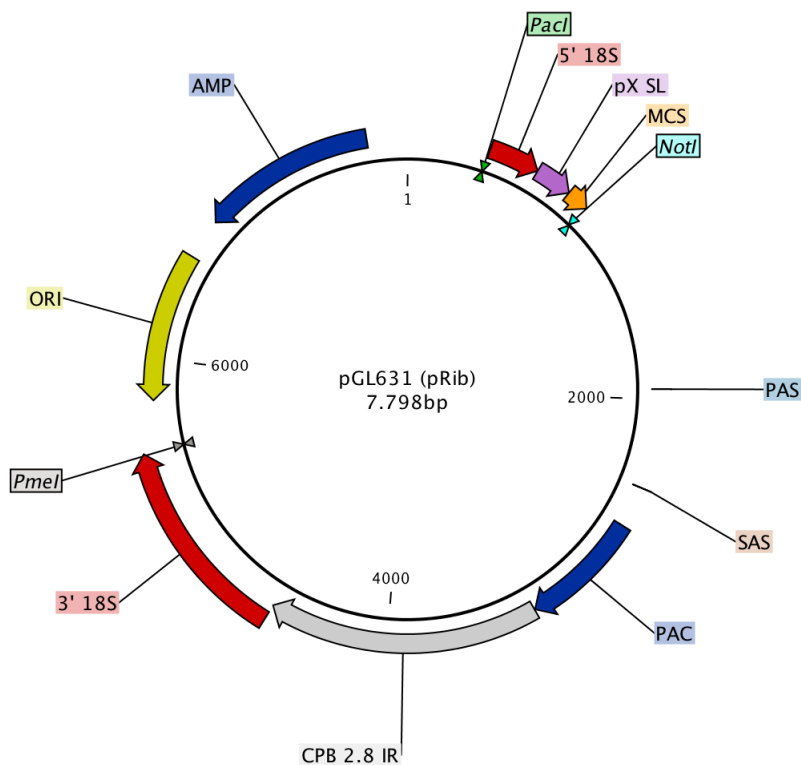


Figura 9 – Vetor pGL631 (pRib). *PaclI* e *PmeI*, enzimas de restrição utilizadas para liberar o fragmento a ser transfectado; 5' 18S e 3' 18S, *18S ribosomal RNA locus* – região de integração por recombinação homóloga no locus ribossomal; pX SL: *Splicing Signal*; MCS: *Multiple cloning site*; *NotI*, enzima de restrição utilizada para preparar o vetor para a ligação com o inserto; PAS, *PolyA Site*; SAS: *Splice Acceptor Site*; PAC, marca de seleção (puromicina) para as células de transfectadas; CPB: região intergênica (IR) do locus da Cisteína Proteinase B de *L. Mexicana*; ORI, Origem de Replicação bacteriana; AMP, marca de seleção (ampicilina) para as células DH5 α transformadas. Imagem gerada no *software* CLC Genomics Workbench v.7.

6.6.1. Obtenção das Construções

Para cada gene a ser reexpresso, duas construções, fusionada (*Tagged*) ou não fusionada (*Untagged*) à *Tags*, foram obtidas de acordo com a estratégia esquematizada na figura 10.

As ampliações dos fragmentos gênicos foram realizadas pelas reações de PCR ID 1, ID 3, ID 5 e ID 6, para a estratégia *Untagged*, e pelas reações de PCR ID 9, ID 10, ID 11 e ID 12, para a estratégia *Tagged* (Tabela 5). Após essa etapa, foi adicionada à mistura reacional 5 U de Taq DNA Polymerase e esta foi incubada a 72°C por 30 minutos. Posteriormente os fragmentos gerados por PCR foram separados em gel de agarose-TAE 0,8% e purificados utilizando o kit QIAquick Gel Extraction, de acordo com as indicações do fabricante.

Em seguida foram conduzidas as reações de ligação dos insertos purificados com o vetor pGEM T easy. Essas reações foram processadas a 4°C por aproximadamente 12 horas,

utilizando a proporção 1 vetor : 3 inserto em volume final de 10µL, de acordo com as recomendações do fabricante. Ao fim dessa etapa, 50 µL de células DH5α foram transformadas, com 5 µl do produto reacional, por choque térmico: incubação sequencial de 30 minutos em gelo, 30 segundo a 42°C e 2 minutos em gelo. Posteriormente foi adicionado às células DH5α 400 µL de meio de cultura Luria Broth (LB). Após 1h de incubação a 37°C, as células DH5α transformadas foram clonadas em meio LB sólido acrescido de 100 µg/mL de ampicilina (incubação a 37°C *overnight*). Para cada construção, 10 clones foram triados por PCR de colônia como descrito na tabela 5.

Clones com reação de PCR positiva, para cada construção, foram expandidos em meio LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina (37°C *overnight*). Em seguida o DNA plasmidial foi purificado, utilizando o kit QIAprep® Spin Miniprep, de acordo com as indicações do fabricante e, sequenciado para verificação de mutações na ORF (eurofins).

A liberação dos insertos das construções no pGEM foi realizada por digestão com a enzima de restrição NotI-HF em tampão CutSmart (10 U NotI-HF/1 µg de plasmídeo, incubação a 37°C *overnight*). Para a construção pGEM-LinJ.31.2390 a digestão foi realizada com as enzimas NotI-HF e Scal-HF, com a finalidade de gerar dois fragmentos menores referentes ao vetor, uma vez que este apresenta tamanho similar ao inserto, impossibilitando a separação em gel de agarose. Os produtos das digestões foram separados em gel de agarose-TAE 0,8% e posteriormente purificados, utilizando o kit QIAquick Gel Extraction de acordo com as especificações do fabricante.

A reação de linearização e a desfosforilação das extremidades 5' do vetor final pGL631 foram realizadas concomitantemente, utilizando as enzimas NotI-HF e fosfatase alcalina (CIP) em tampão CutSmart (10 U NotI-HF + 10 U CIP/1µg µg de plasmídeo, incubação a 37°C *overnight*). Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose-TAE 0,8% e posteriormente purificados, utilizando o kit QIAquick Gel Extraction de acordo com as especificações do fabricante.

A reação de ligação dos insertos com o vetor pGL631 foi processada a 16°C por 20 horas com 400 U da enzima T4 DNA ligase em seu respectivo tampão, utilizando a relação 1:3 (vetor : inserto) em volume final de 10 µL. Ao fim dessa etapa, 50 µL de células DH5α foram transformadas, com 5 µl do produto reacional, por choque térmico e estas foram clonadas, como previamente descrito. Para cada construção, até 10 clones foram triados por PCR de colônia (ID 13 e ID 14 – Tabela 5) para verificar simultaneamente a presença da construção e a posição do inserto no vetor.

Clones com reação de PCR positiva, para cada construção, foram expandidos e o DNA plasmidial foi purificado como previamente descrito. Em seguida o DNA plasmidial foi sequenciado para verificação de mutações na ORF (eurofins).

6.6.2. Transfecção

As construções contendo os genes a serem reexpressos e o vetor pGL631 sem inserto (utilizado como controle nos ensaios de susceptibilidade à miltefosina), foram digeridos com as enzimas de restrição *PacI* e *PmeI* (120 U *PacI* e 120 U *PmeI* para 40 µg de DNA) em tampão *CutSmart* a 37°C *overnight*. Em seguida os produtos das digestões foram separados em gel de agarose-TAE 1,2% e posteriormente purificados utilizando o kit *QIAquick Gel Extraction*, de acordo com as especificações do fabricante.

O DNA purificado foi concentrado por precipitação: para isto foi adicionado às amostras 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,3) e 2,5 volumes de etanol PA a -20°C para 1 volume da amostra de DNA. Após incubação a -20°C por 1 hora as misturas foram centrifugadas a 20.000 g, 4°C por 30 minutos e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% a -20°C (sem ressuspender o mesmo) por centrifugação a 20.000 g, 4°C por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante os tubos foram mantidos abertos por 5 minutos para evaporação do etanol. O DNA precipitado foi ressuspensionado em 15 µL de água ultra pura.

O processo de transfecção foi realizado por eletroporação no sistema *Amaxa* (programa *U-033*), utilizando 5×10^7 células do isolado *MG11A* (início da fase logarítmica de crescimento – 3º dia no meio *LIT* suplementado com 10% *SFBi* e 2% de urina masculina), ressuspensionadas em 100µL da solução “ice cold Human T Cell Nucleofector” (*Lonza*), e 4 – 8 µg do DNA (10 – 15 µL) previamente preparado. Imediatamente após a transfecção as células foram transferidas para 10 mL de meio líquido *SDM79* acrescido com 10% de *SFBi*, 5 µg/mL de hemina e 10 µM de 6-biopterina. Após 12 horas de incubação a 25°C, as células foram plaqueadas em meio sólido *SDM79* acrescido com 10% de *SFBi*, 5 µg/mL de hemina, 10 µM de 6-biopterina e 100 µg/mL de puromicina. Os clones selecionados foram mantidos em meio líquido *LIT* acrescido com 10% de *SFBi*, 2% de urina masculina e 50 µg/mL de puromicina.

6.6.3. Verificação da Integração das Construções e da Reexpressão dos Produtos Gênicos

A integração das construções no locus ribossomal do isolado de *L. (L.) chagasi* (MG11A) foi verificada por reações de PCR (ID 15 e 16 – Tabela 5), utilizando os *primers* Rv de cada inserto e o Fw do locus ribossomal.

A expressão das proteínas referentes aos genes reexpressos foi avaliada por *Western blotting*. Os extratos proteicos totais foram obtidos por ressuspensão das células, previamente lavadas com PBS (2.000 g por 10 minutos a 4°C), em tampão da amostra do sistema SDS-PAGE (2×10^5 células/ μ L). Essa mistura foi incubada a 95°C por 10 minutos e posteriormente centrifugada a 10.000 g por 1 minuto. Em seguida, 20 μ L dos extratos solúveis foram resolvidos em gel Bis-Tris (gradiente 4 – 12%), utilizando tampão de corrida NuPAGE MOPS SDS. A migração das proteínas ocorreu a 50 V por 30 minutos e, em seguida a 100 V até o término da corrida.

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Amersham™ Hybond™) na unidade de transferência semiseco (Bio-Rad) por aplicação de 20 V durante 30 minutos. Em seguida as membranas foram lavadas com solução TBST (cloreto de sódio 137 mM, Tween-20 0,1%, Tris 20 mM, pH 7,6) e incubadas com o tampão de bloqueio (TBST acrescido de 5% de leite desnatado em pó) por 1,5 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários anti-Ty e anti-HA nas diluições de 1:500 e 1:10.000 (preparados em TBST acrescido de 5% de leite desnatado em pó), respectivamente. Após três etapas de lavagem com TBST por 10 minutos, as membranas foram incubadas por 45 minutos a temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-camundongo) conjugados com peroxidase na diluição de 1:50.000. As ligações específicas foram reveladas com o kit ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent e detectadas após exposição em filme Hyperfilm ECL. As imagens dos filmes foram transformadas em formato digital, utilizando *scanner*. A proteína EF-1 α foi utilizada como controle de *loading*, o qual foi realizado sobre as mesmas membranas utilizadas para detectar as proteínas marcadas com Ty e HA (anticorpo primário anti- EF-1 α , 1:50.000; e anticorpo secundário anti-mouse, 1:50.000).

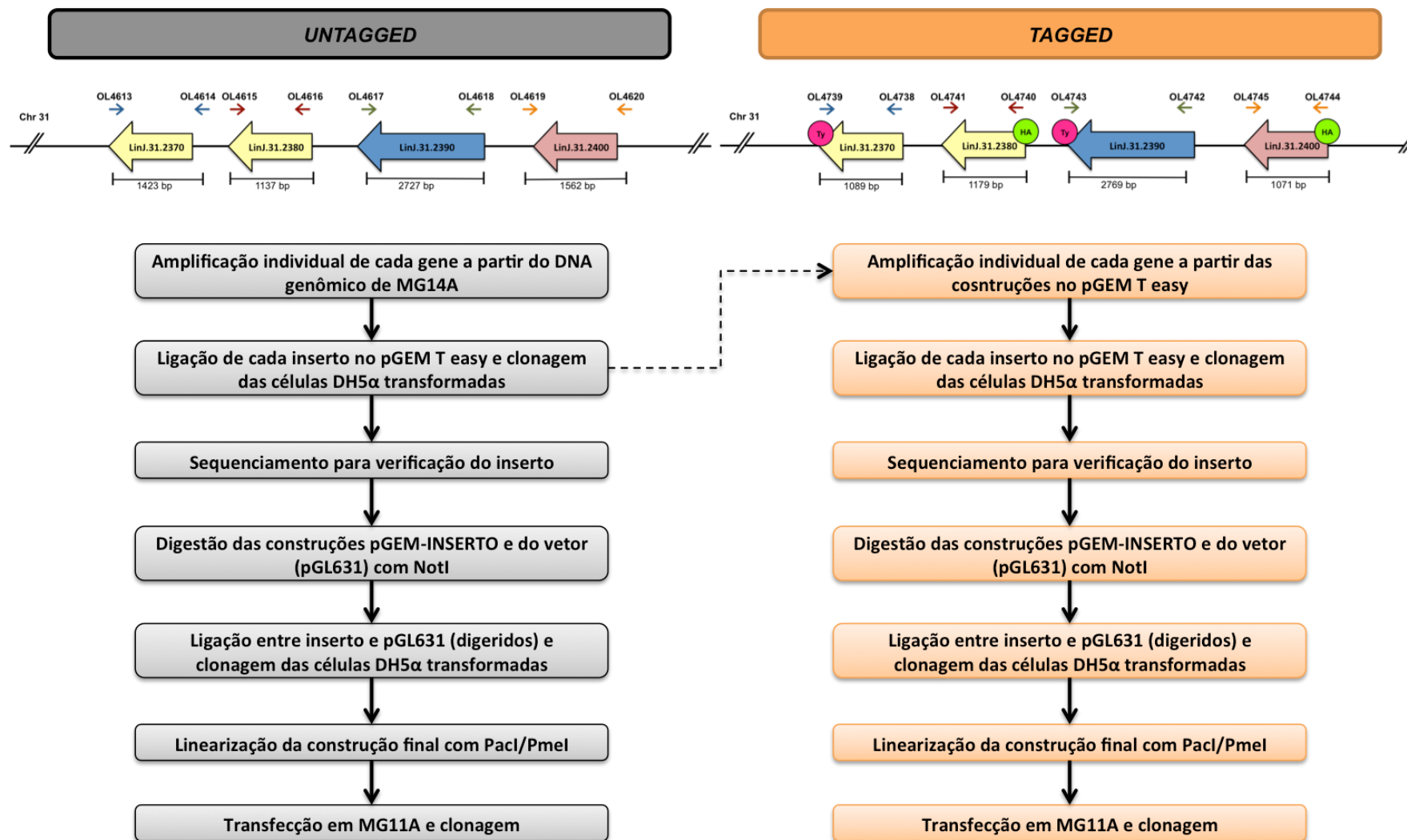


Figura 10 – Estratégia de reexpressão dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no isolado MG11A. Com a finalidade de verificar a síntese do produto gênico reexpresso no isolado transfectado, os mesmos foram fusionados à *Tags* (Ty ou HA) para posterior detecção por *Western blotting*. Sabendo que as *Tags* podem interferir na atividade proteica, simultaneamente foi conduzida a estratégia de reexpressão dos referidos genes sem fusioná-los à *Tags*.

6.7. INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE PERDA DE GENES EM *L. (L.) chagasi*

Para investigar o possível mecanismo de perda dos genes *in tandem* LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 nos isolados de *L. (L.) chagasi* analisados no presente estudo, todos isolados que apresentaram reação de PCR ID 8 (Tabela 5) positiva, tiveram as regiões intergênicas (IR) imediatamente localizadas acima do gene LinJ.31.2370 e abaixo do gene LinJ.31.2400 sequenciadas. Para isso, os produtos de PCR da reação ID 8, após adição do desoxirribonucleotídeo adenosina pela enzima Taq DNA polimerase, foram purificados, utilizando o kit MinElute® PCR purification, de acordo com as indicações do fabricante e, em seguida os fragmentos foram ligados no vetor de clonagem pGEM T easy (1 vetor : 3 inserto). As células DH5α foram transformadas com as construções no pGEM e clonadas, como previamente descrito no item 6.6.1. O DNA plasmidial foi purificado com kit QIAprep® Spin Miniprep, de acordo com as recomendações do fabricante e, enviados para serem sequenciados, utilizando os *primers* do vetor T7 e SP6 (eurofins).

As sequências de nucleotídeos obtidas para cada isolado foram concomitantemente alinhadas contra a região correspondente do genoma de *L. (L.) infantum* JPCM5 (cromossomo 31: 1121889 – 1135849) e com a mesma região do genoma de *L. (L.) chagasi* (sequência consenso obtida a partir de todos os isolados analisados no presente estudo). O alinhamento foi realizado utilizando o *software* CLC Genomics Workbench v.7.

Em seguida foi conduzida uma busca por sequências repetidas no genoma de *L. (L.) infantum* JPCM5 (v5). Essa análise foi realizada por blastn no TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), utilizando como pontos de partida: (i) a sequência formada pela junção das regiões intergênicas posicionadas logo acima do gene LinJ.31.2370 e logo abaixo do gene LinJ.31.2400; (ii) e, as sequências repetidas localizadas no cromossomo 31 (1122312-1122898 e 1135041-1135470) de *L. (L.) infantum* JPCM5 (v3), previamente reportadas por Ubeda (2014) que gentilmente nos foram enviadas pelos autores. Foram consideradas sequências repetidas aquelas com tamanho entre 200 – 2.500 bp e com identidade maior que 85% (Ubeda *et al.*, 2014).

6.8. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA EM ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

Para verificar se a perda do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390, LinJ.31.2400 está associada com a pressão de droga, dois isolados de *L. (L.) chagasi* (MA01A e MG14A), que se mostraram homogêneo para a presença desses genes, foram cultivados com concentrações crescente de miltefosina, com incremento de 1 µM da droga. Para cada etapa de indução de resistência, o DNA genômico dos isolados foi extraído de acordo com o item 6.1 e a presença ou ausência dos referidos genes foi verificada pela reação de PCR ID 7 (Tabela 5). O perfil de susceptibilidade *in vitro* da forma promastigota à miltefosina também foi determinado (de acordo com o item 4.2) em cada etapa da indução de resistência.

O isolado MG11A, que previamente foi caracterizado como resistente à miltefosina e homogêneo para a ausência dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390, LinJ.31.2400, também foi cultivado sob pressão de droga para avaliação do fenótipo de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO *in vitro* DO FENÓTIPO DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA DOS ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

A susceptibilidade *in vitro* à miltefosina das formas amastigotas e promastigotas, dos isolados de *L. (L.) chagasi*, obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina, foi determinada pelo ensaio de infecção de macrófagos peritoneais (realizado por Monti-Rocha (2012)) e pelo ensaio com AlamarBlue®, respectivamente.

Os resultados da análise de susceptibilidade *in vitro* das formas amastigotas e promastigotas, dos 26 isolados obtidos dos pacientes antes do tratamento com miltefosina, mostraram que aqueles provenientes de pacientes que evoluíram para cura terapêutica apresentam maior susceptibilidade à droga (IC₅₀ médio de 5,02 µM e 2,13 µM para as formas amastigota e promastigota, respectivamente) quando comparado com os isolados obtidos de pacientes que apresentaram falha ao tratamento (IC₅₀ médio de 13,13 µM e 3,21 µM para as formas amastigota e promastigota, respectivamente) (Figura 11 (a) e (b)). Os valores de IC₅₀, para os grupos cura e recidiva, apresentam diferença estatística com *p*-valor de 0,0012 e 0,0111 (*t*-student com o *post hoc* Mann-Whitney) para as formas amastigotas e promastigotas, respectivamente. Apesar da análise estatística mostrar diferença no IC₅₀ entre os grupos para a forma promastigota, a diferença em valor numérico absoluto é muito pequena (razão < 2), quando comparada com o da amastigota (razão > 2). Esses dados mostram que o teste de susceptibilidade *in vitro* para a forma amastigota mostra uma correlação mais segura com a resposta clínica.

Dentre os isolados de pacientes que apresentaram falha ao tratamento dois mostraram perfil de susceptibilidade à miltefosina divergente do grupo recidiva (MG17A, CI₅₀ = 3,9 µM; e PI01A, CI₅₀ = 3,7 µM), baseado nos resultados obtidos do ensaio de infecção de macrófagos. Contudo, os valores de IC₅₀ dos pares desses isolados, obtidos após o tratamento e na falha terapêutica (MG17B/MG17C e PI01B/PI01C), mostraram que estes são menos susceptíveis *in vitro* à miltefosina (IC₅₀ >15 µM) (Figura 11 (c)). Dessa forma, a falha ao tratamento, nesses casos, pode estar relacionada com aquisição/seleção de resistência por pressão da droga. Entretanto, o perfil de susceptibilidade observado para a forma promastigota desses isolados não apresentou correlação com a forma amastigota nem com desfecho clínico apresentado pelo paciente (Figura 11 (d)).

Considerando que o conceito de cura utilizado neste trabalho foi baseado na resposta clínica do paciente, dois pares de isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que curaram após o tratamento, mas que apresentaram falha parasitológica inicial (MG14A/MG14B e MG19A/MG19B) foram avaliados. Os perfis de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina das formas amastigotas e promastigotas desses isolados, mostraram que os isolados obtidos após o tratamento são menos susceptíveis à miltefosina, quando comparados com os seus pares que não foram submetidos à pressão da droga (Figura 11 (c) e (d)).

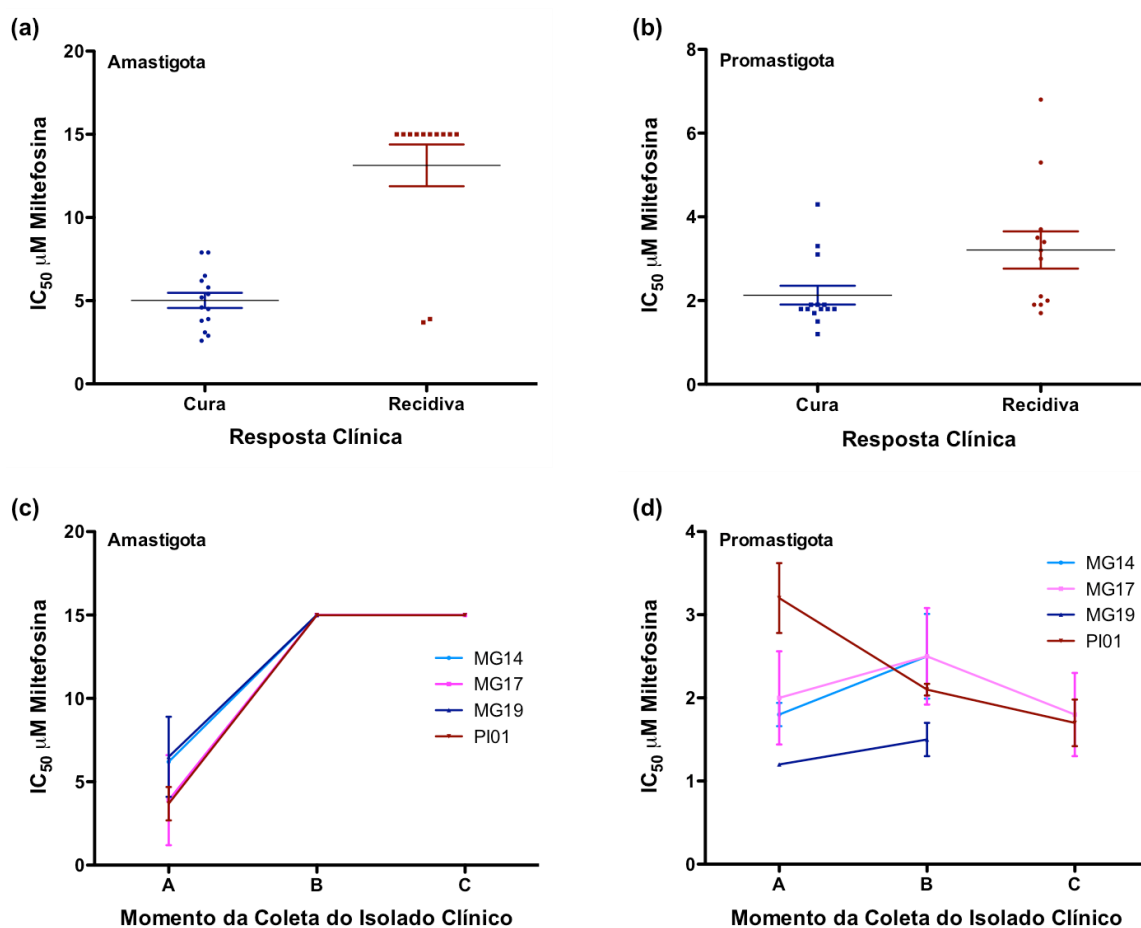


Figura 11 – Susceptibilidade *in vitro* dos isolados de *L. (L.) chagasi* à miltefosina. Comparação entre os valores de IC₅₀ das formas intracelulares amastigotas (a) e das formas promastigotas (b) dos isolados de *L. (L.) chagasi*, obtidos antes do tratamento com miltefosina, de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina (cura: n=14; recidiva n=12). Perfil de susceptibilidade das formas amastigotas (c) e das formas promastigotas (d) dos isolados obtidos de um mesmo paciente antes e após o tratamento (MG14, MG17, MG19 e PI01) e durante a falha terapêutica (MG17 e PI01). A, antes do tratamento; B, depois do tratamento; e C, durante a falha terapêutica. IC₅₀ corresponde à concentração de miltefosina que reduz em 50% o número de macrófagos infectados ou que reduz em 50% a sobrevivência das formas promastigotas do parasita.

2. ANÁLISE PROTEÔMICA

2.1. COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEICO ENTRE ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi* OBTIDOS DE PACIENTES QUE APRESENTARAM DIFERENTES RESPOSTAS AO TRATAMENTO COM MILTEFOSINA

Para investigar as diferenças entre o perfil proteico, dos isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes desfechos clínicos ao tratamento com miltefosina, foi utilizado a técnica 2D-DIGE. A análise proteômica por 2D-DIGE foi conduzida com um *pool* de três replicatas biológicas para cada isolado de *L. (L.) chagasi*: (i) um isolado de paciente que apresentou cura terapêutica (C, MG14A); (ii) e um isolado de paciente que apresentou falha ao tratamento (R, MG11A). As imagens dos três géis, obtidos de acordo como descrito na metodologia, foram analisadas utilizando o *software* Decyder 7.0, o qual mostrou que os perfis proteicos obtidos foram altamente reproduzíveis em termos de número total de *spots* e posição relativa.

A análise das imagens detectou uma média de 810 ± 11.8 *spots* por gel, corados pelos CyDye. Os *spots* detectados apresentaram massa molecular variando entre 14 e 100 kDa, com a maioria dos *spots* proteicos localizados em regiões de massa molecular acima de 14 kDa (Figura 12).

A análise diferencial entre os isolados MG11A (R) e MG14A (C) foi realizada sobre 823 *matched spots*. Para inferir diferença na intensidade relativa de um *spot* entre os diferentes fenótipos foi considerado os seguintes critérios: (i) detecção de forma consistente em todas as replicatas experimentais; (ii) e significância estatística ($\alpha < 0.05$) entre os diferentes fenótipos. Utilizando esses critérios foram detectados 46 *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os isolados obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina. Desses 46 *spots*, 26 (56,5%) apresentaram maior intensidade relativa e 20 *spots* (43,5%) apresentaram menor intensidade relativa no isolado do grupo recidiva MG11A (R) (Figura 12). Esses *spots* foram processados para identificação proteica por espectrometria de massas em MALDI-ToF/ToF.

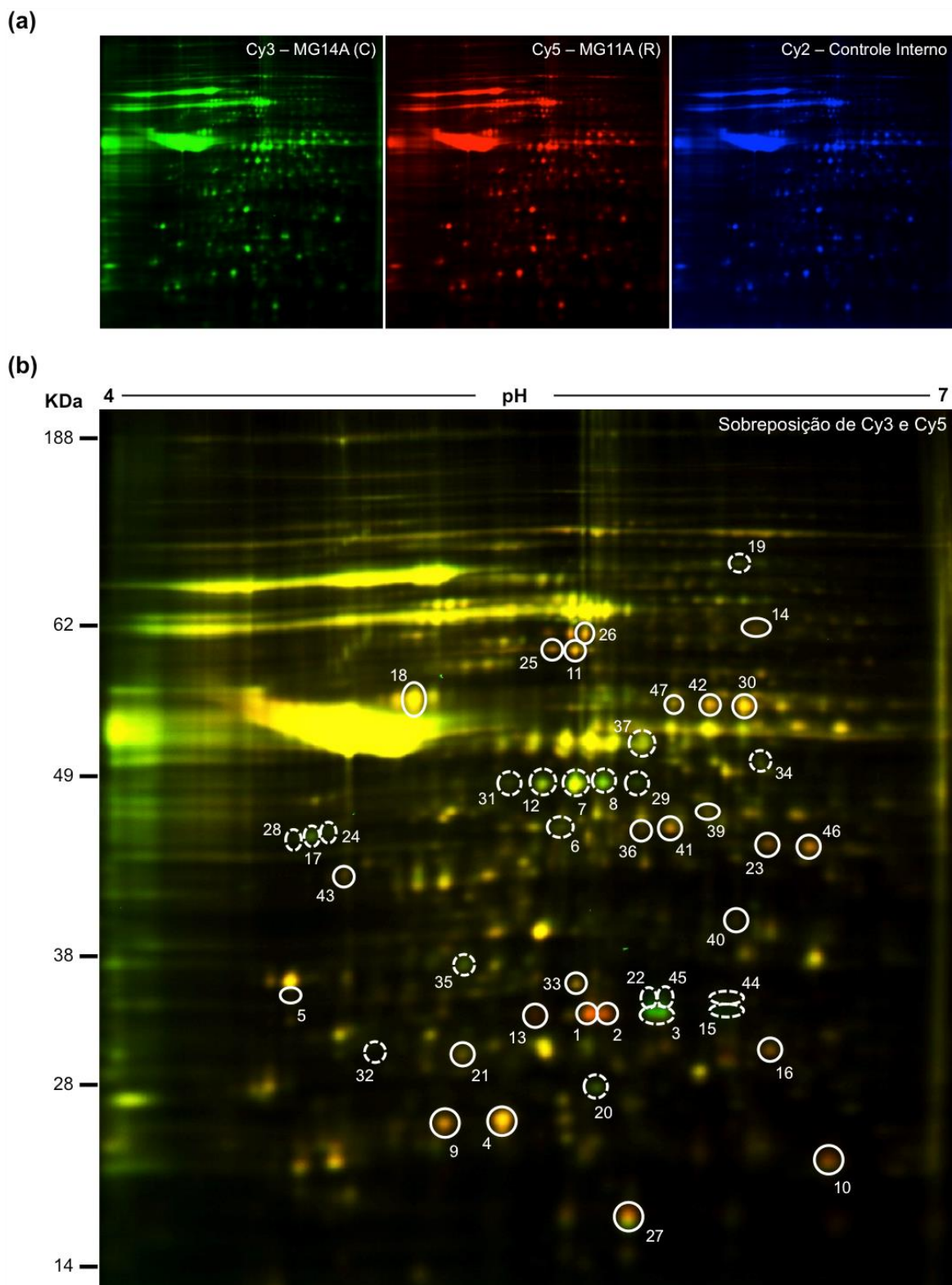


Figura 12 – Análise proteômica comparativa (2D-DIGE) entre os isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina. (a) Gel bidimensional representativo do perfil proteico dos isolados dos grupos cura (C) e recidiva (R) e do controle interno. (b) Imagem derivada da sobreposição das imagens obtidas do Cy3 (C) e do Cy5 (R) de um mesmo gel. Em destaque estão representados os *spots* diferencialmente expressos entre os diferentes fenótipos: as linhas sólidas e pontilhadas indicam os *spots* com expressão aumentada e reduzida, respectivamente, no isolado do grupo recidiva. As informações de identificação das proteínas correspondentes aos números dos *spots* destacados estão listadas nas tabelas 7, 8 e 9. Obs.: O *spot* com ID 38 foi excluído das análises.

2.2. IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS PROTÉICOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Utilizando a análise por MALDI-ToF/ToF foi possível identificar com alto nível de confiança 41 (89,1%) dos 46 spots diferencialmente expressos. Esses 41 spots correspondem a 50 proteínas (34 não redundantes). A tabela 7 mostra as informações da identificação desses 41 spots. Os valores de MM e pI estimados pelo gel bidimensional (experimental) mostraram uma boa correlação com os valores preditos das proteínas identificadas (índice de correlação de Spearman: $r = 0,97$, $p < 0,0001$ para massa molecular; e $r = 0,69$, $p < 0,0001$ para ponto isoelétrico). Entretanto, algumas variações foram observadas, sugerindo a visualização de fragmentos ou de modificações pós-traducionais (Figura 13). Devido a presença de mais de uma proteína em um mesmo spot, nove spots foram excluídos das análises posteriores. Dessa forma, permaneceram 32 spots com identificação de uma única proteína (proteína dominante, ou de maior proporção nos spots proteicos), as quais correspondem a 22 proteínas não redundantes.

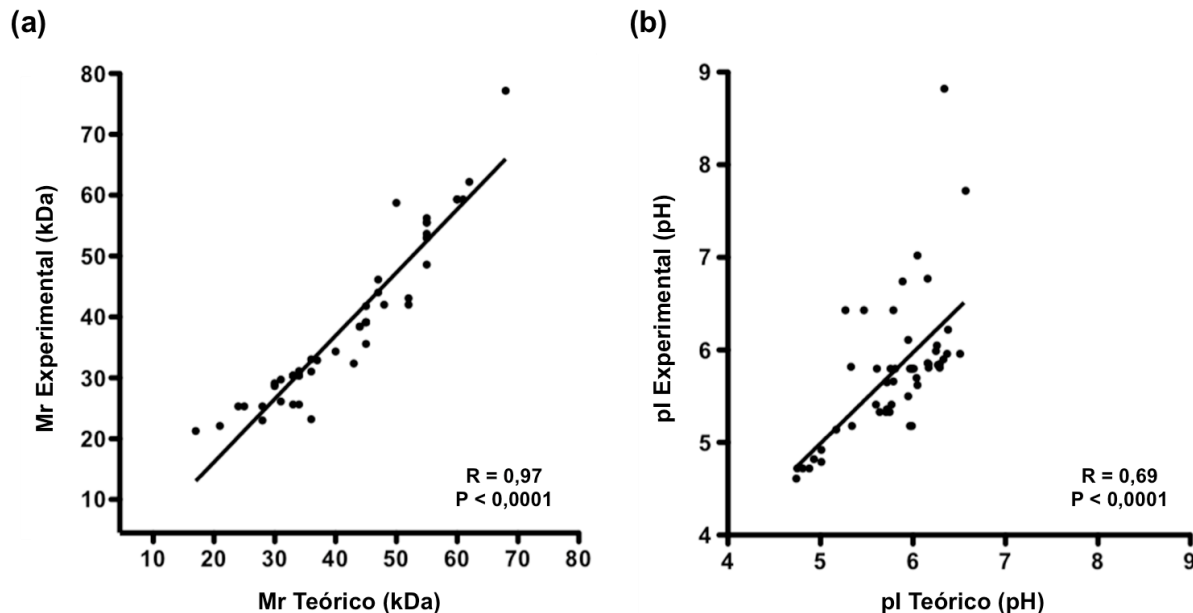


Figura 13 – Análise de correlação entre os valores experimentais e teóricos de massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas identificadas dos isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de massa molecular relativa (Mr). (b) Correlação entre os valores experimentais e teóricos de pI. Essa análise foi realizada com todas as 50 proteínas identificadas.

Tabela 7 – Spots proteicos diferencialmente expressos entre os isolados de *L. (L.) chagasi*, obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina, identificados por espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF).

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|--|-------------------|---|---------------------------|--|
| 1 | Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070342 emb CAM68679.1) | 1176.6530 | 23.1 | 42 | K.GLLGYVPESNK.N |
| | | 2151.0923 | 38.1 | 47 | R.YVFPQMYFSPQLQAATDK.L + Oxidation (M) |
| | | 2479.2197 | 50.8 | 31 | K.GIDIAFLGQNDLCMSMGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C); Deamidated (NQ); 2 Oxidation (M) |
| 2 | Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070342 emb CAM68679.1) | 1176.6276 | 1.45 | 77 | K.GLLGYVPESNK.N |
| | | 1454.6569 | 11.5 | 13 | R.SVYQPQQCMNAK.G + Carbamidomethyl (C); Deamidated (NQ) |
| | | 1469.6536 | 1.67 | 56 | R.SVYQPQQCMNAK.G + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 2135.0254 | 4.69 | 104 | R.YVFPQMYFSPQLQAATDK.L |
| | | 2151.0183 | 3.72 | 83 | R.YVFPQMYFSPQLQAATDK.L + Oxidation (M) |
| | | 2446.1440 | 9.83 | 50 | K.GIDIAFLGQNDLCMSMGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C) |
| | | 2462.1318 | 6.87 | 28 | K.GIDIAFLGQNDLCMSMGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| 2478.1238 | 5.65 | 23 | K.GIDIAFLGQNDLCMSMGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C); 2 Oxidation (M) | | |
| 3 | Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070342 emb CAM68679.1) | 1176.6288 | 2.47 | 66 | K.GLLGYVPESNK.N |
| | | 1469.6602 | 6.16 | 61 | R.SVYQPQQCMNAK.G + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 2151.0234 | 6.09 | 103 | R.YVFPQMYFSPQLQAATDK.L + Oxidation (M) |
| | | 2478.1343 | 9.89 | 29 | K.GIDIAFLGQNDLCMSMGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C); 2 Oxidation (M) |
| | | 932.5409 | 22.4 | 42 | R.DIFATPIR.G |
| 4 | Putative proteasome alpha 7 subunit [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070852 emb CAM69211.1) | 1040.5460 | 4.69 | 39 | R.VFQVEYAGK.A |
| | | 1529.7837 | 17.9 | 47 | R.QAGICIGLLPDGR.A + 2 Carbamidomethyl (C) |
| | | 1208.6333 | -4.07 | 93 | R.HSTINDLPVGR.N |
| | | 1436.7397 | -11.77 | 85 | K.GGLGEMHIPVLADK.S |
| | | 1452.7343 | -11.86 | 79 | K.GGLGEMHIPVLADK.S + Oxidation (M) |
| 5 | Putative mitochondrial peroxiredoxin [Leishmania infantum] (gi 16751316 gb AAL25846.1) | 1534.8057 | -3.54 | 135 | R.DYGVLIIEESGIALR.G |
| | | 1687.8535 | -6.79 | 123 | R.EAAPQFSGQAVVNGAIK.D + Deamidated (NQ) |
| | | 2716.3650 | 5.09 | 205 | K.LNTQVVAVSCDSVYSHLAWVNTPR.K + Carbamidomethyl (C) |
| | | 3321.6179 | 13.4 | 81 | R.VLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTK.A + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1040.5055 | -10.08 | 42 | R.DGLIWGDHK.L |
| 7 | Putative translation elongation factor 1-beta [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134074101 emb CAM72843.1) | 1908.9077 | -0.49 | 103 | R.LNAQPFVSGFSPSEDAR.I |
| | | 1236.7133 | -6.36 | 58 | R.HVFPISVGRPK.N |
| | | 1515.7426 | -4.32 | 87 | K.IWHHTFYNELR.V |
| | | 1561.6979 | -9.59 | 100 | K.SEYDESGPSIVHNK.C |
| | | 1689.7917 | -9.55 | 115 | K.KSEYDESGPSIVHNK.C |
| | | 1946.8844 | -5.59 | 130 | K.YPIEHGIVTNWDDMEK.I |
| | | 1962.8750 | -7.75 | 90 | K.YPIEHGIVTNWDDMEK.I + Oxidation (M) |
| 2047.0131 | -7.12 | 96 | R.VNPEQHNVLLEAPMNPQ.Q + Oxidation (M) | | |
| 2277.0093 | 1.92 | 86 | K.EQLCYVALDFEEMTNSAK.S + Carbamidomethyl (C) | | |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|--|-------------------|--------|---------------------------|--|
| 9 | Putative mitochondrial peroxiredoxin [Leishmania infantum] (gi 16751316 gb AAL25846.1) | 2308.0344 | 0.51 | 86 | K.SANEEAFELPDGNVMMVGNQR.F |
| | | 2326.1121 | -26.94 | 25 | R.ELYGNIVLSSGGSTMFLNLP.L + Oxidation (M) |
| | | 3038.5732 | 4.93 | 246 | R.TTGIVLDAGDGVTHTVPIYEGYSLPHAVR.R |
| | | 1208.6313 | -5.72 | 100 | R.HSTINDLPVGR.N |
| | | 1452.7283 | -16.00 | 51 | K.GGLGEMHIPVLADK.S + Oxidation (M) |
| | | 1534.8013 | -6.40 | 126 | R.DYGVLIIEESGIALR.G |
| | | 1687.8429 | -13.08 | 116 | R.EAAPQFSGQAVVNGAIK.D + Deamidated (NQ) |
| 10 | Cytosolic peroxiredoxin [Leishmania infantum] (gi 16751318 gb AAL25847.1) | 2716.3501 | -0.40 | 189 | K.LNTQVVAVSCDSVYSHLAWVNTPR.K + Carbamidomethyl (C) |
| | | 3321.6072 | 10.2 | 71 | R.VLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTK.A + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1197.5493 | 1.96 | 41 | K.HGEVCPANWK.K + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1245.6216 | -3.22 | 27 | R.QITVNDMPVGR.N + Oxidation (M) |
| 11 | Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134074164 emb CAM72906.1) | 1332.7094 | 8.54 | 24 | R.GLFIDPNGMVR.Q + Deamidated (NQ) |
| | | 1347.7137 | 3.54 | 32 | R.GLFIDPNGMVR.Q + Oxidation (M) |
| | | 1302.6864 | -14.44 | 82 | R.NVIEQAYGAPK.I |
| | | 1346.6399 | -16.94 | 81 | R.GYVSPYFVTDAA.A |
| | | 1376.6549 | -5.67 | 98 | K.DPFENMGAQLVR.Q |
| | | 1392.6426 | -10.79 | 31 | K.DPFENMGAQLVR.Q + Oxidation (M) |
| | | 1434.7028 | -2.96 | 116 | K.ELESLANDSSLTR.D |
| | | 1582.8881 | -1.91 | 170 | R.AAVQEGIVAGGGTALLR.A |
| | | 1625.7928 | -3.93 | 97 | R.YVNMFEAGIIDPTR.V |
| | | 1641.7795 | -8.90 | 76 | R.YVNMFEAGIIDPTR.V + Oxidation (M) |
| | | 1766.8226 | -4.14 | 80 | K.TMATELEVVEGMSVDR.G |
| 12 | Putative mitochondrial peroxiredoxin [Leishmania infantum] (gi 16751316 gb AAL25846.1) | 1797.0449 | -2.47 | 125 | K.IQSIHLLPALNHVVR.S |
| | | 1881.8378 | -4.40 | 137 | K.VLEASEESVGYDAQNDR.Y |
| | | 1925.1399 | -2.29 | 79 | K.KIQSIHLLPALNHVVR.S |
| | | 1964.9824 | -3.79 | 82 | K.AIEFKDPFENMGAQLVR.Q |
| | | 992.4570 | 13.9 | 30 | K.AGFSGDDAPR.H |
| | | 1236.7347 | 11.0 | 24 | R.HVFPSIVGRPK.N |
| | | 1515.7706 | 14.2 | 44 | K.IWHHTFYNELR.V |
| | | 1561.7225 | 6.17 | 93 | K.SEYDESGPSIVHNK.C |
| | | 1689.8186 | 6.38 | 96 | K.KSEYDESGPSIVHNK.C |
| | | 1946.9105 | 7.82 | 93 | K.YPIEHGIVTNWDDMEK.I |
| 13 | Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070342 emb CAM68679.1) | 2047.0345 | 3.33 | 81 | R.VNPEQHNVLLTEAPMNPQ.Q + Oxidation (M) |
| | | 2308.0696 | 15.8 | 88 | K.SANEEAFELPDGNVMMVGNQR.F |
| | | 2326.1277 | -20.23 | 18 | R.ELYGNIVLSSGGSTMFLNLP.L + Oxidation (M) |
| | | 3038.5999 | 13.7 | 89 | R.TTGIVLDAGDGVTHTVPIYEGYSLPHAVR.R |
| | | 1176.6396 | 11.7 | 39 | K.GLLGYVPESNK.N |
| | | 2151.0405 | 14.0 | 100 | R.YVFPQMYFSPQLQAATDK.L + Oxidation (M) |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|--|-------------------|-------|---------------------------|--|
| 14 | Stress-induced protein sti1 [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134067520 emb CAM65800.1) | 966.5067 | 2.45 | 19 | R.VFTPEAFR.K |
| | | 1275.5852 | 11.0 | 12 | R.NPAEHTSYSNR.A |
| | | 1314.6349 | 1.89 | 31 | R.RYDDAIAAYEK.G |
| | | 1581.6974 | 4.90 | 33 | K.CIAECEHGIEHAR.E + 2 Carbamidomethyl (C) |
| | | 1749.8849 | 4.76 | 70 | K.AIQLDEQNSVLYSNR.S |
| 16 | Pyrroline-5-carboxylate reductase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 321399182 emb CBZ08504.1) | 1800.7960 | 4.33 | 55 | K.IPNDGDDEEEERPSAK.A |
| | | 977.5908 | 13.3 | 53 | R.LVSLYQVR.S |
| | | 1377.6752 | 12.5 | 97 | K.ALGPENTFVCNR.S + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1592.7698 | 18.3 | 65 | K.DMVCSPGGTTIEAVR.F + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1608.7596 | 14.9 | 57 | K.DMVCSPGGTTIEAVR.F + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| 17 | Conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134066959 emb CAM65064.1) | 1624.8073 | 4.56 | 53 | R.AQSYEMAAQAVLGAAM + Oxidation (M) |
| | | 2206.1606 | 11.2 | 49 | K.LVISMAAGVPTATIENHCPPK.T + Carbamidomethyl (C) |
| | | 2222.1511 | 9.15 | 48 | K.LVISMAAGVPTATIENHCPPK.T + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 966.5181 | 10.8 | 18 | R.EYLLAAMR.V |
| | | 1139.7004 | 9.55 | 46 | R.QIGVVQLVR.A |
| 18 | Putative ATPase beta subunit [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070254 emb CAM68591.1) | 1434.7483 | 7.49 | 46 | K.KPISEGYALWDR.E |
| | | 1341.7485 | -0.01 | 78 | K.VVSTGGNISVPVGR.E |
| | | 1360.7157 | -4.59 | 106 | R.IFNLGDAIDQR.G |
| | | 1376.6659 | -3.42 | 128 | K.GHGGFSVFAGVGER.T |
| | | 1486.7341 | -1.18 | 110 | R.VAQSALTMAYFR.D |
| | | 1502.7201 | -7.11 | 48 | R.VAQSALTMAYFR.D + Oxidation (M) |
| | | 1690.7949 | -5.37 | 78 | K.CVLVYQGMNEPPGAR.A + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1891.9954 | 2.20 | 157 | R.DVEGQNVLLFIDNIFR.F |
| | | 2003.9889 | 1.71 | 172 | R.AVAESGIYPAVNPLECASR.I + Carbamidomethyl (C) |
| | | 2021.0331 | 1.63 | 158 | R.DEPLTLEIVQHLANTGR.C |
| 19 | Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070535 emb CAM68878.1) | 2272.1733 | 4.02 | 183 | R.IPAAVGYQPTLAEDLGMLQER.I |
| | | 2288.1655 | 2.80 | 73 | R.IPAAVGYQPTLAEDLGMLQER.I + Oxidation (M) |
| | | 2697.4333 | 5.21 | 230 | K.ELQDIIAVLGIDELSEEDKVVVDR.A |
| | | 3744.9021 | 11.2 | 188 | K.GSITSVQAVYVPADDITDPAPATTFSHLDATTVLDR.A |
| | | 1255.7345 | 27.1 | 74 | K.GVPESVLSALQR.T |
| 20 | Putative mitochondrial peroxiredoxin [Leishmania infantum] (gi 16751316 gb AAL25846.1) | 1385.7880 | 30.1 | 37 | K.VFALDLFEYIR.S |
| | | 1838.9326 | 22.1 | 114 | R.DNLNTTQLFYDLEPR.V |
| | | 1898.9595 | 24.5 | 98 | R.VVELETFSIDNFESNR.Q |
| 20 | Putative mitochondrial peroxiredoxin [Leishmania infantum] (gi 16751316 gb AAL25846.1) | 1208.6467 | 7.03 | 58 | R.HSTINDLPVGR.N |
| | | 1534.8197 | 5.59 | 122 | R.DYGVLIIEESGIALR.G |
| | | 1687.8610 | -2.35 | 66 | R.EAAPQFSGQAVVNGAIK.D + Deamidated (NQ) |
| | | 2716.3655 | 5.27 | 157 | K.LNTQVVAVSCDSVYSHLAWVNTPR.K + Carbamidomethyl (C) |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|---|-------------------|--------|---------------------------|--|
| | Putative adenylate kinase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134067016 emb CAM65121.1) | 1178.6533 | -3.01 | 76 | K.VFFILGGPGSGK.G |
| | | 1626.9178 | 7.20 | 122 | R.SGNIVPSEITVELLR.Q |
| | | 1953.9818 | 5.79 | 139 | R.LVEDFGYTHFSAGELLR.E |
| | | 2039.0088 | 5.23 | 122 | R.QAIADHPNSVGYVIDGFPR.K + Gln->pyro-Glu (N-term Q) |
| | | 2056.0334 | 4.25 | 135 | R.QAIADHPNSVGYVIDGFPR.K |
| 21 | Conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134073755 emb CAM72492.1) | 945.5725 | 44.4 | 39 | K.LPVFWQR.T |
| | | 1000.5123 | 38.9 | 34 | K.LYASDFER.A |
| | | 1605.8418 | 41.3 | 85 | K.TTWEDNIETEVL.R |
| | | 1845.9348 | 39.8 | 146 | K.ETQASGEADYTNIPPPR.L |
| | | 2075.0911 | 42.0 | 46 | R.TKETQASGEADYTNIPPPR.L |
| 22 | Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070342 emb CAM68679.1) | 2210.2014 | 41.9 | 121 | R.SIVEGFAVDVQGTYNVAVGR.T |
| | | 1469.6329 | -12.43 | 34 | R.SVYQPQCMNAK.G + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 1730.9562 | -1.52 | 109 | K.KHDVILGLFLFGTDR.V |
| | | 2150.9922 | -8.42 | 89 | R.YVFPQMYFSPQLQAATDK.L + Oxidation (M) |
| | | 2446.1196 | -0.15 | 107 | K.GIDIAFLGQNDLCMSGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C) |
| 23 | Putative proteasome alpha 7 subunit [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070852 emb CAM69211.1) | 2478.1033 | -2.62 | 27 | K.GIDIAFLGQNDLCMSGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C); 2 Oxidation (M) |
| | | 932.5302 | 10.9 | 41 | R.DIFATPIR.G |
| | | 1529.7616 | 3.47 | 66 | R.QAGICICLLPDGR.A + 2 Carbamidomethyl (C) |
| | | 1023.5317 | -22.12 | 51 | R.FVIDMASLK.R |
| | | 1037.5353 | -5.94 | 21 | K.LEPFTFQR.R |
| 23 | Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134069817 emb CAM68143.1) | 1252.6631 | -4.27 | 59 | K.SKLEPFTFQR.R |
| | | 1338.6567 | -17.46 | 82 | M.PTEAHGWAALSAK.S |
| | | 1479.7560 | -4.34 | 91 | K.LANAMGAEVTVFTR.S |
| | | 1496.7063 | 0.92 | 66 | K.ISIECINEAYER.M + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1534.7570 | -5.15 | 125 | K.TPTFGGYSDHVVR.E |
| | | 1662.8530 | -4.13 | 43 | K.KTPTFGGYSDHVVR.E |
| | | 1849.9624 | -6.35 | 32 | K.LALVGMPEHAHPPLDPR.R |
| | | 1865.9542 | -7.96 | 31 | K.LALVGMPEHAHPPLDPR.R + Oxidation (M) |
| | | 2411.0396 | -2.49 | 138 | R.GLEQYCVNGASFTYNSTQQDK.K + Carbamidomethyl (C); Deamidated (NQ) |
| | | 2796.2922 | 3.34 | 151 | R.DVGPDDVVIAYCGVCHSDVHQAR.D + 2 Carbamidomethyl (C) |
| 24 | Conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134066959 emb CAM65064.1) | 1122.6683 | 4.73 | 29 | R.QIGVVQLVLR.A + Gln->pyro-Glu (N-term Q) |
| | | 1139.6968 | 6.39 | 43 | R.QIGVVQLVLR.A |
| | | 1434.7485 | 7.63 | 53 | K.KPISEGYALWDR.E |
| 25 | Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134074164 emb CAM72906.1) | 1302.6964 | -6.76 | 73 | R.NVIEQAYGAPK.I |
| | | 1346.6553 | -5.50 | 64 | R.GYVSPYFVTDK.A |
| | | 1376.6675 | 3.49 | 111 | K.DPFENMGAQLVLR.Q |
| | | 1392.6539 | -2.67 | 41 | K.DPFENMGAQLVLR.Q + Oxidation (M) |
| | | 1582.8977 | 4.16 | 131 | R.AAVQEGIVAGGGTALLR.A |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|---|-------------------|-------|---------------------------|---|
| | | 1625.8044 | 3.21 | 129 | R.YVNMFEAGIIDPTR.V |
| | | 1641.7898 | -2.63 | 69 | R.YVNMFEAGIIDPTR.V + Oxidation (M) |
| | | 1766.8424 | 7.07 | 59 | K.TMATELEVVEGMSVDR.G |
| | | 1797.0540 | 2.59 | 93 | K.IQSIHSLLPALNHVVR.S |
| | | 1881.8544 | 4.43 | 134 | K.VLEASEESVGYDAQNDR.Y |
| | | 1925.1475 | 1.66 | 62 | K.KIQSIHSLLPALNHVVR.S |
| | | 2481.2329 | -1.06 | 192 | K.TNDLAGDGTTTSAVLVDSIFGEGLK.C |
| 26 | Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134074164 emb CAM72906.1) | 1302.7155 | 7.91 | 78 | R.NVIIQAYGAPK.I |
| | | 1582.9149 | 15.0 | 141 | R.AAVQEGIVAGGTALLR.A |
| | | 1625.8243 | 15.5 | 84 | R.YVNMFEAGIIDPTR.V |
| | | 1641.8092 | 9.20 | 44 | R.YVNMFEAGIIDPTR.V + Oxidation (M) |
| | | 1819.8419 | -3.94 | 105 | K.DDTVMLNGGGDAAAVKER.V + Deamidated (NQ) |
| | | 1881.8752 | 15.5 | 130 | K.VLEASEESVGYDAQNDR.Y |
| 27 | Putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134068463 emb CAM66753.1) | 1110.5142 | 13.1 | 66 | K.ECVQSGQFR.L + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1615.8647 | 10.4 | 97 | K.VKPNEESWTWVLK.E |
| | | 1743.8446 | 10.8 | 129 | R.YYDEAGEVLVNMNVK.N |
| | | 1759.8358 | 8.58 | 64 | R.YYDEAGEVLVNMNVK.N + Oxidation (M) |
| | | 1783.9537 | 13.5 | 66 | K.RVPTLVQQNEANASK.A |
| | | 1841.9501 | 5.93 | 127 | K.EHPSTLAQQSLFDIK.I |
| | | 1860.7393 | 10.1 | 41 | K.FCAMMDLMEEMQHR.N + Carbamidomethyl (C); 2 Oxidation (M) |
| | | 1892.7190 | 4.55 | 48 | K.FCAMMDLMEEMQHR.N + Carbamidomethyl (C); 4 Oxidation (M) |
| | | 2291.1499 | 11.7 | 95 | K.KYDLFGYEVDTNTALWIDK.V |
| 28 | Conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134066959 emb CAM65064.1) | 966.5310 | 24.2 | 20 | R.EYLLAAMR.V |
| | | 1122.6919 | 25.8 | 40 | R.QIGVVQQLVR.A + Gln->pyro-Glu (N-term Q) |
| | | 1139.7186 | 25.5 | 52 | R.QIGVVQQLVR.A |
| | | 1434.7820 | 31.0 | 83 | K.KPISEGYALWDR.E |
| | | 1474.8602 | 20.7 | 37 | K.ATLNTELLMLLSR.S |
| | | 1490.8549 | 20.3 | 25 | K.ATLNTELLMLLSR.S + Oxidation (M) |
| 30 | Trypanothione reductase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134067080 emb CAM65344.1) | 1162.5505 | 7.75 | 52 | R.TPAYFYESGK.R |
| | | 1270.5382 | 17.7 | 46 | R.ESGGFGWEMDR.E |
| | | 1286.5231 | 9.70 | 28 | R.ESGGFGWEMDR.E + Oxidation (M) |
| | | 1510.7986 | 15.2 | 22 | K.LMVTGAQYMDLIR.E |
| | | 1526.7804 | 6.46 | 18 | K.LMVTGAQYMDLIR.E + Oxidation (M) |
| | | 1637.8372 | 14.8 | 110 | K.TSVDNIIAIGDVTNR.V |
| | | 2474.1785 | 14.0 | 28 | K.ISDFHSTIGVHPTSAEELCSMR.T + Carbamidomethyl (C) |
| | Putative vacuolar ATP synthase subunit b [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134085080 emb CAM69481.1) | 1122.6434 | 15.0 | 35 | R.NIEGIPINPR.A |
| | | 1394.8190 | 13.5 | 68 | R.AVNGPLVILEDVR.K |
| | | 1593.9164 | 10.4 | 19 | R.QLYPPINILPSSLR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|--|-------------------|--------|---------------------------|--|
| | | 1610.9521 | 16.0 | 43 | R.QLYPPINILPPLSR.L |
| | | 1675.9226 | 12.7 | 47 | K.AVVQVFEGTSGIDVVR.S |
| | | 1715.9576 | 14.6 | 49 | K.TVLFNLNDPTIER.I |
| | | 1062.5651 | 26.8 | 34 | R.LYWQEPAR.V |
| 32 | Conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134073928 emb CAM72667.1) | 1980.0259 | 26.1 | 124 | K.LMDQSLPVYDDVVTGVGR.L + Oxidation (M) |
| | | 2405.2446 | 33.8 | 68 | K.SYPVQPHNLNELQQPPDSWR.K |
| | 14-3-3 protein-like protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134074098 emb CAM72840.1) | 1373.6315 | 25.3 | 45 | R.YYAEIDSGDGQR.Q |
| | | 1649.9073 | 28.4 | 66 | K.ATDVANSSLAPTHPIR.L |
| | | 1354.6224 | 1.15 | 84 | K.CVTWSNGNIFR.S + Carbamidomethyl (C); Deamidated (NQ) |
| | | 1363.7219 | 0.23 | 69 | R.SQTLDYIASPLR.F |
| | | 1517.7609 | 0.96 | 123 | K.QLSADGYNVILEGR.S + Gln->pyro-Glu (N-term Q) |
| 33 | Conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070343 emb CAM68680.1) | 1525.8335 | 0.13 | 131 | K.VPTVAQQTQGEVIR.F |
| | | 1534.7864 | 0.28 | 88 | K.QLSADGYNVILEGR.S |
| | | 1613.8892 | -0.33 | 104 | R.FELVIPDVEVLGQR.R |
| | | 1921.9382 | -5.51 | 107 | K.EITEESLTDELLSSVEK.R |
| | Putative 2-hydroxy-3-oxopropionate reductase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134071195 emb CAM69880.1) | 1132.5927 | 2.55 | 67 | K.AGFPVSVWNR.T |
| | | 1719.8141 | 1.28 | 42 | K.SGSAQCWTLDVKPADL.L + Carbamidomethyl (C) |
| | | 2245.1860 | 1.66 | 80 | R.EGAIFVDNSTIKPSVAQEIAR.R |
| | | 1212.5847 | 13.4 | 23 | K.WFVDFEFD.R |
| 34 | Putative RNA helicase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134069547 emb CAM67870.1) | 1397.6843 | -7.43 | 41 | R.ELAYQIEQEFK.R |
| | | 1947.9235 | 2.05 | 41 | R.ENGFHPSEVQHQLPK.A + Deamidated (NQ) |
| | | 2050.1096 | 3.96 | 107 | K.VPQGQKPYCQAVVLVHAR.E + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1211.6976 | -10.80 | 98 | R.VLIIGGGDGGVVR.E |
| | | 1311.6732 | -8.58 | 100 | M.PGPGLLPDGFWR.E |
| 35 | Spermidine synthase (SPDSYN) [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134066976 emb CAM65081.1) | 1577.6947 | -20.12 | 63 | R.EESTMWPGQAQGLK.V + Oxidation (M) |
| | | 1856.8981 | -10.58 | 121 | K.GPASELFGADFYTNVLR.I |
| | | 2018.0194 | -12.23 | 111 | K.RAPDSVYDVIIIDTDPK.G |
| | | 2476.2146 | -9.79 | 96 | K.SADTDVTPMRPVESLGFADQLK.Y |
| | | 2492.2083 | -10.21 | 39 | K.SADTDVTPMRPVESLGFADQLK.Y + Oxidation (M) |
| | | 905.5067 | 25.2 | 30 | K.SWASLVSR.A |
| | | 1003.5474 | 15.4 | 37 | K.WAVSLQGSR.L |
| | | 1050.5590 | 11.8 | 41 | K.VNVFDELSK.A |
| 36 | Conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134071523 emb CAM70212.1) | 1177.6160 | 17.0 | 85 | K.NAANIADLYGR.H |
| | | 1196.5509 | 8.72 | 53 | K.GHVFMDFAEK.V + Oxidation (M) |
| | | 1438.7965 | 9.06 | 24 | R.AALGPMSAHLVSLR.N + Oxidation (M) |
| | | 1698.8179 | 10.3 | 48 | R.LMFNTTGSVTDDEIR.A |
| | | 1714.8075 | 7.14 | 87 | R.LMFNTTGSVTDDEIR.A + Oxidation (M) |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|---|-------------------|-------|---------------------------|---|
| 37 | S-adenosylmethionine synthetase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 321398550 emb CBZ08891.1) | 992.5257 | 31.1 | 24 | K.YWLNPSGR.F |
| | | 1094.5674 | 30.8 | 15 | R.GGPHGDAGLTGR.K |
| | | 1344.6895 | 26.2 | 17 | R.DGSLEWARPDAK.T |
| | | 1489.7175 | 24.8 | 41 | K.TQVTVEYDYDTR.E |
| 39 | Putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134074072 emb CAM72814.1) | 1155.5586 | 13.6 | 76 | K.LSFDDNAAFR.Q |
| | | 1196.7515 | 12.9 | 42 | K.ALNTTIPIVVR.L |
| | | 1775.9916 | 0.81 | 116 | K.GQLVNTLYVTEAVAGIK.R |
| | | 1826.9188 | 8.57 | 136 | R.NSGLVIHPVEDFDSAAR.K |
| 40 | Cysteine conjugate beta-lyase,aminotransferase-like protein [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134072590 emb CAM71304.1) | 1285.6241 | 14.2 | 46 | K.ASENGFYDILR.D + Deamidated (NQ) |
| | | 1557.8359 | 12.0 | 50 | K.AVNLGQGFPSPFAPPR.L |
| | | 2157.0730 | 8.55 | 31 | K.VLQYSEQAPLAHQYCPRR.G + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1199.5369 | 2.74 | 39 | R.FWMCVATER.S + Carbamidomethyl (C) |
| 41 | Activated protein kinase c receptor (LACK) - LiP36 [Leishmania infantum] (gi 321398491 emb CAM69514.2) | 1215.5219 | -5.46 | 21 | R.FWMCVATER.S + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 1304.6493 | 0.91 | 118 | K.DVLAVAFSPDDR.L |
| | | 1469.6713 | -3.74 | 96 | R.HSVDSYGLPSHR.L |
| | | 1747.8027 | -0.92 | 45 | R.VWNVAGECMHEFLR.D + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1763.7894 | -5.57 | 18 | R.VWNVAGECMHEFLR.D + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 1798.9406 | -2.22 | 109 | K.INVESPINQIAFSPNR.F |
| | | 1865.9156 | -3.13 | 59 | R.GWVTSLACPQQAGSYIK.V + Carbamidomethyl (C) |
| | | 2964.3716 | -7.73 | 142 | R.LEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWDR.S + Carbamidomethyl (C) |
| | | 945.5220 | 33.8 | 44 | R.SIVGWNNR.I |
| | | 1000.5258 | 22.5 | 34 | R.IGSWCHIK.D + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1089.6722 | 28.2 | 91 | R.AVILVGGFGTR.L |
| | | 1139.6735 | 36.4 | 51 | K.FIPSLVHGNER.E |
| 42 | GDP-mannose pyrophosphorylase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134069789 emb CAM68115.1) | 1152.6613 | 17.5 | 54 | R.INAGIYIFNK.S |
| | | 1418.8182 | 20.6 | 99 | R.FTVIGASLIDPSAK.I |
| | | 1782.8324 | 34.4 | 85 | R.ETEQLHTEDMEHQR.G |
| | | 1798.8226 | 31.5 | 63 | R.ETEQLHTEDMEHQR.G + Oxidation (M) |
| | | 1814.9669 | 32.9 | 102 | K.YGVVVYSPQNYQIER.F |
| | | 2017.1870 | 35.7 | 84 | K.AVGVTEVILAVAYRPEAMK.E |
| | | 2033.1718 | 30.4 | 36 | K.AVGVTEVILAVAYRPEAMK.E + Oxidation (M) |
| | | 2436.2542 | 36.8 | 208 | K.IGDGAIVGYPYASIGANCVIGESCR.I + 2 Carbamidomethyl (C) |
| 42 | Trypanothione reductase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134067080 emb CAM65344.1) | 1162.5474 | 5.08 | 56 | R.TPAYFYESGK.R |
| | | 1270.5291 | 10.5 | 57 | R.ESGGFGWEMDR.E |
| | | 1286.5178 | 5.58 | 51 | R.ESGGFGWEMDR.E + Oxidation (M) |
| | | 1510.7898 | 9.39 | 64 | K.LMVTGAQYMDLIR.E |
| | | 1526.7753 | 3.12 | 16 | K.LMVTGAQYMDLIR.E + Oxidation (M) |
| | 1637.8237 | 6.57 | 138 | K.TSVDNIYAIGDVTNR.V | |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|---|-------------------|--|---------------------------|--|
| 43 | Putative vacuolar ATP synthase subunit b [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134085080 emb CAM69481.1)) | 2456.2617 | 1.98 | 169 | R.AYDLVVLGAGSGGLEAGWNAAVTHK.K |
| | | 2474.1694 | 10.3 | 92 | K.ISDFHSTIGVHPTSAEELCSMR.T + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1122.6343 | 6.91 | 41 | R.NIEGIPINPR.A |
| | | 1394.8102 | 7.19 | 65 | R.AVNGPLVILEDV.R.K |
| | | 1593.9158 | 9.99 | 65 | R.QLYPPINILPSSLR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) |
| | | 1675.9147 | 7.94 | 118 | K.AVVQVFEGTSGIDVVR.S |
| | | 1715.9449 | 7.15 | 103 | K.TVLFNLNDPTIER.I |
| | | 2103.1885 | 8.37 | 107 | K.IPLFSGAGLPHNEIAAQIVR.Q |
| | | 2179.1167 | 6.32 | 110 | K.ELNESYSVKPHLEYTTIR.A |
| | | 1188.6049 | -14.30 | 88 | K.IVDGNDLSLR.H |
| | | 1267.6221 | -24.27 | 64 | R.STVTLNSAEFAK.I |
| | | 1355.7908 | -25.71 | 81 | R.NIILGLNLASLSK.V |
| | | 1582.7532 | -25.39 | 82 | -.MLEAQVQYASLWK.R + Oxidation (M) |
| | | 1653.7178 | -17.23 | 48 | K.AEARDEDEHEPISR.R |
| 44 | Putative nitrilase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070599 emb CAM68945.1)) | 1928.8190 | -14.44 | 153 | R.HDDSDVVTLTSENPER.T |
| | | 1987.8618 | -13.60 | 135 | K.DSPCMVEYGIDNVGYLR.Y + Carbamidomethyl (C) |
| | | 2003.8517 | -16.00 | 83 | K.DSPCMVEYGIDNVGYLR.Y + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 2027.8927 | -18.39 | 66 | K.LLEIEAESMGIPENDYR.S + 2 Oxidation (M) |
| | | 2249.0239 | -10.25 | 212 | K.FSSSGDVGQGYTFLQAAGVSDR.S |
| | | 2548.2439 | -6.29 | 84 | K.AEGGNGAIGVEVAMEEPIITLSFALR.F + Deamidated (NQ); Oxidation (M) |
| | | 1191.6345 | 25.8 | 24 | K.VDLSVIQDMR.N + Oxidation (M) |
| | | 1590.7786 | 20.0 | 62 | K.LFNSSMTFGSDGALK.H + Oxidation (M) |
| 45 | Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134070342 emb CAM68679.1)) | 1767.9116 | 35.8 | 64 | R.AVDNQYVFLCSPAR.D + Carbamidomethyl (C) |
| | | 2420.2112 | 41.9 | 44 | R.FDEGEVLSAGNDATAISLDEHTK.F + Deamidated (NQ) |
| | | 1469.6564 | 3.57 | 33 | R.SVYQPQQCMNAK.G + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) |
| | | 1730.9785 | 11.4 | 108 | K.KHDVILGLFLFGTDR.V |
| | | 2151.0129 | 1.20 | 60 | R.YVFPQMYFSPQLQAATDK.L + Oxidation (M) |
| 46 | Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134069817 emb CAM68143.1)) | 2447.1353 | 12.8 | 63 | K.GIDIAFLGQNDLCMSGLYDGR.Y + Carbamidomethyl (C); Deamidated (NQ) |
| | | 1037.5267 | -14.24 | 27 | K.LEPFTFQR.R |
| | | 1252.6510 | -13.93 | 65 | K.SKLEPFTFQR.R |
| | | 1338.6577 | -16.71 | 90 | M.PTEAHGWAALSAS.S |
| | | 1479.7506 | -7.99 | 91 | K.LANAMGAEVTVFTR.S |
| | | 1496.6973 | -5.10 | 75 | K.ISIECINEAYER.M + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1534.7429 | -14.35 | 125 | K.TPTFGGYS DHVVVR.E |
| | | 1662.8428 | -10.27 | 68 | K.KTPTFGGYS DHVVVR.E |
| | | 1849.9540 | -10.89 | 43 | K.LALVGMPEHAHPPLDPR.R |
| | | 1865.9442 | -13.33 | 38 | K.LALVGMPEHAHPPLDPR.R + Oxidation (M) |
| 2796.2646 | -6.53 | 217 | R.DVGPDDVVIINAIYCGVCHSDVHQAR.D + 2 Carbamidomethyl (C) | | |

| Spot ID ^a | Proteína (gi) ^b | Mr Observada (Da) | ppm | Mascot Score ^c | Sequências de Peptídeos |
|----------------------|---|-------------------|------|---------------------------|---|
| 47 | Putative dihydrolipoamide acetyltransferase precursor [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134073811 emb CAM72550.1) | 1372.5950 | 19.3 | 82 | K.SEETGEFEMTGR.V |
| | | 1620.8092 | 20.2 | 104 | R.VENNVNFSASFDHR.I |
| | | 1854.8888 | 22.0 | 95 | K.NLEIPHYLFDCCR.V + Carbamidomethyl (C) |
| | | 1941.0317 | 21.6 | 49 | K.GTPPANPNFIDIPVTTMR.S |
| | | 1957.0194 | 17.7 | 22 | K.GTPPANPNFIDIPVTTMR.S + Oxidation (M) |
| | | 2045.0947 | 24.3 | 98 | R.ANILVPEVNSSWQGFIR.Q |
| | | 913.5115 | 20.2 | 27 | K.SFFFIPR.L |
| | | 1240.6177 | 17.8 | 46 | K.LEGYENFGGVR.I |
| | | 1387.7186 | 16.0 | 27 | K.TIYNAVLAHDR.V |
| | | 1770.9240 | 18.7 | 78 | K.LPEGTALATSTDYLYR.V |
| | Metallo-peptidase, Clan MG, Family M24 [Leishmania infantum JPCM5] (gi 134073415 emb CAM72143.1) | | | | |

^a ID, identificação dos *spots* proteicos.

^b Os Números de acesso (gi) correspondem ao código identificador obtido no NCBI GenInfo.

^c Mascot score proteico com significância estatística ($p < 0,05$) na homologia e identidade da proteína.

Mr, massa molecular relativa. ppm, partes por milhão.

As proteínas identificadas, correspondentes aos *spots* com presença de uma única proteína, foram classificadas em 12 categorias funcionais de acordo com as anotações do Gene Ontology e Panther (Figura 14 e Tabelas 8 e 9). As proteínas com maior abundância relativa no isolado do grupo recidiva foram classificadas majoritariamente nas categorias de proteínas com atividade antioxidante/detoxificação, chaperonas e envolvidas na resposta ao *stress*. Por outro lado, proteínas envolvidas na via de proteólise e no citoesqueleto apresentaram regulação reduzida no isolado do grupo recidiva. As proteínas com processo biológico desconhecido ou hipotéticas representaram 14,3% e 27,3% das proteínas identificadas nos isolados dos grupos recidiva (MG11A) e cura (MG14A), respectivamente.

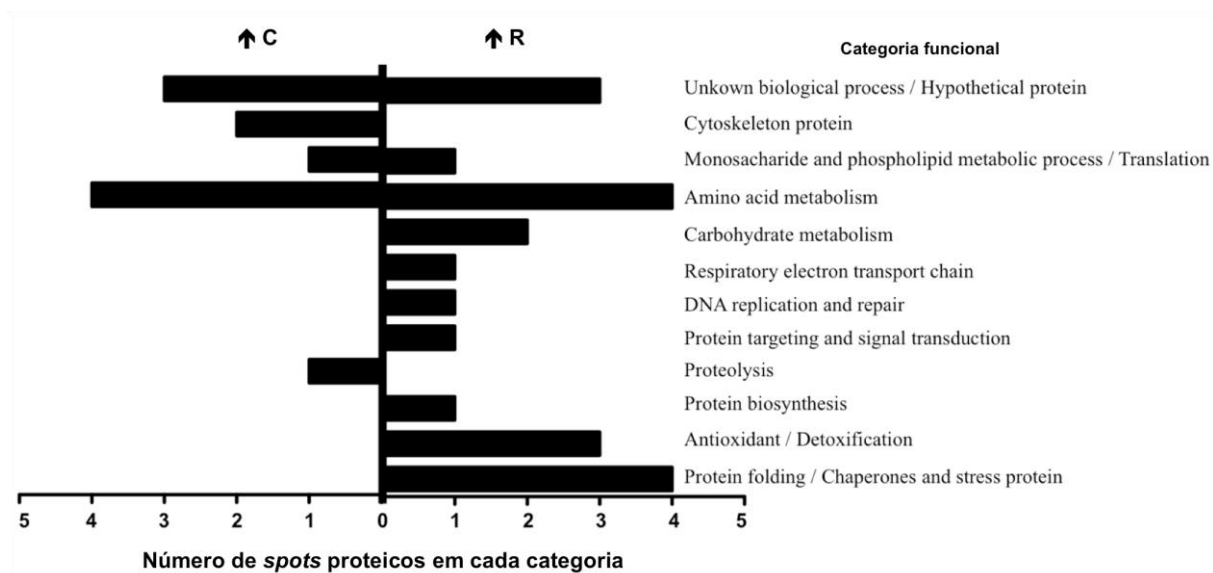


Figura 14 – Categorização funcional das proteínas identificadas. Classes dos processos biológicos dos *spots* proteicos com presença de uma única proteína. A categorização funcional foi baseada nas anotações do Gene Ontology e Panther. Isolado de *L. (L.) chagasi* obtido de paciente que apresentou cura (C) e falha (R) ao tratamento com miltefosina.

Como pode ser observado nas tabelas 8 e 9, algumas proteínas foram identificadas em *spots* com diferentes localizações no gel: a chaperonina Hsp60 (*spots* 11, 25 e 26), a peroxiredoxina (*spots* 4, 9 e 10), a álcool desidrogenase dependente de NADP (*spots* 23), a aldolase ácida 2,4-dihydroxyhepto-2-eno-1,7-dioico (*spots* 1, 2, 13 e 16) e uma proteína hipotética (*spots* 17, 24 e 28). Esses achados indicam provavelmente a ocorrência de modificações pós-traducionais, mutação e/ou isoformas destas proteínas.

Tabela 8 – Proteínas identificadas com regulação aumentada no isolado de *L. (L.) chagasi* (MG11A) obtido do paciente que apresentou falha ao tratamento com miltefosina.

| ID ^a | Protein Identity | Ratio (R/C) ^b | T-test (p) | Accession number ^c | pI ^d (exp/pred) | Mr ^e (exp/pred) | Reported association to drug resistant phenotype | |
|--|---|--------------------------|------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|--|---|
| | | | | | | | Reg | Ref |
| Protein folding / Chaperones and stress proteins^f | | | | | | | | |
| 11 | Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor | 1.28 | 0.014 | gi 134074164 | 5.71 / 5.33 | 60 / 59.32 | | |
| 25 | Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor | 1.35 | 0.026 | gi 134074164 | 5.64 / 5.33 | 60 / 59.32 | ↑ | (Drummel-Smith <i>et al.</i> , 2004; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| 26 | Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor | 1.34 | 0.026 | gi 134074164 | 5.75 / 5.33 | 61 / 59.32 | | |
| 14 | Stress-induced protein sti1 | 1.23 | 0.016 | gi 134067520 | 6.33 / 5.90 | 62 / 62.20 | ↑ / ↓ | (Walker <i>et al.</i> , 2012) / (Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| Antioxidant / Detoxification^f | | | | | | | | |
| 4 | Mitochondrial peroxiredoxin | 1.36 | 0.007 | gi 16751316 | 5.47 / 6.43 | 25 / 25.35 | ↑ / ↓ | (Wyllie <i>et al.</i> , 2008; Daneshvar <i>et al.</i> , 2012; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) / (Daneshvar <i>et al.</i> , 2012) |
| 9 | Mitochondrial peroxiredoxin | 1.38 | 0.008 | gi 16751316 | 5.27 / 6.43 | 24 / 25.35 | | |
| 10 | Cytosolic peroxiredoxin | 1.42 | 0.011 | gi 16751318 | 6.57 / 7.72 | 21 / 22.12 | | |
| Protein biosynthesis^f | | | | | | | | |
| 5 | Translation elongation factor 1-beta | 1.11 | 0.007 | gi 134074101 | 4.74 / 4.61 | 36 / 23.22 | ↑ | (Biyani <i>et al.</i> , 2011) |
| Protein targeting and signal transduction^f | | | | | | | | |
| 40 | Activated protein kinase c receptor (LACK) | 1.15 | 0.043 | gi 321398491 | 6.26 / 6.05 | 40 / 34.35 | ↓ | (El Fadili <i>et al.</i> , 2009) |
| DNA replication and repair^f | | | | | | | | |
| 43 | Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) | 1.25 | 0.044 | gi 134068565 | 4.93 / 4.82 | 43 / 32.39 | ↑ / ↓ | (Kumar <i>et al.</i> , 2010; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) / (Chawla <i>et al.</i> , 2011) |
| Respiratory electron transport chain^f | | | | | | | | |
| 18 | ATPase beta subunit | 1.15 | 0.019 | gi 134070254 | 5.17 / 5.14 | 55 / 56.26 | ↑ / ↓ | (Walker <i>et al.</i> , 2012; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) / (Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| Metabolic enzymes^f | | | | | | | | |
| Carbohydrate metabolism | | | | | | | | |
| 23 | NADP-dependent alcohol dehydrogenase | 1.43 | 0.026 | gi 134069817 | 6.37 / 5.96 | 44 / 38.43 | - | - |
| 46 | NADP-dependent alcohol dehydrogenase | 1.35 | 0.048 | gi 134069817 | 6.51 / 5.96 | 44 / 38.43 | - | - |
| Amino acid metabolism | | | | | | | | |
| 1 | 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 1.85 | 0.007 | gi 134070342 | 5.76 / 5.80 | 33 / 30.38 | | |
| 2 | 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 1.78 | 0.007 | gi 134070342 | 5.81 / 5.80 | 33 / 30.38 | ↑ | (Daneshvar <i>et al.</i> , 2012; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| 13 | 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 1.92 | 0.015 | gi 134070342 | 5.61 / 5.80 | 33 / 30.38 | | |
| 16 | Pyrrroline-5-carboxylate reductase | 1.25 | 0.016 | gi 321399182 | 6.38 / 6.22 | 30 / 28.65 | - | - |
| Monosaccharide and phospholipid metabolic process / Translation | | | | | | | | |
| 41 | GDP-mannose pyrophosphorylase | 1.24 | 0.043 | gi 134069789 | 6.04 / 5.70 | 45 / 41.81 | - | - |
| Unknown biological process / Hypothetical proteins^f | | | | | | | | |
| 27 | Ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor | 1.21 | 0.027 | gi 134068463 | 5.89 / 6.74 | 17 / 21.30 | ↓ | (Sharma <i>et al.</i> , 2009) |
| 21 | Conserved hypothetical protein | 1.11 | 0.026 | gi 134073755 | 5.33 / 5.82 | 30 / 29.11 | - | - |
| 36 | Conserved hypothetical protein | 1.28 | 0.036 | gi 134071523 | 5.95 / 6.11 | 45 / 35.58 | - | - |

^a Spot ID, Número correspondente aos spots indicados na figura 12.

^b Ratio, abundância relativa dos spots proteicos dos isolados dos grupos R (recidiva) sobre C (cura).

^c Número de acesso correspondente ao banco de dados de *L. (L.) infantum* de acordo com NCBI.

^d pI, Ponto isoelétrico (exp, experimental; e pred, predito).

^e Mr, Massa molecular relativa, kDa (exp, experimental; e pred, predito).

^f Categorias funcionais de acordo com as anotações dos processos biológicos do Gene Ontology e Panther.

Reg, regulação; Ref, referências.

Tabela 9 – Proteínas identificadas com regulação reduzida no isolado de *L. (L.) chagasi* (MG11A) obtido do paciente que apresentou falha ao tratamento com miltefosina.

| ID ^a | Protein Identity | Ratio (C/R) ^b | T-test (p) | Accession number ^c | pI ^d (exp/pred) | Mr ^e (exp/pred) | Reported association to drug sensitive phenotype | |
|---|---|--------------------------|------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|--|---|
| | | | | | | | Reg | Ref |
| Proteolysis^f | | | | | | | | |
| 19 | Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 | 1.24 | 0.019 | gi 134070535 | 6.27 / 5.84 | 68 / 77.18 | ↓ | (Kumar <i>et al.</i> , 2010; Biyani <i>et al.</i> , 2011; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| Metabolic enzymes^f | | | | | | | | |
| Amino acid metabolism | | | | | | | | |
| 35 | Spermidine synthase (SPDSYN) | 1.41 | 0.036 | gi 134066976 | 5.34 / 5.18 | 37 / 32.91 | - | - |
| 37 | S-adenosylmethionine synthetase | 1.20 | 0.036 | gi 321398550 | 5.95 / 5.50 | 52 / 43.10 | ↓ | (DrummelSmith <i>et al.</i> , 2004; Verma <i>et al.</i> , 2007; Walker <i>et al.</i> , 2012; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| 44 | Nitrilase | 1.27 | 0.047 | gi 134070599 | 6.25 / 5.99 | 34 / 31.11 | ↑ | (Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| 45 | 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 2.19 | 0.048 | gi 134070342 | 6.01 / 5.80 | 34 / 30.38 | ↓ | (Daneshvar <i>et al.</i> , 2012) |
| Translation | | | | | | | | |
| 34 | RNA helicase | 1.23 | 0.035 | gi 134069547 | 6.34 / 8.82 | 50 / 58.76 | ↑ / ↓ | (Chawla <i>et al.</i> , 2011; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) / (Biyani <i>et al.</i> , 2011) |
| Cytoskeleton proteins^f | | | | | | | | |
| 7 | Actin | 1.43 | 0.007 | gi 134067044 | 5.77 / 5.41 | 52 / 42.02 | ↑ / ↓ | (DrummelSmith <i>et al.</i> , 2004) / (DrummelSmith <i>et al.</i> , 2004; Sharma <i>et al.</i> , 2009; Matrangolo <i>et al.</i> , 2013) |
| 12 | Actin | 1.36 | 0.014 | gi 134067044 | 5.60 / 5.41 | 48 / 42.02 | ↑ / ↓ | |
| Unknown biological process / Hypothetical proteins^f | | | | | | | | |
| 17 | Conserved hypothetical protein | 1.51 | 0.019 | gi 134066959 | 4.81 / 4.72 | 45 / 39.14 | - | - |
| 24 | Conserved hypothetical protein | 1.51 | 0.026 | gi 134066959 | 4.88 / 4.72 | 45 / 39.14 | - | - |
| 28 | Conserved hypothetical protein | 1.47 | 0.027 | gi 134066959 | 4.75 / 4.72 | 45 / 39.14 | - | - |

^a Spot ID, Número correspondente aos *spots* indicados na figura 12.

^b Ratio, abundância relativa dos *spots* proteicos dos isolados dos grupos C (cura) sobre R (recidiva).

^c Número de acesso correspondente ao banco de dados de *L. (L.) infantum* de acordo com NCBI.

^d pI, Ponto isoelétrico (exp, experimental; e pred, predito).

^e Mr, Massa molecular relativa, kDa (exp, experimental; e pred, predito).

^f Categorias funcionais de acordo com as anotações dos processos biológicos do Gene Ontology e Panther.

Reg, regulação; Ref, referências.

2.3. VALIDAÇÃO DA ANÁLISE PROTEÔMICA

A validação dos resultados da análise proteômica comparativa entre os isolados MG11A (R) e MG14A (C) foi realizada por 2D-western blotting. De acordo com a variação na intensidade relativa observada na abordagem proteômica, as proteínas fator de alongação 1-beta (EF-1 β , com expressão aumentada no isolado do grupo recidiva) e α -tubulina (normalizador) foram selecionadas para a verificação da diferença de expressão entre os isolados obtidos de pacientes que apresentaram cura (C) e falha (R) ao tratamento com miltefosina. As duas proteínas foram detectadas por avaliação visual nos dois grupos, e pode-se observar que EF-1 β apresenta maior abundância relativa no isolado do grupo recidiva, o que foi confirmado pela análise densitométrica (Figura 15). As razões dos sinais entre R/C calculadas foram: 1,05 e 1,57 para α -tubulina e EF-1 β , respectivamente. Esses dados estão de acordo com os obtidos na análise proteômica, e confirmam que a EF-1 β apresenta expressão aumentada no isolado do grupo recidiva.

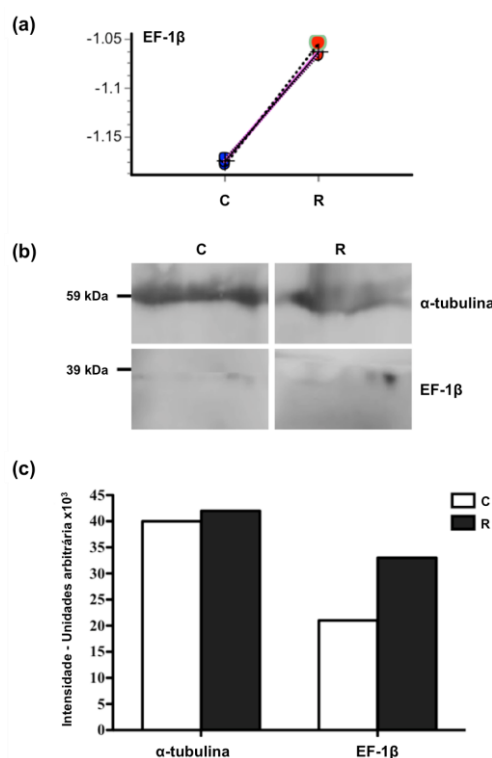


Figura 15 – Validação da análise proteômica. (a) Representação gráfica do nível de expressão do *spot* proteico EF-1 β entre os isolados obtidos de pacientes que apresentaram cura (C) e falha (R) ao tratamento com miltefosina ($p < 0,01$). A quantificação do *spot* proteico foi realizada pelo módulo “Differential In-gel Analysis” do *software* DeCyder 7.0. Cada círculo (azul ou vermelho) representa a abundância do referido *spot* em um gel individual, expressa como razão de volume em relação ao seu correspondente no controle interno. (b) Imagens do 2D-western blotting individualmente obtidas, para a verificação da expressão das proteínas EF-1 β e α -tubulina (normalizador) nas amostras dos isolados dos grupos cura (C) e recidiva (R). (c) Análise densitométrica das proteínas EF-1 β e α -tubulina (normalizador) nos isolados dos grupos cura (C) e recidiva (R).

3. ANÁLISE GENÔMICA

Para investigar a variação genética natural em isolados de *L. (L.) chagasi* e procurar por um possível padrão genômico relacionado com o fenótipo de resistência à miltefosina, o DNA genômico de 32 isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas ao tratamento com miltefosina foram sequenciados por NGS. Desses, 26 isolados foram obtidos antes do tratamento, 4 após o tratamento e 2 obtidos durante a falha terapêutica.

Os dados provenientes do sequenciamento pelo Illumina foram inicialmente analisados pelo FastQC, o qual verificou a qualidade dos mesmos e reportou o resumo estatístico apresentado na tabela 10. A cobertura de sequenciamento de cada isolado foi determinada utilizando o genoma de *L. (L.) infantum* JPCM5 como referência, e variou de 11 a 24x, com uma cobertura média de 16x (Tabela 10).

Os resultados do mapeamento/alinhamento dos conjuntos de *reads* de cada isolado contra o genoma de referência de *L. (L.) infantum* JPCM5 mostrou uma elevada taxa de alinhamento total, variando de 98,43 a 99,15%, com valor médio de 98,82%. É importante ressaltar que a menor taxa de alinhamento concordante exatamente 1 vez foi de 91,12%. Esses dados mostram que as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* apresentam alta similaridade genética. Apesar desta similaridade no genoma, alterações de nucleotídeos entre essas espécies foram observadas (797 SNPs e 275 InDels homozigotos em todos os isolados clínicos analisados), destacando variação genética interespecies.

Tabela 10 – Resumo estatístico dos dados obtidos das análises de sequenciamento e mapeamento dos isolados/cepa de *L. (L.) chagasi*.

| Isolado ^a | Conteúdo de CG% | Número de reads | Tamanho dos reads | Número de bases sequenciadas | Cobertura ^b | Alinhamento/mapeamento ^c |
|----------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| MA01A | 59 | 830281 | 35-301 | 478716624 | 15 | 98,89% |
| MA02A | 59 | 932603 | 35-301 | 538433018 | 16 | 99,06% |
| MA03A | 59 | 816978 | 35-301 | 470059904 | 14 | 98,72% |
| MA04A | 59 | 1018386 | 35-301 | 586006559 | 18 | 98,85% |
| MA05A | 59 | 896187 | 35-301 | 515708989 | 16 | 98,98% |
| MA07A | 59 | 1000948 | 35-301 | 575316413 | 18 | 98,94% |
| MG11A | 59 | 962694 | 35-301 | 551550491 | 17 | 98,67% |
| MG12A | 59 | 1114447 | 35-301 | 638667973 | 19 | 98,87% |
| MG13A | 59 | 1380504 | 35-301 | 794777191 | 24 | 99,15% |
| MG14A | 59 | 979346 | 35-301 | 560044795 | 17 | 98,99% |
| MG14B | 59 | 816242 | 35-301 | 467119065 | 14 | 99,09% |
| MG15A | 59 | 752024 | 35-301 | 427665589 | 13 | 98,74% |
| MG16A | 59 | 1076416 | 35-301 | 619932655 | 19 | 98,99% |
| MG17A | 59 | 995997 | 35-301 | 570887988 | 17 | 98,83% |
| MG17B | 59 | 1093860 | 35-301 | 625959010 | 19 | 98,58% |
| MG17C | 59 | 838292 | 35-301 | 480099581 | 15 | 98,68% |
| MG18A | 59 | 862035 | 35-301 | 492894217 | 15 | 98,54% |
| MG19A | 59 | 903509 | 35-301 | 514412890 | 16 | 98,44% |
| MG19B | 59 | 752245 | 35-301 | 426861694 | 13 | 98,43% |
| PI01A | 59 | 957273 | 35-301 | 550445652 | 16 | 98,95% |
| PI01B | 59 | 1072146 | 35-301 | 615401790 | 19 | 98,59% |
| PI01C | 59 | 1009706 | 35-301 | 582633487 | 18 | 98,88% |
| PI02A | 59 | 717654 | 35-301 | 409343413 | 13 | 98,63% |
| PI03A | 59 | 1121701 | 35-301 | 645079725 | 19 | 98,57% |
| PI04A | 59 | 936812 | 35-301 | 538817093 | 16 | 98,82% |
| PI05A | 59 | 744720 | 35-301 | 429747972 | 13 | 99,02% |
| PI07A | 59 | 624293 | 35-301 | 358954372 | 11 | 99,03% |
| PI08A | 59 | 705558 | 35-301 | 406955211 | 13 | 99,07% |
| PI09A | 59 | 673472 | 35-301 | 387302014 | 12 | 99,01% |
| PI10A | 59 | 721839 | 35-301 | 412770158 | 13 | 98,63% |
| PI11A | 59 | 878485 | 35-301 | 503820566 | 16 | 98,94% |
| PI12A | 59 | 940005 | 35-301 | 536841322 | 16 | 98,68% |
| PP75 | 59 | 769924 | 35-301 | 439460378 | 13 | 98,94% |

^a Identificação dos isolados/cepa de referência de acordo com a tabela 2.

^b Cobertura de sequenciamento, número de vezes que um nucleotídeo é sequenciado durante o processo. Expresso como média granular do número de bases sequenciadas por amostra em relação ao número de bases do genoma de referência (*L. (L.) infantum* JPCM5 – 32126170 bp).

^c Taxa de alinhamento total reportada após o mapeamento/alinhamento do conjunto de reads de cada isolado contra o genoma de referência, *L. (L.) infantum* JPCM5.

3.1. PADRÃO GENÔMICO DE DIVERSIDADE DE SNPs E InDels NOS ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

A partir do mapeamento dos *reads* dos isolados de *L. (L.) chagasi* contra o genoma de referência *L. (L.) infantum* JPCM5, as variações de SNPs e InDels presentes nesses isolados, foram identificadas.

A análise inicial de SNP de todos os 32 isolados (A, B e C) identificou um número total 198.029 SNPs, que geraram 26.627 alterações não silenciosas em regiões codificantes do genoma de *L. (L.) infantum*. No genoma dos isolados clínicos analisados também foi identificado a presença de 15.502 InDels (6.371 inserções e 9.131 deleções). Dentre os efeitos gerados por essas variações no genoma, 1,33% (776) e 0,007% (4) corresponderam aos efeitos de FRAME-SHIFT e STOP-GAINED, respectivamente. Entretanto após a aplicação de filtros para a remoção de alterações relacionadas à espécie *L. (L.) chagasi* e aqueles SNPs presentes em um único isolado, foram observados: 8.374 SNPs para todos os isolados analisados (A, B e C); 8.356 SNPs para os isolados obtidos antes do tratamento (A); e 454 InDels tanto na análise incluindo todos os isolados clínicos (A, B e C), como na análise que utilizou apenas os isolados obtidos antes do tratamento (A).

Apesar do elevado número de variações observadas nas análises de SNPs e InDels, não foi possível identificar um padrão genômico comum nos isolados de um mesmo grupo (baseado na resposta clínica, cura ou recidiva). De forma similar, nenhum padrão genômico completamente discriminatório foi identificado com relação ao fenótipo de resistência à miltefosina entre os isolados dos grupos cura e recidiva, por região geográfica (dados não mostrados).

Com o objetivo de destacar as variações gênicas possivelmente relacionadas com o fenótipo de resistência à miltefosina, os isolados obtidos antes do tratamento (A) foram separados nos grupos cura e recidiva e, os dados de SNPs e InDels identificados foram analisados pelo teste estatístico Chi-quadrado. A significância estatística desta análise foi confirmada pela análise de permutação, e as variações significativas ($p < 0,05$) foram organizadas por genes e estão descritas nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Variações gênicas de SNPs entre os isolados de *L. (L.) chagasi* dos grupos cura e recidiva.

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | | SNP λ^g | | | | Isolados ⁺ para SNP ^h | | |
|--------------|-----------------|---|----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|---------|----|----------|---|---|--|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | | |
| | | | | | | | | | | C | R | C | | R | |
| LinJ.01.0850 | 1 | peptidyl dipeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 | OG5_127067 | 263690 | G | C | W334S | 0,225 | 0,036 | 14 | 8 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG15 MG16 MG18 PI01 PI02 PI03 PI12 |
| | | | | 263697 | A | G | I336M | 0,127 | 0,011 | 14 | 7 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG15 MG16 MG18 PI02 PI03 PI12 |
| | | | | 263736 | T | G | N349K | 0,225 | 0,036 | 14 | 9 | 14 | 9 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI12 |
| | | | | 263741 | C | T | A351V | 0,225 | 0,036 | 14 | 9 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI12 |
| | | | | 263750 | T | A | I354N | 0,225 | 0,036 | 14 | 9 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI12 |
| LinJ.02.0270 | 2 | ABC1 transporter, putative | OG5_126568 | 134538 | G | A | H1374Y | 0,036 | 0,037 | 2 | 7 | 2 | 7 | MG12 PI07 | MG11 MG16 MG17 MG18 PI02 PI03 PI11 |
| LinJ.02.0680 | 2 | ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 78 (HSP78), putative | OG5_126636 | 316256 | C | T | R669C | 0,008 | 0,002 | 10 | 1 | 10 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | PI12 |
| LinJ.02.0710 | 2 | dipeptylcarboxypeptidase (DCP) | OG5_127067 | 323516 | A | G | K307R | 0,016 | 0,021 | 6 | 0 | 6 | 0 | MA01 MA04 MA05 PI04 PI05 PI07 | --- |
| LinJ.04.0300 | 4 | beta-fructofuranosidase, putative | OG5_134818 | 94336 | T | A | S96T | 0,038 | 0,032 | 7 | 1 | 7 | 1 | MA01 MA02 MA03 MG12 MG14 PI04 PI07 | MG18 |
| LinJ.08.0700 | 8 | amastin-like protein | OG5_132980 | 301462 | C | A | P4Q | 0,037 | 0,044 | 5 | 0 | | | MA03 MA05 PI05 PI08 PI10 | --- |
| | | | | 301470 | A | G | I7V | 0,037 | 0,044 | 5 | 0 | 11 | 2 | MA03 MA05 PI05 PI08 PI10 | --- |
| | | | | 301527 | C | G | P26A | 0,037 | 0,044 | 6 | 0 | | | MA03 MA05 MG11 PI05 PI08 PI10 | --- |
| | | | | 301915 | C | G | A155G | 0,065 | 0,045 | 8 | 2 | | | MA01 MA02 MA03 MG12 MG19 PI04 PI08 PI10 | MG13 PI02 |
| LinJ.08.0740 | 8 | tuzin, putative | OG5_173452 | 319451 | A | C | E195A | 0,039 | 0,032 | 1 | 5 | 1 | 5 | MA02 | MA07 MG17 PI01 PI11 PI12 |
| LinJ.08.1050 | 8 | suppressive immunomodulating factor, putative (TSIF) | OG5_145870 | 441695 | C | A | N231K | 0,011 | 0,038 | 5 | 0 | 5 | 0 | MA02 PI04 PI05 PI08 PI09 | --- |
| LinJ.10.0410 | 10 | folate/biopterin transporter, putative | OG5_129265 | 178476 | C | A | L543I | 0,029 | 0,036 | 5 | 0 | 5 | 0 | MA03 MG12 MG19 PI09 PI10 | --- |
| LinJ.11.1230 | 11 | ATP-binding cassette protein subfamily A, member 3, putative (ABCA3) | OG5_126568 | 503955 | C | A | R883S | 0,115 | 0,044 | 6 | 10 | 9 | 12 | MA01 MA03 MG14 MG19 PI07 PI10 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 505425 | G | A | G1373S | 0,034 | 0,009 | 6 | 10 | | | MA05 MG12 MG14 MG19 PI08 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI11 |
| LinJ.11.1240 | 11 | ATP-binding cassette protein subfamily A, member 4, putative (ABCA4) | OG5_126568 | 513644 | A | G | T550A | 0,061 | 0,036 | 6 | 10 | | | MA01 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 513785 | T | G | S597A | 0,026 | 0,025 | 5 | 9 | 10 | 11 | MA01 MA04 MG19 PI04 PI08 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG18 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 515018 | T | C | S1008P | 0,012 | 0,005 | 4 | 10 | | | MA01 MA05 PI04 PI05 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG18 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 515102 | G | A | V1036I | 0,061 | 0,034 | 6 | 10 | | | MA01 MA05 MG12 PI04 PI05 PI09 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.11.1260 | 11 | ATP-binding cassette protein subfamily A, member 5, putative (ABCA5) | OG5_126568 | 524274 | C | G | D631E | 0,115 | 0,043 | 6 | 10 | | | MA01 MA04 MG14 PI05 PI07 PI09 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI12 |
| | | | | 527351 | C | G | T1657S | 0,106 | 0,031 | 11 | 4 | 12 | 10 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI09 | MG13 MG15 PI01 PI12 |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | | | SNP λ^g | | | | Isolados ⁺ para SNP ^h | |
|--------------|-----------------|--|-----------------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---|---|-----------------|----|----------|----|---|--|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | | |
| LinJ.12.0290 | 12 | hypothetical protein, unknown function | OG5_183315 | 148589 | T | C | S126P | 0,011 | 0,007 | 9 | 1 | 9 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 PI05 PI07 PI08 PI09 | MG11 |
| LinJ.12.0662 | 12 | surface antigen protein 2, putative | OG5_linf LinJ.12.0662 | 388538 | A | C | E176A | 0,043 | 0,013 | 10 | 2 | 10 | 2 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 PI04 PI05 PI07 PI09 | PI02 PI11 |
| LinJ.12.0663 | 12 | surface antigen protein 2, putative | OG5_133076 | 396281 | A | G | D622G | 0,191 | 0,040 | 9 | 12 | 9 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA04 MG12 MG14 PI04 PI07 PI09 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.12.0665 | 12 | surface antigen protein 2, putative | OG5_133429 | 405029 | C | A | T105K | 0,014 | 0,020 | 1 | 4 | 14 | 12 | MA04 | MA07 MG16 MG18 PI11 |
| | | | | 405039 | G | C | M108I | 0,003 | 0,012 | 1 | 5 | | | PI08 | MA07 MG16 MG18 PI11 PI12 |
| | | | | 405046 | C | G | H111D | 0,001 | 0,013 | 3 | 5 | | | MA04 PI08 PI09 | MA07 MG16 MG18 PI01 PI11 |
| | | | | 405064 | A | G | M117V | 0,002 | 0,014 | 2 | 6 | | | MA03 PI05 | MA07 MG11 MG16 MG18 PI11 PI12 |
| | | | | 405066 | G | A | M117I | 0,011 | 0,003 | 0 | 2 | | | --- | MG16 PI11 |
| | | | | 405067 | G | A | G118R | 0,010 | 0,018 | 0 | 2 | | | --- | MA07 MG18 |
| | | | | 405068 | G | C | G118A | 0,002 | 0,018 | 0 | 2 | | | --- | MA07 MG18 |
| | | | | 405074 | G | A | G120E | 0,018 | 0,039 | 1 | 5 | | | PI08 | MA07 MG16 MG18 PI11 PI12 |
| | | | | 405079 | A | G | S122G | 0,001 | 0,003 | 0 | 5 | | | --- | MA07 MG16 MG18 PI11 PI12 |
| | | | | 405096 | C | G | D127E | 0,001 | 0,016 | 6 | 1 | | | MA01 MA02 MA05 PI07 PI08 PI09 | MG11 |
| | | | | 405175 | A | C | R154S | 0,044 | 0,030 | 14 | 11 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 405624 | G | T | N303K | 0,013 | 0,028 | 7 | 11 | | | MA03 MA04 MG14 PI04 PI05 PI08 PI09 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| 405764 | C | T | A350V | 0,048 | 0,007 | 0 | 2 | --- | PI03 PI11 | | | | | | |
| 405766 | G | T | G351C | 0,168 | 0,019 | 0 | 1 | --- | PI11 | | | | | | |
| LinJ.12.0666 | 12 | surface antigen protein 2, putative | OG5_161933 | 411744 | G | C | E225Q | 0,053 | 0,011 | 13 | 5 | 14 | 5 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG15 MG18 PI03 PI12 |
| | | | | 411768 | G | A | E233K | 0,029 | 0,001 | 14 | 5 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG15 MG18 PI03 PI12 |
| | | | | 411813 | T | C | S248P | 0,091 | 0,035 | 12 | 5 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG19 PI04 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG15 MG18 PI03 PI12 |
| | | | | 411816 | T | G | S249A | 0,053 | 0,011 | 13 | 5 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG15 MG18 PI03 PI12 |
| 411857 | C | G | S262R | 0,091 | 0,031 | 12 | 5 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG15 MG18 PI03 PI12 | | | | | | |
| LinJ.12.0667 | 12 | hypothetical protein | OG5_154537 | 414193 | C | T | A257V | 0,047 | 0,038 | 1 | 4 | 1 | 4 | MA02 | MG13 MG15 MG16 PI02 |
| LinJ.12.0668 | 12 | surface antigen protein 2, putative | OG5_133076 | 421427 | C | A | R153S | 0,036 | 0,044 | 2 | 7 | 6 | 11 | PI04 PI09 | MG11 MG13 MG16 MG18 PI02 PI03 PI11 |
| | | | | 421446 | C | T | T159M | 0,087 | 0,038 | 0 | 2 | | | --- | MG16 PI02 |
| | | | | 421457 | A | C | I163L | 0,087 | 0,038 | 0 | 2 | | | --- | MG16 PI02 |
| | | | | 422397 | C | T | T476I | 0,087 | 0,028 | 0 | 2 | | | --- | MA07 MG15 |
| 422480 | A | T | T504S | 0,089 | 0,023 | 5 | 8 | MA02 MG12 PI04 PI05 PI08 | MA07 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI11 | | | | | | |
| LinJ.12.0670 | 12 | surface antigen protein 2, putative | OG5_linf LinJ.12.0670 | 429351 | T | A | V59E | 0,147 | 0,045 | 7 | 9 | 7 | 9 | MA04 MA05 MG12 MG19 PI04 PI08 PI09 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI11 |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | SNP λ^g | | | | Isolados+ para SNP ^h | | | | | |
|--------------|-----------------|--|----------------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|---------|----|---------------------------------|----|--|---|--|--|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | Isolados+ para SNP ^h | | | |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | Isolados+ para SNP ^h | | | |
| | | | | | | | | | | | | Grupo CURA | | Grupo RECIDIVA | | | |
| LinJ.12.0690 | 12 | surface antigen protein 2 precursor | OG5_161933 | 438536 | A | T | S44T | 0,164 | 0,037 | 13 | 11 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI11 PI12 | | |
| | | | | 438983 | A | C | K193Q | 0,017 | 0,013 | 2 | 8 | 14 | 12 | MA02 PI07 | MG11 MG13 MG15 MG16 MG18 PI02 PI11 PI12 | | |
| | | | | 439099 | T | G | S231R | 0,035 | 0,034 | 5 | 8 | | | MA01 MG14 PI04 PI07 PI09 | MA07 MG11 MG15 MG16 MG17 PI03 PI11 PI12 | | |
| LinJ.13.0220 | 13 | small Rab GTP binding protein, putative | OG5_126724 | 71413 | G | A | A106V | 0,000 | 0,004 | 10 | 1 | 10 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | PI12 | | |
| LinJ.13.0290 | 13 | flagellar radial spoke protein, putative | OG5_129136 | 96697 | A | G | E388G | 0,038 | 0,024 | 7 | 1 | 7 | 1 | MA01 MA02 MA04 PI04 PI05 PI08 PI09 | MG16 | | |
| LinJ.13.0740 | 13 | hypothetical protein, conserved | OG5_180805 | 269506 | C | T | G121E | 0,010 | 0,005 | 11 | 2 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG19 PI04 PI05 PI08 PI09 PI10 | MG16 PI02 | | |
| | | | | 269524 | T | C | E115G | 0,091 | 0,044 | 11 | 6 | 12 | 7 | MA02 MA03 MA04 MA05 MG14 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG13 MG19 PI01 PI02 PI03 PI12 | | |
| LinJ.14.0290 | 14 | hypothetical protein, conserved | OG5_130376 | 87137 | C | T | S186F | 0,000 | 0,005 | 10 | 1 | 10 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | PI12 | | |
| LinJ.14.0730 | 14 | fatty acid elongase, putative | OG5_linfLinJ.14.0730 | 263720 | G | A | T159M | 0,073 | 0,048 | 11 | 4 | 11 | 4 | MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 | MG16 PI01 PI11 PI12 | | |
| LinJ.14.0780 | 14 | fatty acid elongase, putative | OG5_204198 | 288000 | T | C | M205V | 0,036 | 0,040 | 2 | 7 | 2 | 7 | MA02 MA04 | MG11 MG13 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 | | |
| LinJ.14.1180 | 14 | kinesin K39, putative | OG5_126585 | 480733 | A | G | N1150S | 0,054 | 0,040 | 10 | 3 | | | MA01 MA03 MA04 MA05 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI10 | MG18 PI01 PI02 | | |
| | | | | 481084 | A | G | N1267S | 0,030 | 0,020 | 11 | 3 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MG14 MG19 PI04 PI05 PI08 PI09 PI10 | MG15 MG16 PI02 | | |
| | | | | 481552 | A | G | N1423S | 0,053 | 0,030 | 12 | 5 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | MA07 MG16 MG18 PI03 PI11 | | |
| | | | | 482716 | C | T | A1811V | 0,099 | 0,037 | 9 | 4 | 14 | 9 | MA03 MA05 MG12 MG14 MG19 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG18 PI02 PI03 | | |
| | | | | 483046 | C | T | A1921V | 0,054 | 0,045 | 10 | 3 | | | MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI10 | MA07 MG16 PI01 | | |
| | | | | 483471 | A | G | T2063A | 0,036 | 0,021 | 9 | 2 | | | MA01 MA02 MA04 MA05 PI04 PI05 PI08 PI09 PI10 | MG15 PI11 | | |
| | | | | 486192 | A | G | T2970A | 0,036 | 0,024 | 9 | 2 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MG12 PI04 PI05 PI09 PI10 | MG11 MG18 | | |
| LinJ.14.1190 | 14 | kinesin K39, putative | OG5_126585 | 493521 | G | A | A1538T | 0,039 | 0,034 | 6 | 1 | | | MA01 MA03 MG14 MG19 PI07 PI08 | MG17 | | |
| | | | | 494368 | G | C | G1820A | 0,024 | 0,029 | 1 | 6 | | | PI04 | MA07 MG13 MG16 MG18 PI01 PI12 | | |
| | | | | 495052 | A | C | E2048A | 0,091 | 0,030 | 12 | 5 | 14 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG19 PI04 PI05 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG13 MG17 PI02 PI03 | | |
| | | | | 495133 | A | G | K2075R | 0,110 | 0,027 | 13 | 6 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG13 MG15 MG16 MG18 PI11 | | |
| LinJ.15.1260 | 15 | nucleoside transporter 1, putative | OG5_150010 | 497543 | C | T | S76N | 0,191 | 0,041 | 9 | 12 | 9 | 12 | MA01 MA03 MA04 MG12 MG14 MG19 PI05 PI07 PI09 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 | | |
| LinJ.16.0220 | 16 | mitochondrial ornithine transporter 1-like protein | OG5_169666 | 79003 | G | T | T304K | 0,003 | 0,020 | 9 | 1 | 9 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | PI12 | | |
| LinJ.16.0690 | 16 | hypothetical protein, conserved | OG5_128129 | 246138 | G | A | S93F | 0,001 | 0,011 | 5 | 8 | 5 | 8 | MA05 MG12 MG15 PI05 PI10 | MG11 MG13 MG16 MG17 MG18 PI01 PI03 PI11 | | |
| LinJ.16.1030 | 16 | hypothetical protein, unknown function | OG5_132978 | 378143 | T | C | V470A | 0,011 | 0,010 | 1 | 7 | 1 | 7 | MA05 | MA07 MG16 MG17 MG18 PI03 PI11 PI12 | | |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | | | SNP λ^g | | | | Isolados+ para SNP ^h | |
|--------------|-----------------|--|----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|-----------------|----|----------|----|---|---|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | | |
| LinJ.16.1050 | 16 | hypothetical protein, conserved | OG5_132978 | 390534 | A | G | N271D | 0,016 | 0,021 | 6 | 0 | 6 | 0 | MA03 MG12 MG14 PI05 PI08 PI10 | --- |
| | | | | 599553 | C | T | A2456T | 0,031 | 0,024 | 1 | 6 | | | MG14 | MG15 MG17 PI01 PI02 PI03 PI11 |
| LinJ.16.1550 | 16 | kinesin, putative | OG5_126585 | 603512 | T | C | D1136G | 0,046 | 0,040 | 0 | 3 | 4 | 8 | --- | MA07 PI11 PI12 |
| | | | | 603554 | T | C | D1122G | 0,046 | 0,050 | 3 | 0 | | | MA05 PI05 PI07 | --- |
| LinJ.17.0270 | 17 | hypothetical protein, conserved | OG5_183418 | 96989 | G | T | A1019D | 0,000 | 0,009 | 9 | 1 | 9 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | PI12 |
| LinJ.18.1030 | 18 | Hypothetical repeat protein | OG5_156608 | 422788 | G | A | R225Q | 0,005 | 0,029 | 5 | 0 | 5 | 0 | MA03 MA05 MG12 MG14 PI04 | --- |
| LinJ.19.0850 | 19 | ATG8/AUT7/APG8/PAZ2, putative (ATG8B.2) | OG5_137181 | 355993 | C | T | P116L | 0,113 | 0,017 | 8 | 12 | 8 | 12 | MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 PI04 PI08 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.19.1120 | 19 | hypothetical protein, unlikely | OG5_133707 | 484873 | C | T | A180V | 0,011 | 0,026 | 1 | 5 | 1 | 5 | MA02 | MA07 MG11 MG13 MG15 PI01 |
| LinJ.19.1310 | 19 | glycerol uptake protein, putative | OG5_128109 | 561242 | G | A | E51K | 0,059 | 0,018 | 5 | 10 | 5 | 10 | MA01 MA02 MA03 MG12 MG19 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI11 PI12 |
| LinJ.19.1680 | 19 | hypothetical protein | OG5_152365 | 689054 | A | G | S1525G | 0,091 | 0,044 | 12 | 5 | 12 | 5 | MA02 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 |
| | | | | 713834 | C | T | A410V | 0,191 | 0,040 | 9 | 12 | | | MA01 MA02 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.19.1690 | 19 | hypothetical protein | OG5_152365 | 716078 | C | G | A1158G | 0,030 | 0,014 | 11 | 3 | 13 | 12 | MA01 MA02 MA03 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MG16 PI02 PI12 |
| LinJ.20.0100 | 20 | hypothetical protein, conserved | OG5_144452 | 28005 | G | T | S1072Y | 0,115 | 0,047 | 6 | 10 | 6 | 10 | MA02 MA03 MA04 MG12 MG19 PI05 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.20.0940 | 20 | hypothetical protein, conserved | OG5_142225 | 365194 | T | C | L1203P | 0,003 | 0,010 | 0 | 3 | 0 | 3 | --- | MG15 MG16 MG18 |
| LinJ.20.1730 | 20 | aminoacylase, putative, N-acyl-L-amino acid amidohydrolase, putative | OG5_127543 | 715300 | G | A | A312V | 0,059 | 0,025 | 5 | 10 | 5 | 10 | MA01 MA02 MA03 MG14 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.21.1160 | 21 | histone H2A | OG5_126570 | 382447 | A | G | T52A | 0,018 | 0,018 | 5 | 0 | 5 | 0 | MA04 PI07 PI08 PI09 PI10 | --- |
| | | | | 298751 | T | G | S132A | 0,044 | 0,037 | 5 | 9 | | | MA02 MA04 MA05 MG14 MG19 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI11 PI12 |
| LinJ.22.0670 | 22 | A2 protein | OG5_146485 | 299718 | T | A | L454H | 0,031 | 0,028 | 4 | 0 | 9 | 9 | MA03 MA04 MG12 MG14 | --- |
| | | | | 299790 | C | T | L478P | 0,000 | 0,008 | 4 | 0 | | | MA03 MG14 PI04 PI05 | --- |
| LinJ.22.0680 | 22 | 3'a2rel-related protein | OG5_157933 | 305478 | G | T | G487C | 0,091 | 0,035 | 12 | 5 | 12 | 5 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI09 PI10 | MG15 MG17 MG18 PI03 PI11 |
| LinJ.22.1070 | 22 | hypothetical protein, conserved | OG5_145966 | 473772 | C | T | S313N | 0,001 | 0,030 | 0 | 4 | 0 | 4 | --- | MG15 MG16 MG17 MG18 |
| LinJ.22.1160 | 22 | hypothetical protein, unknown function | OG5_126585 | 503770 | C | T | A1976T | 0,028 | 0,019 | 2 | 9 | 2 | 9 | MG12 PI07 | MG11 MG13 MG16 MG17 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.23.0230 | 23 | ATP-binding cassette protein subfamily C, member 1, putative (ABCC1) | OG5_126561 | 71679 | C | G | F826L | 0,044 | 0,035 | 0 | 3 | 0 | 3 | --- | MG11 PI01 PI02 |
| LinJ.23.0240 | 23 | ATP-binding cassette protein subfamily C, member 2, putative (ABCC2) | OG5_126561 | 77941 | C | T | S212L | 0,010 | 0,045 | 11 | 3 | 11 | 3 | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG13 PI12 |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | | | SNP λ^g | | | | Isolados+ para SNP ^h | |
|--------------|-----------------|---|----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|-----------------|----|---------------------|---|--|--|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | | |
| LinJ.23.0290 | 23 | ABC-thiol transporter (MRPA) | OG5_126561 | 96378 | T | C | L759S | 0,051 | 0,033 | 9 | 2 | 12 | 4 | MA01 MA04 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 PI12 |
| | | | | 96599 | A | T | I833F | 0,092 | 0,050 | 7 | 1 | | | MA01 MA02 MA04 MA05 PI07 PI08 PI10 | MG17 |
| | | | | 97904 | G | A | E1268K | 0,038 | 0,034 | 7 | 1 | | | MA01 MG14 MG19 PI05 PI07 PI08 PI09 | PI03 |
| LinJ.23.0660 | 23 | Poly(A)-specific ribonuclease PARN, putative | OG5_128150 | 225968 | T | C | F98L | 0,037 | 0,038 | 5 | 0 | 5 | 0 | MA02 PI04 PI05 PI08 PI09 | --- |
| LinJ.23.1320 | 23 | hypothetical protein, unknown function | OG5_182573 | 528813 | G | C | L240V | 0,054 | 0,046 | 4 | 9 | 4 | 9 | MA02 MA04 MG14 PI07 | MG11 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 528826 | T | C | I235M | 0,054 | 0,046 | 4 | 9 | MA02 MA04 MG14 PI07 | MG11 MG16 MG17 MG18 PI01PI02 PI03 PI11 PI12 | | |
| LinJ.23.1340 | 23 | hypothetical protein, unknown function | OG5_184200 | 536201 | C | G | V240L | 0,050 | 0,035 | 7 | 1 | 7 | 1 | MA01 MA02 MG12 MG14 MG19 PI09 PI10 | MG18 |
| | | | | 536203 | T | A | Q239L | 0,050 | 0,035 | 7 | 1 | | | MA01 MA02 MG12 MG14 MG19 PI09 PI10 | MG18 |
| | | | | 536213 | G | C | L236V | 0,050 | 0,035 | 7 | 1 | | | MA01 MA02 MG12 MG14 MG19 PI09 PI10 | MG18 |
| LinJ.25.1720 | 25 | hypothetical protein, conserved | OG5_151686 | 644110 | G | T | A233E | 0,017 | 0,009 | 3 | 8 | 3 | 8 | MA04 PI07 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG17 MG18 PI02 PI11 |
| LinJ.25.2570 | 25 | phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase 6 (SCG6) | OG5_129839 | 880844 | A | T | L88F | 0,046 | 0,050 | 3 | 8 | 3 | 8 | MA01 MA02 MG12 | MG13 MG15 MG16 MG17 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 880845 | C | T | R89C | 0,046 | 0,050 | 3 | 8 | | | MA01 MA02 MG12 | MG13 MG15 MG16 MG17 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.26.1110 | 26 | hypothetical protein, unknown function | OG5_183708 | 361559 | G | T | A944S | 0,010 | 0,018 | 10 | 1 | 10 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | PI12 |
| LinJ.27.0250 | 27 | kinetoplast-associated protein-like protein | OG5_126854 | 59236 | G | A | A590V | 0,017 | 0,015 | 2 | 8 | 2 | 8 | MA02 PI08 | MA07 MG13 MG15 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.27.0500 | 27 | calpain-like cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative | OG5_130635 | 154854 | G | A | G2949D | 0,059 | 0,010 | 12 | 5 | 14 | 8 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG13 MG16 PI11 PI12 |
| | | | | 158730 | A | G | D4241G | 0,104 | 0,040 | 11 | 5 | | | MA01 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 |
| LinJ.27.1470 | 27 | amino acid transporter, putative | OG5_130822 | 635424 | G | A | A39T | 0,016 | 0,018 | 6 | 0 | 6 | 0 | MA02 MA05 PI04 PI05 PI08 PI09 | --- |
| LinJ.27.1500 | 27 | amino acid transporter, putative (AAT24) | OG5_130822 | 645237 | G | A | R394H | 0,004 | 0,002 | 8 | 0 | 8 | 0 | MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | --- |
| LinJ.29.0110 | 29 | hypothetical protein, conserved | OG5_141556 | 36642 | T | A | E378V | 0,115 | 0,045 | 6 | 10 | 6 | 10 | MA02 MA04 MG14 MG19 PI08 PI09 | MA07 MG11 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI03 PI12 |
| LinJ.30.1050 | 30 | hypothetical protein, conserved | OG5_183848 | 326940 | C | T | R76C | 0,002 | 0,038 | 5 | 0 | 5 | 0 | MA02 PI04 PI05 PI08 PI09 | --- |
| LinJ.30.2470 | 30 | heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative | OG5_126744 | 919508 | C | A | E334D | 0,016 | 0,004 | 12 | 3 | 12 | 3 | MA01 MA02 MA03 MA04 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG18 PI01 PI02 |
| LinJ.31.0910 | 31 | amino acid permease 3 (AAP3) | OG5_142921 | 335742 | C | A | V480L | 0,110 | 0,024 | 13 | 6 | 13 | 6 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI10 | MA07 MG13 MG15 MG18 PI01 PI12 |
| LinJ.31.0950 | 31 | sodium stibogluconate resistance protein, putative | OG5_140928 | 349789 | C | G | K531N | 0,061 | 0,012 | 6 | 11 | 6 | 11 | MA01 MA04 MA05 PI04 PI05 PI07 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.31.1270 | 31 | hypothetical protein, conserved | OG5_142250 | 495451 | C | T | D764G | 0,000 | 0,001 | 14 | 4 | 14 | 4 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG15 MG17 PI02 PI12 |
| LinJ.31.1480 | 31 | hypothetical protein, unknown function | OG5_163849 | 664281 | C | G | G155A | 0,008 | 0,034 | 8 | 1 | 8 | 1 | MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | PI12 |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | SNP λ^g | | | | Isolados+ para SNP ^h | | | |
|--------------|-----------------|--|----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|--|---|---------|----|---------------------------------|----|---|---|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | | |
| LinJ.31.1830 | 31 | amino acid permease (AAT8.2) | OG5_139635 | 836598 | T | C | I64V | 0,061 | 0,018 | 6 | 11 | 6 | 11 | MA01 MA04 MA05 MG14 MG19 PI09 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI11 PI12 |
| LinJ.31.1850 | 31 | amino acid permease (AAT8.3) | OG5_139635 | 847182 | C | T | G15R | 0,225 | 0,031 | 14 | 8 | 14 | 8 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG18 PI02 PI03 PI12 |
| LinJ.31.2050 | 31 | hypothetical protein, unknown function | OG5_183917 | 969997 | C | T | A83T | 0,000 | 0,006 | 10 | 1 | 10 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | PI12 |
| LinJ.31.2290 | 31 | hypothetical protein, unknown function | OG5_163969 | 1094343 | A | C | Y1213D | 0,016 | 0,019 | 6 | 0 | 6 | 0 | MA02 MA04 MA05 PI04 PI07 PI09 | --- |
| LinJ.31.2320 | 31 | 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative | OG5_130243 | 1106350 | C | T | S115N | 0,008 | 0,001 | 10 | 1 | 10 | 1 | MA01 MA02 MA03 MG14 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | PI12 |
| LinJ.31.2400 | 31 | 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative | OG5_130243 | 1133600 | A | T | L328Q | 0,003 | 0,033 | 4 | 5 | 13 | 12 | MA04 MG19 PI04 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG18 PI03 |
| | | | | 1133604 | T | C | M327V | 0,001 | 0,019 | 3 | 5 | | | MA04 MG19 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG18 PI03 |
| | | | | 1133606 | T | A | Y326F | 0,001 | 0,019 | 3 | 5 | | | MA04 MG19 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG18 PI03 |
| | | | | 1133679 | C | T | V302M | 0,006 | 0,022 | 5 | 7 | | | MA04 MG12 PI05 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG18 MG19 PI03 PI11 |
| | | | | 1133694 | C | T | V297M | 0,000 | 0,004 | 5 | 6 | | | MG12 MG19 PI05 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG18 PI03 PI11 |
| | | | | 1133697 | G | A | R296W | 0,000 | 0,006 | 5 | 6 | | | MA04 MG12 MG19 PI05 PI09 | MA07 MG11 MG13 MG18 PI03 PI11 |
| | | | | 1134218 | C | T | N122S | 0,002 | 0,001 | 13 | 11 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 1134336 | C | G | L83V | 0,001 | 0,000 | 12 | 12 | | | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| 1134339 | A | G | L82F | 0,001 | 0,000 | 12 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 | | | | | | |
| 1134350 | T | C | G78E | 0,000 | 0,000 | 11 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 | | | | | | |
| 1134479 | G | A | L35P | 0,000 | 0,000 | 10 | 11 | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG19 PI04 PI05 PI09 PI10 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 | | | | | | |
| 1134488 | G | C | W32S | 0,000 | 0,000 | 11 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 | | | | | | |
| 1134525 | G | A | S20P | 0,001 | 0,001 | 13 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 | | | | | | |
| 1134572 | A | G | A4V | 0,001 | 0,001 | 13 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 | | | | | | |
| LinJ.31.2680 | 31 | RNA polymerase ii largest subunit (RPOIILS) | OG5_126637 | 1254441 | G | A | V366A | 0,002 | 0,025 | 7 | 10 | 7 | 10 | MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI05 PI08 | MA07 MG11 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 |
| LinJ.31.3080 | 31 | acetyl-CoA carboxylase, putative | OG5_127493 | 1380994 | C | G | I1442M | 0,003 | 0,030 | 8 | 10 | 8 | 10 | MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI05 PI08 PI10 | MA07 MG11 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 |
| LinJ.31.3330 | 31 | phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase 5 (SCG5) | OG5_129839 | 1461387 | G | C | R101P | 0,115 | 0,029 | 7 | 11 | 7 | 11 | MA01 MA02 MA03 MG12 MG14 MG19 PI08 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.33.2400 | 33 | hypothetical protein, conserved | OG5_173527 | 917373 | G | A | A180T | 0,016 | 0,015 | 6 | 0 | 6 | 0 | MA03 MA05 MG12 MG19 PI07 PI10 | --- |
| LinJ.33.3230 | 33 | hypothetical protein, conserved | OG5_140248 | 1380475 | G | A | G1904D | 0,029 | 0,031 | 11 | 5 | 12 | 6 | MA01 MA02 MA03 MA04 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI08 PI09 | MG11 MG13 MG16 PI01 PI03 |
| | | | | 1380525 | G | A | E1921K | 0,019 | 0,008 | 10 | 2 | | | MA01 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 PI04 PI05 PI08 PI09 | MG18 PI03 |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | | | SNP λ^g | | | | Isolados+ para SNP ^h | |
|--------------|-----------------|--|-----------------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|-----------------|----|----------|----|--|--|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | | |
| LinJ.34.0710 | 34 | flagellar attachment zone protein, putative | OG5_126585 | 306386 | T | C | K806R | 0,011 | 0,018 | 0 | 5 | 13 | 12 | --- | MG13 MG16 MG18 PI01 PI03 |
| | | | | 306674 | C | T | G710D | 0,000 | 0,000 | 1 | 10 | | | MA01 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 308024 | T | C | K260R | 0,124 | 0,034 | 13 | 7 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG17 PI02 PI03 PI12 |
| LinJ.34.0720 | 34 | flagellar attachment zone protein, putative | OG5_126585 | 311002 | C | G | E831Q | 0,110 | 0,023 | 13 | 6 | 13 | 6 | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI08 PI09 PI10 | MG13 MG15 MG16 PI01 PI02 PI11 |
| LinJ.34.0850 | 34 | serine/threonine-protein phosphatase PP1, putative | OG5_129030 | 354320 | A | C | N285T | 0,036 | 0,021 | 9 | 2 | 9 | 2 | MA03 MA05 MG14 MG19 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG13 |
| LinJ.34.1160 | 34 | tuzin-like protein | OG5_linf LinJ.34.1160 | 485543 | A | T | F266I | 0,025 | 0,028 | 0 | 4 | 0 | 4 | --- | MA07 PI01 PI11 PI12 |
| LinJ.35.0290 | 35 | hypothetical protein, conserved | OG5_135243 | 70984 | A | G | T108A | 0,017 | 0,014 | 2 | 8 | 11 | 12 | MA02 MG12 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG17 MG18 PI01 PI11 |
| | | | | 71075 | T | C | V138A | 0,164 | 0,034 | 9 | 12 | | | MA03 MA04 MG14 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 71203 | A | G | T181A | 0,025 | 0,030 | 0 | 4 | | | --- | MG11 MG13 MG16 PI11 |
| LinJ.35.0500 | 35 | proteophosphoglycan ppg3, putative | OG5_126579 | 178753 | A | G | S509G | 0,065 | 0,038 | 8 | 2 | 9 | 2 | MA01 MA02 MA03 MG12 MG14 MG19 PI05 PI10 | PI01 PI02 |
| | | | | 178756 | A | G | T510A | 0,065 | 0,038 | 8 | 2 | | | MA01 MA02 MA03 MG12 MG14 MG19 PI05 PI10 | PI01 PI02 |
| | | | | 184919 | G | A | R2564H | 0,059 | 0,039 | 2 | 0 | | | MG12 PI09 | --- |
| LinJ.35.0510 | 35 | proteophosphoglycan ppg4 | OG5_126579 | 192047 | C | G | L395V | 0,091 | 0,017 | 7 | 5 | 14 | 10 | MA01 MA04 MA05 MG12 MG14 PI09 PI10 | MG11 MG17 MG18 PI03 PI12 |
| | | | | 192227 | C | G | L455V | 0,110 | 0,026 | 13 | 6 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG15 MG16 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 193487 | G | C | V875L | 0,019 | 0,030 | 2 | 0 | | | MA01 MA05 | --- |
| | | | | 195344 | G | A | A1494T | 0,008 | 0,006 | 7 | 0 | | | MA01 MA03 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 | --- |
| | | | | 195884 | A | G | T1674A | 0,001 | 0,007 | 10 | 2 | | | MA01 MA02 MA03 MG12 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | MG13 PI12 |
| | | | | 196181 | G | A | S1773G | 0,008 | 0,027 | 3 | 4 | | | MA04 MA05 PI09 | MG11 MG17 PI03 PI12 |
| | | | | 197537 | T | C | C2225R | 0,032 | 0,015 | 0 | 6 | | | --- | MG11 MG13 MG16 MG17 PI03 PI11 |
| | | | | 198266 | C | G | L2468V | 0,046 | 0,038 | 0 | 5 | | | --- | MA07 MG13 MG16 MG17 MG18 |
| LinJ.35.0520 | 35 | proteophosphoglycan ppg4 | OG5_126579 | 206838 | G | C | V96L | 0,038 | 0,036 | 7 | 1 | 14 | 12 | MA02 MA03 MA05 MG14 MG19 PI04 PI08 | MG15 |
| | | | | 208149 | T | C | C533R | 0,016 | 0,006 | 9 | 2 | | | MA02 MA03 MA05 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 | MA07 PI01 |
| | | | | 208479 | C | G | L643V | 0,087 | 0,039 | 9 | 10 | | | MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI03 PI12 |
| | | | | 208569 | C | G | L673V | 0,039 | 0,016 | 12 | 3 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI08 PI09 | MA07 MG13 MG15 |
| | | | | 209211 | A | G | T887A | 0,038 | 0,029 | 6 | 8 | | | MA03 MG12 PI04 PI05 PI07 PI09 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG18 PI01 PI03 PI12 |
| | | | | 209547 | G | A | G999S | 0,012 | 0,000 | 14 | 4 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG15 PI01 PI02 |
| | | | | 209553 | C | G | L1001V | 0,225 | 0,035 | 14 | 8 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG17 MG18 PI01 PI03 PI11 |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | | SNP λ^g | | | | Isolados ⁺ para SNP ^h | | |
|--------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|---------|---|----------|---|---|--|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | Chi ² p ^e | Perm. P ^f | por SNP | | por Gene | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | | |
| LinJ.35.0530 | 35 | proteophosphoglycan 5 | OG5_126579 | 210459 | A | G | T1303A | 0,133 | 0,039 | 12 | 7 | 14 | 12 | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG13 MG15 MG16 MG17 PI02 PI03 PI11 |
| | | | | 211134 | G | A | A1528T | 0,041 | 0,026 | 0 | 3 | | | --- | MA07 PI01 PI03 |
| | | | | 211836 | G | A | G1762S | 0,039 | 0,040 | 3 | 0 | | | MA04 MG12 PI10 | --- |
| | | | | 213372 | C | G | L2274V | 0,004 | 0,022 | 7 | 2 | | | MA01 M102 MA03 MA05 PI04 PI07 PI09 | MG11 MG16 |
| | | | | 213519 | G | A | A2323T | 0,038 | 0,045 | 7 | 1 | | | MA01 MA02 MA05 MG12 MG19 PI07 PI09 | PI12 |
| | | | | 218806 | T | C | V348A | 0,016 | 0,004 | 12 | 3 | | | MA01 MA03 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 PI01 PI11 |
| | | | | 218827 | A | G | Q355R | 0,008 | 0,006 | 7 | 0 | | | MA01 MA03 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 | --- |
| | | | | 218862 | G | A | G367S | 0,091 | 0,034 | 12 | 5 | | | MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG15 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 219150 | G | A | A463T | 0,225 | 0,038 | 14 | 8 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG13 MG15 MG16 PI01 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 219967 | G | C | R735P | 0,014 | 0,016 | 7 | 1 | | | MA01 MA04 MA05 MG19 PI04 PI08 PI10 | PI02 |
| | | | | 220070 | G | C | Q769H | 0,027 | 0,044 | 8 | 2 | | | MA01 MA02 MA04 MA05 MG12 MG19 PI04 PI08 | MG13 PI01 |
| | | | | 222589 | A | G | T1609A | 0,023 | 0,013 | 3 | 0 | | | MA01 MG14 PI09 | --- |
| | | | | 223252 | C | G | L1830V | 0,073 | 0,040 | 11 | 4 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MG12 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG13 MG18 PI01 PI02 |
| | | | | 223972 | C | G | L2070V | 0,003 | 0,012 | 3 | 0 | | | MA01 MA04 MG14 | --- |
| | | | | 224183 | G | A | R2140H | 0,048 | 0,020 | 2 | 0 | | | MA05 MG12 | --- |
| | | | | 224731 | A | G | S2323G | 0,006 | 0,004 | 0 | 1 | | | --- | PI01 |
| | | | | 224992 | T | C | C2410R | 0,005 | 0,017 | 3 | 7 | | | MG12 MG14 PI04 | MA07 MG13 MG15 MG16 MG18 PI01 PI12 |
| | | | | 226795 | G | A | A3011T | 0,091 | 0,035 | 12 | 5 | | | MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG13 MG15 PI03 PI12 |
| | | | | 228472 | A | G | I3570V | 0,110 | 0,028 | 13 | 6 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | MG11 MG15 MG16 PI02 PI03 PI11 |
| | | | | 229009 | C | G | L3749V | 0,038 | 0,040 | 7 | 1 | | | MA02 MA03 MA04 MG19 PI04 PI08 PI09 | MA07 |
| | | | | 229222 | G | A | A3820T | 0,042 | 0,033 | 11 | 6 | | | MA01 MA02 MA04 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | MG11 MG13 MG17 MG18 PI03 PI11 |
| | | | | 229987 | A | G | T4075A | 0,016 | 0,018 | 6 | 0 | | | MA01 MG12 PI04 PI07 PI08 PI09 | --- |
| | | | | 231583 | A | G | T4607A | 0,247 | 0,042 | 14 | 9 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG18 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 232276 | C | T | R4838C | 0,091 | 0,049 | 12 | 5 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | MA07 MG11 MG17 MG18 PI01 |
| | | | | 232606 | G | C | V4948L | 0,005 | 0,002 | 10 | 1 | | | MA01 MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI08 PI10 | MG15 |
| | | | | 232651 | G | C | V4963L | 0,054 | 0,036 | 10 | 3 | | | MA01 MA03 MA04 MG12 MG14 MG19 PI04 PI08 PI09 PI10 | MG11 MG17 PI01 |
| | | | | 233476 | G | A | G5238S | 0,008 | 0,008 | 7 | 0 | | | MA01 MA03 MA05 MG12 MG19 PI04 PI08 | --- |
| | | | | 233872 | C | T | R5370C | 0,010 | 0,006 | 11 | 2 | | | MA01 MA02 MA03 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | MG17 PI12 |
| | | | | 234158 | T | G | L5465R | 0,029 | 0,050 | 5 | 0 | | | MA02 MA03 MG19 PI05 PI09 | --- |

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | SNP | | | | Chi ² p ^e | Perm. p ^f | SNP λ ^g | | | | Isolados+ para SNP ^h | |
|--------------|-----------------|---|----------------|-------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|--------------------|----|----------|----|--|--|
| | | | | Posição no genoma | R ^b | A ^c | AA ^d | | | por SNP | | por Gene | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | | |
| LinJ.35.0540 | 35 | proteophosphoglycan 5 | OG5_126579 | 236654 | G | A | A403T | 0,020 | 0,019 | 8 | 1 | 8 | 1 | MA02 MG14 MG19 PI04 PI05 PI07 PI08 PI10 | PI01 |
| LinJ.35.1990 | 35 | hypothetical protein, conserved | OG5_148991 | 785376 | C | A | T913K | 0,065 | 0,043 | 8 | 2 | 8 | 2 | MA02 MA03 MA04 MG12 MG19 PI04 PI05 PI09 | MG11 MG13 |
| LinJ.35.5080 | 35 | hypothetical protein, conserved | OG5_140622 | 1941935 | C | G | S585W | 0,000 | 0,002 | 4 | 10 | 4 | 10 | MG12 PI05 PI08 PI09 | MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 |
| LinJ.36.2520 | 36 | sterol 24-c-methyltransferase, putative | OG5_129172 | 958044 | A | G | I321V | 0,030 | 0,015 | 11 | 3 | 11 | 3 | MA03 MA04 MA05 MG12 MG14 MG19 PI04 PI05 PI08 PI09 PI10 | MG11 PI01 PI11 |
| LinJ.36.3370 | 36 | hypothetical protein, conserved | OG5_141788 | 1279929 | C | A | D356Y | 0,001 | 0,015 | 9 | 1 | 9 | 1 | MA01 MA02 MA03 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | PI12 |
| LinJ.36.7360 | 36 | hypothetical protein, conserved | OG5_146646 | 2670444 | G | A | R37W | 0,001 | 0,007 | 7 | 0 | 7 | 0 | MA02 MA05 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 | --- |

^a Cr, cromossomo.


^b R, nucleotídeo no genoma de referência, *L. (L.) infantum* JPCM5.

^c A, nucleotídeo alterado no genoma dos isolados de *L. (L.) chagasi*.

^d AA, alteração a nível de aminoácido devido à mutação no genoma.

^e Chi² p, p-valor obtido no teste estatístico Chi-quadrado.

^f Perm. p, p-valor obtido após o teste de permutação. Destacado em vermelho/negrito os valores de p < 0,01.

^g SNP λ, frequência de SNP nos grupos Cura (C, n=14) e Recidiva (R, n=12). 0  12 (R) ou 14 (C).

^h Isolados destacados em negrito apresentam mutação em todos os alelos (homozigoto) para o referido SNP.

OBS.: análise posterior do gene LinJ.31.2400 mostrou que este **NÃO** está presente em: 11 dos 12 isolados obtidos de pacientes que apresentaram falha terapêutica (presente apenas em PI12A); e em 3 dos 14 isolados obtidos de pacientes que apresentaram cura (MA04A, MG12A E MG19A). Assim, variações nesse gene para esses isolados podem ser atribuídas ao gene LinJ.31.2320, o qual é ortólogo do gene LinJ.31.2400.

Tabela 12 – Variações gênicas de InDels entre os isolados de *L. (L.) chagasi* dos grupos cura e recidiva.

| Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Grupo Ortólogo | InDels | | | | InDels λ ^g | | | | Isolados ⁺ para InDel ^h | | | |
|--------------|-----------------|--|-----------------------|-------------------|------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------------------|----------------------|------------|----|---|----|--|--|
| | | | | Posição no Genoma | EFF ^b | R ^c | A ^d | Chi ² p ^e | Perm. p ^f | por InDels | | | | por Gene | |
| | | | | | | | | | | C | R | C | R | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA |
| LinJ.12.0690 | 12 | surface antigen protein 2 precursor | OG5_161933 | 438509 | F_S | - | A | 0,030 | 0,047 | 7 | 10 | | | MA01 MA02 MA04 MA05 PI04 PI05 PI07 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI03 PI12 |
| | | | | 439295 | F_S | AGTGCCGCCAG GCGGCGCCAC T | - | 0,116 | 0,006 | 12 | 5 | | | MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MG12 PI04 PI05 PI07 PI08 PI09 PI10 | MG16 MG17 MG18 PI01 PI11 |
| LinJ.20.1720 | 20 | aminoacylase, putative, N-acyl-L-amino acid amidohydrolase, putative | OG5_127543 | 713455 | F_S | A | - | 0,115 | 0,036 | 7 | 11 | 7 | 11 | MA02 MA04 MG14 MG19 PI05 PI07 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.31.2400 | 31 | 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative | OG5_130243 | 1134439 | F_S | - | TCATGCA GAGCCA | 0,001 | 0,000 | 11 | 12 | | | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| | | | | 1134456 | F_S | - | CAGTTG CG | 0,000 | 0,000 | 11 | 12 | | | MA01 MA02 MA03 MA05 MG12 MG19 PI04 PI05 PI07 PI09 PI10 | MA07 MG11 MG13 MG15 MG16 MG17 MG18 PI01 PI02 PI03 PI11 PI12 |
| LinJ.34.1020 | 34 | amastin-like surface protein, putative | OG5_linf LinJ_34.1020 | 415894 | F_S | AG | - | 0,029 | 0,047 | 5 | 0 | 5 | 0 | MA02 MG14 PI04 PI07 PI08 | --- |

^a Cr, cromossomo.

^b Efeito gerado pela inserção/deleção. F_S, Frame-Shift.

^c R, nucleotídeos no genoma de referência, *L. (L.) infantum* JPCM5.

^d A, nucleotídeos inseridos/deletados no genoma dos isolados de *L. (L.) chagasi*.

^e Chi² p, p-valor obtido no teste estatístico Chi-quadrado.

^f Perm. p, p-valor obtido após o teste de permutação. Destacado em vermelho/negrito os valores de p < 0,01.

^g InDel λ, frequência de InDel nos grupos Cura (C, n=14) e Recidiva (R, n=12). 0  12 (R) ou 14 (C).

^h Isolados destacados em negrito apresentam mutação em todos os alelos (homozigoto) para o referido InDel.

OBS.: análise posterior do gene LinJ.31.2400 mostrou que este **NÃO** está presente em: 11 dos 12 isolados obtidos de pacientes que apresentaram falha terapêutica (presente apenas em PI12A); e em 3 dos 14 isolados obtidos de pacientes que apresentaram cura (MA04A, MG12A E MG19A). Assim, variações nesse gene para esses isolados podem ser atribuídas ao gene LinJ.31.2320, o qual é ortólogo do gene LinJ.31.2400.

Apesar da maioria das variações gênicas destacadas nessa análise estatística ter ocorrido de forma heterozigótica, algumas variações homozigóticas foram observadas. Dentre estas, podemos destacar as representadas por $p < 0,01$ identificadas predominantemente nos isolados do grupo cura (LinJ.13.0220 (*small Rab GTP binding protein*), LinJ.14.0290, LinJ.17.0270, LinJ.31.1270, LinJ.31.2050 e LinJ.36.7360 (proteínas hipotéticas)) ou nos isolados do grupo recidiva (LinJ.35.5080 (proteínas hipotética)).

Contudo, considerando os valores de cobertura obtidos no sequenciamento desses isolados, é preciso ter cautela na utilização dos resultados da análise de identificação de SNPs e InDels, principalmente para os genes localizados em cromossomos com ploidia maior que 2. Dessa forma, esses dados serão melhores explorados em trabalhos futuros.

3.2. VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS DE CROMOSSOMOS E GENES NOS ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

Além da diversidade genômica quanto a presença de SNPs e InDels, foi também avaliado a variação no número de cópias (CNV) de cromossomos e genes. Este tipo de variação representa uma classe de alteração na qual segmentos gênicos podem ser duplicados ou deletados.

Essa análise revelou diferenças no número de cópias de cromossomos entre os isolados analisados, mostrando variação no grau de aneuploidia e significativa plasticidade gênica do parasita *Leishmania* (Figura 16). Os resultados dessa análise mostram que, na população de *L. (L.) chagasi* analisada a maioria dos cromossomos são diploides, embora apenas 10 cromossomos apresentaram-se dissômicos em todos os isolados (LinJ.07, LinJ.15, LinJ.19, LinJ.22, LinJ.24, LinJ.27, LinJ.28, LinJ.29, LinJ.34 e LinJ.36). Cromossomos trissômicos também foram observados e o cromossomo 31, como tem sido reportado (Rogers *et al.*, 2011), apresentou-se tetrassômico na maioria dos isolados e pentassômico nos isolados PI01A, PI03A e MA04A. Contudo, baseado no número de cópias de cromossomos não foi possível identificar variações que segreguem os isolados dos grupos cura e recidiva (Figura 16).

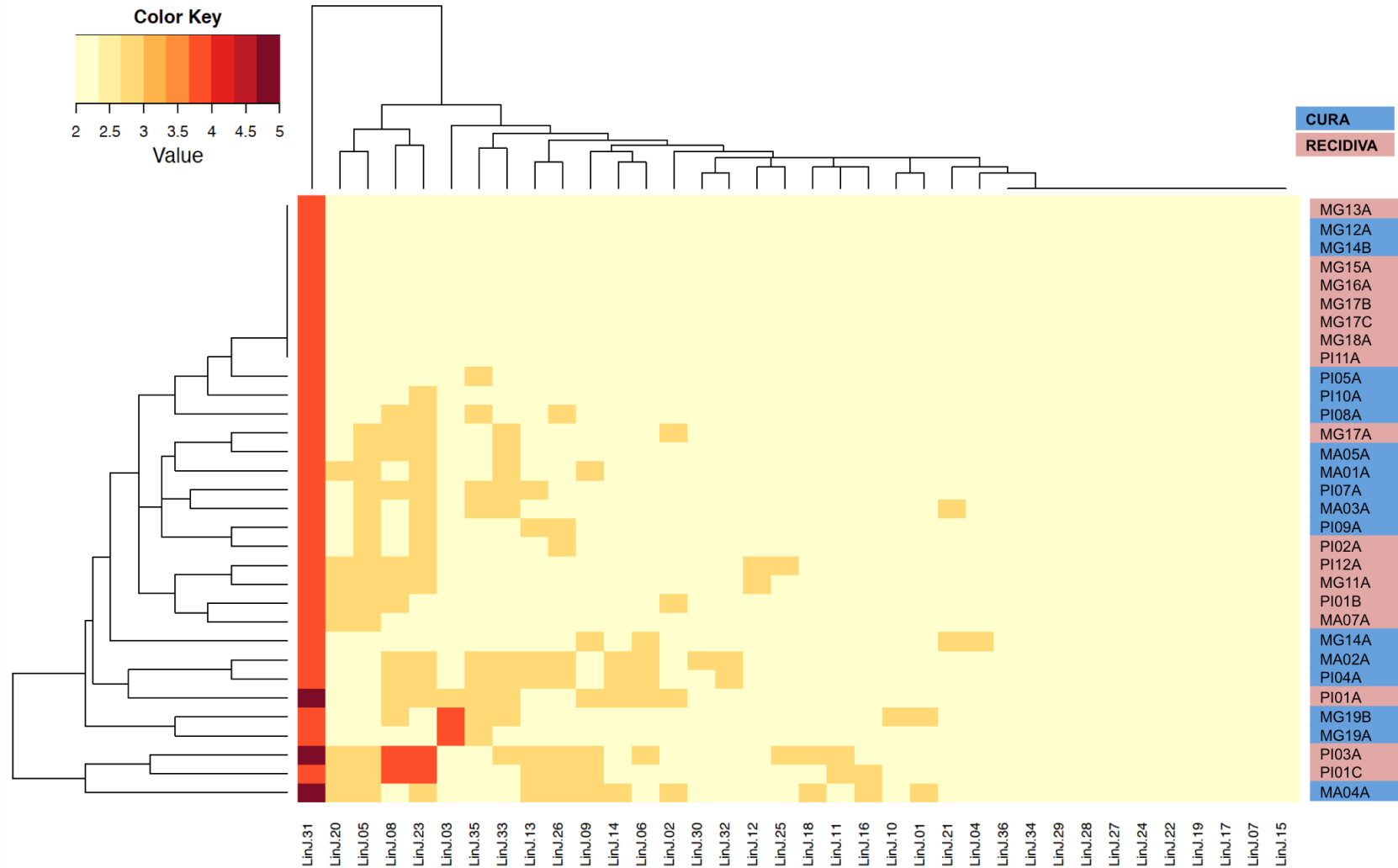


Figura 16 – Variação no número de cópias de cromossomos entre os isolados de *L. (L.) chagasi*. O heatmap mostra o status do número de cópias dos 36 cromossomos para os 32 isolados analisados como: dissômico (2, amarelo), trissômico (3, laranja), tetrassômico (4, vermelho) e pentassômico (5, vermelho escuro). A, antes do tratamento; B, depois do tratamento; e C, durante a falha terapêutica.

Os resultados da análise de variação do número de cópias de gene foi expresso pela dose gênica, a qual foi estimada considerando o valor da ploidia dos respectivos cromossomos. Essa análise mostrou que, o número de cópias de genes variou consideravelmente, evidenciando a ocorrência de duplicações e deleções gênicas nos isolados analisados (Tabelas 13, 14 e A1). É importante observar que os dados de CNV foram mantidos como valores não discretos, uma vez que os isolados clínicos não foram previamente clonados, podendo estes serem constituídos de uma população heterogênea de *L. (L.) chagasi*. As diferenças em termos de dose gênica entre os grupos cura e recidiva foram determinadas pelo teste estatístico Mann-Whitney. Essa análise foi realizada utilizando apenas os isolados obtidos antes do tratamento e mostrou diferença significativa ($p < 0,01$) em 93 grupos ortólogos (OG5), os quais correspondem a 100 genes. Desses, 24 OG5 (25 genes) apresentaram maior dose gênica e 69 OG5 (75 genes) apresentaram menor dose gênica nos isolados do grupo recidiva (Tabelas 13 e 14 e Figura 17).

Tabela 13 – Genes com número aumentado de cópias nos isolados de *L. (L.) chagasi* do grupo recidiva.

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Ref Hap. ^b | Média - Número de cópias de genes | | | Mediana - Número de cópias de genes | | | Mann-Whitney p ^d | Perm. p ^e |
|----------------|----------------------------|-----------------|---|-----------------------|-----------------------------------|----------------|------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | | | | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão R/C ^c | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão R/C ^c | | |
| OG5_148059 | LinJ.19.0630 | LinJ.19 | histone H3 variant, putative | 1 | 0,56 | 3,20 | 5,74 | 0,00 | 2,98 | --- | 0,012 | 0,009 |
| OG5_148814 | LinJ.28.0780 | LinJ.28 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,85 | 2,19 | 2,58 | 1,01 | 1,72 | 1,71 | 0,010 | 0,008 |
| OG5_142814 | LinJ.36.0220 | LinJ.36 | mitochondrial inner membrane signal peptidase, putative,serine peptidase clan SF, family S26B, putative | 1 | 1,40 | 2,29 | 1,64 | 1,27 | 2,19 | 1,73 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_146975 | LinJ.30.2560 | LinJ.30 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,50 | 2,19 | 1,45 | 1,56 | 2,27 | 1,46 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_129658 | LinJ.34.4360 | LinJ.00 | d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- like protein | 1 | 2,92 | 4,22 | 1,45 | 2,92 | 4,21 | 1,44 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_128569 | LinJ.25.0830 | LinJ.25 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,66 | 2,35 | 1,42 | 1,68 | 2,31 | 1,38 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_127106 | LinJ.25.2220, LinJ.25.2230 | LinJ.25 | succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative | 2 | 3,71 | 4,96 | 1,33 | 3,66 | 4,79 | 1,31 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_154422 | LinJ.34.0340 | LinJ.34 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,67 | 2,20 | 1,32 | 1,82 | 2,25 | 1,23 | 0,005 | 0,005 |
| OG5_148710 | LinJ.25.1620 | LinJ.25 | protein kinase, putative | 1 | 1,84 | 2,43 | 1,32 | 1,86 | 2,43 | 1,31 | 0,000 | 0,000 |
| OG5_143956 | LinJ.36.1080 | LinJ.36 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,63 | 2,14 | 1,32 | 1,61 | 2,10 | 1,30 | 0,003 | 0,002 |
| OG5_183564 | LinJ.12.0860 | LinJ.12 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,79 | 2,33 | 1,30 | 1,77 | 2,08 | 1,17 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_142238 | LinJ.29.2020 | LinJ.29 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,70 | 2,21 | 1,30 | 1,66 | 2,15 | 1,30 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_183806 | LinJ.29.0900 | LinJ.29 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,01 | 2,50 | 1,24 | 2,05 | 2,48 | 1,21 | 0,008 | 0,007 |
| OG5_184163 | LinJ.36.4550 | LinJ.36 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,71 | 2,11 | 1,24 | 1,74 | 2,10 | 1,20 | 0,006 | 0,004 |
| OG5_143937 | LinJ.30.3140 | LinJ.30 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,77 | 2,16 | 1,22 | 1,71 | 2,16 | 1,26 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_131535 | LinJ.12.0470 | LinJ.12 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,84 | 2,19 | 1,19 | 1,92 | 2,12 | 1,11 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_146332 | LinJ.36.6500 | LinJ.36 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,89 | 2,24 | 1,18 | 1,89 | 2,22 | 1,18 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_183818 | LinJ.29.1500 | LinJ.29 | RNA binding protein, putative | 1 | 1,95 | 2,31 | 1,18 | 1,95 | 2,34 | 1,20 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_183871 | LinJ.31.0050 | LinJ.31 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 3,46 | 4,04 | 1,17 | 3,39 | 4,01 | 1,18 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_148820 | LinJ.28.1580 | LinJ.28 | ATPase, putative | 1 | 1,82 | 2,13 | 1,17 | 1,73 | 2,08 | 1,20 | 0,009 | 0,007 |
| OG5_183298 | LinJ.11.0740 | LinJ.11 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,93 | 2,23 | 1,16 | 1,89 | 2,16 | 1,14 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_140412 | LinJ.31.3090 | LinJ.31 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,76 | 4,29 | 1,14 | 3,59 | 4,20 | 1,17 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_134931 | LinJ.34.2200 | LinJ.34 | DNAj-like protein | 1 | 1,92 | 2,17 | 1,13 | 1,89 | 2,12 | 1,13 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_144927 | LinJ.17.1410 | LinJ.17 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,87 | 2,05 | 1,10 | 1,83 | 2,00 | 1,09 | 0,008 | 0,008 |

^a Cr, cromossomo.

^b Ref Hap., número de cópias de gene, por grupo ortólogo, no genoma haploide de referência, *L. (L.) infantum* JPCM5.

^c R, grupo recidiva; C, grupo cura.

^d Mann-Whitney p, p-valor obtido após análise estatística.

^e Perm. p, p-valor obtido após análise de permutação.

OBS1.: Os valores de número de cópias de genes informados na tabela se referem a dose gênica (número de cópias de genes na célula haploide x ploidia do referido cromossomo).

OBS2.: A análise para mensurar o número de cópias de genes foi realizada por grupo ortólogo por cromossomo.

Tabela 14 – Genes com número aumentado de cópias nos isolados de *L. (L.) chagasi* do grupo cura.

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Ref Hap. ^b | Média - Número de cópias de genes | | | Mediana - Número de cópias de genes | | | Mann-Whitney p ^d | Perm. p ^e |
|----------------|----------------------------|-----------------|--|-----------------------|-----------------------------------|----------------|------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | | | | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão C/R ^c | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão C/R ^c | | |
| OG5_183927 | LinJ.31.2390 | LinJ.31 | helicase-like protein | 1 | 2,97 | 0,33 | 9,05 | 3,83 | 0,00 | --- | 0,001 | 0,001 |
| OG5_128720 | LinJ.31.2370, LinJ.31.2380 | LinJ.31 | 3'-nucleotidase/nuclease, putative, 3'-nucleotidase/nuclease precursor, putative | 2 | 5,38 | 0,72 | 7,49 | 6,21 | 0,00 | --- | 0,003 | 0,002 |
| OG5_127080 | LinJ.29.2970 | LinJ.29 | 40S ribosomal protein S19-like protein | 1 | 2,24 | 0,30 | 7,38 | 1,86 | 0,00 | --- | 0,011 | 0,009 |
| OG5_149005 | LinJ.35.2910 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,69 | 0,78 | 3,45 | 3,06 | 0,00 | --- | 0,007 | 0,006 |
| OG5_126659 | LinJ.06.0590, LinJ.06.0600 | LinJ.06 | 60S ribosomal protein L23a, putative | 2 | 4,96 | 2,07 | 2,39 | 4,17 | 2,31 | 1,81 | 0,007 | 0,005 |
| OG5_133169 | LinJ.34.3390 | LinJ.34 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,39 | 1,05 | 2,27 | 2,50 | 1,19 | 2,10 | 0,007 | 0,005 |
| OG5_148308 | LinJ.08.1110 | LinJ.08 | MIX protein, putative (MIX) | 1 | 3,06 | 1,72 | 1,78 | 2,86 | 1,28 | 2,23 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_184208 | LinJ.35.5210 | LinJ.35 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,91 | 1,68 | 1,73 | 2,54 | 1,79 | 1,41 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_126801 | LinJ.13.1420 | LinJ.13 | pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) | 1 | 2,57 | 1,52 | 1,69 | 2,70 | 1,52 | 1,78 | 0,003 | 0,002 |
| OG5_148611 | LinJ.21.1980 | LinJ.21 | mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative | 1 | 2,28 | 1,43 | 1,59 | 2,22 | 1,31 | 1,69 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_148031 | LinJ.04.0250 | LinJ.04 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,43 | 1,56 | 1,55 | 2,43 | 1,65 | 1,48 | 0,006 | 0,006 |
| OG5_138554 | LinJ.35.1570 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,83 | 1,21 | 1,51 | 1,83 | 1,22 | 1,50 | 0,004 | 0,005 |
| OG5_128075 | LinJ.35.1240 | LinJ.35 | short chain dehydrogenase, putative | 1 | 2,69 | 1,79 | 1,50 | 2,57 | 1,68 | 1,53 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_144877 | LinJ.10.1230 | LinJ.10 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,54 | 1,72 | 1,48 | 2,45 | 1,75 | 1,40 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_149014 | LinJ.35.3460 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,73 | 1,87 | 1,46 | 2,64 | 1,83 | 1,44 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_151830 | LinJ.35.3790 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,87 | 1,97 | 1,46 | 2,81 | 1,80 | 1,56 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_149000 | LinJ.35.2660 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,77 | 1,90 | 1,46 | 2,42 | 2,04 | 1,19 | 0,006 | 0,006 |
| OG5_126906 | LinJ.11.0040 | LinJ.11 | ATP-binding cassette protein subfamily H, member 1, putative (ABCH1) | 1 | 2,59 | 1,78 | 1,46 | 2,74 | 1,78 | 1,53 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_151705 | LinJ.27.0350 | LinJ.27 | MP44, putative | 1 | 1,82 | 1,26 | 1,45 | 1,86 | 1,28 | 1,45 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_149015 | LinJ.35.3540 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,60 | 1,82 | 1,43 | 2,47 | 1,66 | 1,49 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_175320 | LinJ.27.1270 | LinJ.27 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,40 | 1,69 | 1,42 | 2,58 | 1,73 | 1,49 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_128359 | LinJ.35.4780 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,53 | 1,81 | 1,39 | 2,49 | 1,77 | 1,40 | 0,004 | 0,003 |
| OG5_132180 | LinJ.35.2560 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,74 | 1,97 | 1,39 | 2,79 | 2,03 | 1,38 | 0,004 | 0,005 |
| OG5_127017 | LinJ.33.0410 | LinJ.33 | serine peptidase, putative, serine peptidase, Clan SC, Family S9D | 1 | 2,53 | 1,86 | 1,36 | 2,43 | 2,03 | 1,20 | 0,005 | 0,005 |
| OG5_131030 | LinJ.35.2060 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,73 | 2,01 | 1,36 | 2,58 | 2,03 | 1,27 | 0,005 | 0,004 |
| OG5_127563 | LinJ.13.1180 | LinJ.13 | XPA-interacting protein, putative | 1 | 2,40 | 1,76 | 1,36 | 2,18 | 1,51 | 1,45 | 0,009 | 0,008 |
| OG5_151824 | LinJ.35.2680 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,80 | 2,07 | 1,36 | 2,82 | 2,17 | 1,30 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_126852 | LinJ.35.0400, LinJ.35.0410 | LinJ.35 | 40S ribosomal protein S3A, putative | 2 | 5,46 | 4,06 | 1,34 | 5,03 | 3,71 | 1,35 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_130150 | LinJ.33.2350 | LinJ.33 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,77 | 2,07 | 1,34 | 2,60 | 1,98 | 1,31 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_145899 | LinJ.13.0890 | LinJ.13 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,62 | 1,99 | 1,32 | 2,61 | 1,78 | 1,47 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_126685 | LinJ.35.0030 | LinJ.35 | pyruvate kinase | 1 | 3,67 | 2,83 | 1,30 | 3,70 | 2,77 | 1,33 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_128567 | LinJ.35.4080 | LinJ.35 | ATP-dependent RNA helicase, putative | 1 | 2,50 | 1,94 | 1,29 | 2,52 | 1,92 | 1,31 | 0,008 | 0,008 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Ref Hap. ^b | Média - Número de cópias de genes | | | Mediana - Número de cópias de genes | | | Mann-Whitney p ^d | Perm. p ^e |
|----------------|--------------|-----------------|--|-----------------------|-----------------------------------|----------------|------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | | | | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão C/R ^c | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão C/R ^c | | |
| OG5_127223 | LinJ.24.2350 | LinJ.24 | notchless homolog, putative | 1 | 2,05 | 1,59 | 1,29 | 1,99 | 1,62 | 1,23 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_148385 | LinJ.13.1610 | LinJ.13 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,40 | 1,87 | 1,28 | 2,13 | 1,88 | 1,13 | 0,006 | 0,005 |
| OG5_129228 | LinJ.35.4730 | LinJ.35 | small nuclear RNA gene activation protein (SNAP) 50, putative | 1 | 2,57 | 2,00 | 1,28 | 2,61 | 2,13 | 1,23 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_148984 | LinJ.35.1550 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,74 | 2,14 | 1,28 | 2,61 | 2,14 | 1,22 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_147589 | LinJ.35.0200 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,58 | 2,02 | 1,28 | 2,58 | 1,92 | 1,35 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_126705 | LinJ.32.0970 | LinJ.32 | vacuolar proton-ATPase-like protein, putative | 1 | 2,09 | 1,64 | 1,28 | 2,01 | 1,60 | 1,26 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_128035 | LinJ.10.1030 | LinJ.10 | guanine nucleotide exchange factor subunit GCD7, translation initiation factor 2b, delta subunit, putative, eIF-2B GDP-GTP exchange factor, putative | 1 | 2,32 | 1,82 | 1,27 | 2,33 | 1,71 | 1,36 | 0,006 | 0,006 |
| OG5_236284 | LinJ.31.0860 | LinJ.31 | lipase | 1 | 4,89 | 3,88 | 1,26 | 5,11 | 3,65 | 1,40 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_184101 | LinJ.35.3170 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,44 | 1,93 | 1,26 | 2,44 | 1,87 | 1,31 | 0,009 | 0,007 |
| OG5_149013 | LinJ.35.3420 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,53 | 2,01 | 1,26 | 2,40 | 2,02 | 1,18 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_149007 | LinJ.35.2970 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,53 | 2,01 | 1,26 | 2,61 | 1,91 | 1,36 | 0,008 | 0,006 |
| OG5_127343 | LinJ.32.1060 | LinJ.32 | chaperonin containing t-complex protein, putative | 1 | 2,15 | 1,71 | 1,26 | 2,14 | 1,60 | 1,34 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_126856 | LinJ.35.4860 | LinJ.35 | AMP deaminase, putative | 1 | 2,41 | 1,92 | 1,26 | 2,24 | 1,85 | 1,21 | 0,005 | 0,005 |
| OG5_145033 | LinJ.35.2810 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,57 | 2,05 | 1,26 | 2,58 | 1,88 | 1,37 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_128776 | LinJ.36.6030 | LinJ.36 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,29 | 1,82 | 1,26 | 2,34 | 1,79 | 1,31 | 0,004 | 0,002 |
| OG5_146532 | LinJ.35.2370 | LinJ.35 | protein kinase, putative | 1 | 2,51 | 2,00 | 1,25 | 2,40 | 1,88 | 1,27 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_183432 | LinJ.30.1830 | LinJ.30 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,22 | 1,77 | 1,25 | 2,19 | 1,79 | 1,22 | 0,004 | 0,003 |
| OG5_148208 | LinJ.32.3690 | LinJ.32 | DEAD/DEAH box helicase, putative | 1 | 2,36 | 1,89 | 1,25 | 2,24 | 1,89 | 1,19 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_128001 | LinJ.35.1660 | LinJ.35 | mismatch repair protein PMS1, putative, mismatch repair protein | 1 | 2,70 | 2,19 | 1,24 | 2,63 | 2,12 | 1,24 | 0,006 | 0,006 |
| OG5_127643 | LinJ.35.2380 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,51 | 2,04 | 1,23 | 2,53 | 1,91 | 1,32 | 0,005 | 0,005 |
| OG5_157992 | LinJ.32.2610 | LinJ.32 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,54 | 2,07 | 1,23 | 2,49 | 2,14 | 1,16 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_147717 | LinJ.21.1480 | LinJ.21 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,31 | 1,90 | 1,22 | 2,18 | 1,87 | 1,16 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_183969 | LinJ.32.1840 | LinJ.32 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,39 | 1,96 | 1,22 | 2,36 | 1,91 | 1,24 | 0,008 | 0,007 |
| OG5_148000 | LinJ.01.0070 | LinJ.01 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,18 | 1,79 | 1,21 | 2,04 | 1,73 | 1,18 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_184083 | LinJ.35.1560 | LinJ.35 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,65 | 2,19 | 1,21 | 2,47 | 2,09 | 1,18 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_145063 | LinJ.21.0190 | LinJ.21 | protein kinase, putative, serine/threonine protein kinase, putative | 1 | 2,26 | 1,87 | 1,21 | 2,21 | 1,89 | 1,17 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_148411 | LinJ.14.1300 | LinJ.14 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,33 | 1,92 | 1,21 | 2,31 | 1,86 | 1,24 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_136877 | LinJ.21.1640 | LinJ.21 | palmitoyl acyltransferase 3, putative, zinc finger domain-like protein | 1 | 2,19 | 1,82 | 1,21 | 2,20 | 1,76 | 1,25 | 0,008 | 0,006 |
| OG5_148072 | LinJ.13.0210 | LinJ.13 | class 3 lipase, putative | 1 | 2,50 | 2,09 | 1,20 | 2,57 | 2,00 | 1,28 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_130284 | LinJ.15.1070 | LinJ.15 | glutamate dehydrogenase (GDH) | 1 | 2,22 | 1,86 | 1,20 | 2,23 | 1,87 | 1,19 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_126891 | LinJ.30.2180 | LinJ.30 | RING finger protein, putative | 1 | 2,19 | 1,84 | 1,19 | 2,14 | 1,78 | 1,20 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_148529 | LinJ.34.1430 | LinJ.34 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,32 | 1,97 | 1,18 | 2,34 | 1,92 | 1,22 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_146117 | LinJ.36.5560 | LinJ.36 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,10 | 1,79 | 1,18 | 2,10 | 1,77 | 1,18 | 0,003 | 0,002 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Cr ^a | Produto gênico | Ref Hap. ^b | Média - Número de cópias de genes | | | Mediana - Número de cópias de genes | | | Mann-Whitney p ^d | Perm. p ^e |
|----------------|---|-----------------|--|-----------------------|-----------------------------------|----------------|------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | | | | | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão C/R ^c | Grupo CURA | Grupo RECIDIVA | Razão C/R ^c | | |
| OG5_184157 | LinJ.36.4130 | LinJ.36 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,16 | 1,83 | 1,18 | 2,19 | 1,88 | 1,16 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_183977 | LinJ.32.2190 | LinJ.32 | ABC transporter-like protein | 1 | 2,31 | 1,99 | 1,16 | 2,30 | 2,00 | 1,15 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_126744 | LinJ.30.2470, LinJ.30.2480, LinJ.30.2530, LinJ.30.2540 | LinJ.30 | heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative | 4 | 7,79 | 6,83 | 1,14 | 7,56 | 6,75 | 1,12 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_171427 | LinJ.01.0840 | LinJ.01 | potassium channel subunit-like protein | 1 | 1,96 | 1,75 | 1,12 | 1,93 | 1,74 | 1,11 | 0,008 | 0,008 |

^a Cr, cromossomo.

^b Ref Hap., número de cópias de gene, por grupo ortólogo, no genoma haploide de referência, *L. (L.) infantum* JPCM5.

^c R, grupo recidiva; C, grupo cura.

^d Mann-Whitney p, p-valor obtido após análise estatística.

^e Perm. p, p-valor obtido após análise de permutação.

OBS1.: Os valores de número de cópias de genes informados na tabela se referem a dose gênica (número de cópias de genes na célula haploide x ploidia do referido cromossomo).

OBS2.: A análise para mensurar o número de cópias de genes foi realizada por grupo ortólogo por cromossomo.

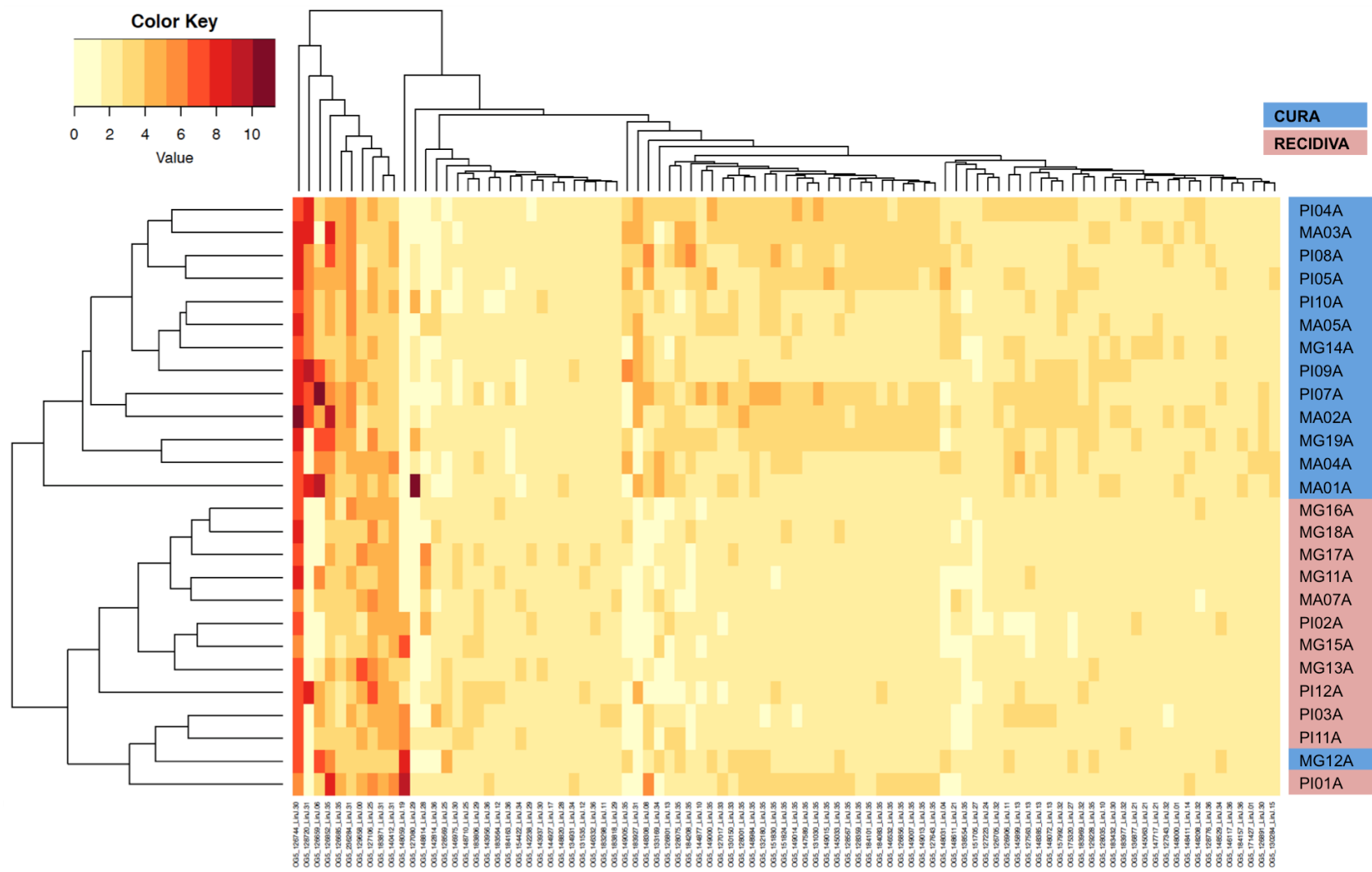


Figura 17 – Visualização da variação no número de cópias de genes entre os isolados de *L. (L.) chagasi*. Heatmap obtido a partir dos dados da análise estatística prévia (Mann-Whitney), a qual destacou genes/grupo ortólogos com números de cópias diferentes entre os grupos cura e recidiva ($p < 0,01$). Escala normalizada por coluna.

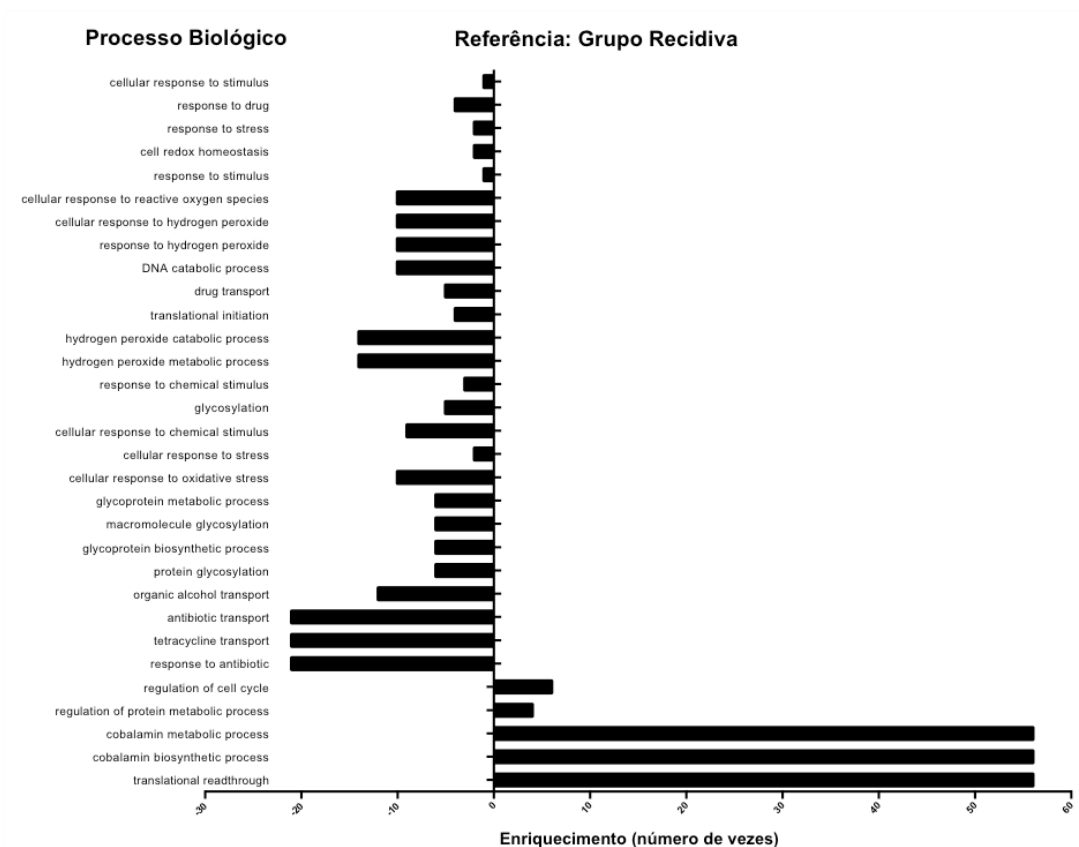
A tabela A1 mostra os dados da análise de variação do número de cópias de gene (dose gênica), por isolado clínico, que variaram entre os grupos cura e recidiva com nível de significância $\alpha < 0,05$. Esses dados foram utilizados para destacar os processos biológicos e vias metabólicas possivelmente enriquecidos nos grupos cura e recidiva. Essa análise, ao contrário dos dados proteômicos, mostrou que: (i) processos biológicos envolvidos na homeostase do sistema redox estão enriquecidos nos isolados do grupo cura; (ii) e que processos de metabolismo de aminoácidos estão enriquecidos apenas no grupo cura (metabolismo da arginina, prolina, D-glutamina, D-glutamato, alanina, aspartato e glutamato). Além disso, essa análise destacou o enriquecimento das vias metabólicas de éter-lipídios e glicerofosfolipídeos e de vias energéticas nos isolados do grupo recidiva (Figura 18).

Considerando que um aumento no número de cópias de genes pode levar a um aumento na expressão gênica e conseqüentemente no conteúdo proteico, os dados de CNV dos respectivos genes das proteínas que apresentaram regulação diferenciada entre os isolados do grupo cura (MG14A) e do grupo recidiva (MG11A), na abordagem proteômica, foram correlacionados.

Dentre as proteínas diferencialmente expressas destacadas na análise proteômica, apenas o gene da proteína *pyrroline-5-carboxylate reductase* apresentou diferença significativa de CNV entre os grupos cura e recidiva, porém o número de cópias de genes encontrado foi inversamente proporcional à expressão proteica. Entretanto, quando a análise de CNV é realizada apenas entre os isolados utilizados na análise proteômica (MG11A e MG14A) é possível observar uma correlação positiva entre as duas abordagens, indicando que possivelmente os isolados analisados na abordagem proteômica não são representativos dos grupos cura e recidiva para a expressão desse produto gênico.

A variação da dose gênica entre os isolados MG11A e MG14A também mostrou correlação positiva com a expressão proteica dos seguintes produtos: *activated protein kinase c receptor*, *chaperonin Hsp60*, *ATPase beta subunit*, *GDP-mannose pyrophosphorylase*, *RNA helicase*, *mitochondrial peroxiredoxin*, *stress-induced protein sti1*, *actin* e uma proteína hipotética (OG5_148242), totalizando 50% de produtos positivamente correlacionados. Já a expressão das proteínas *ribonucleoprotein p18*, *proliferative cell nuclear antigen* e de duas proteínas hipotéticas (OG5_145290 e OG5_150350) apresentaram correlação inversa com a dose gênica (18,2%) e os demais genes (31,8%) não apresentaram variação, mostrando que provavelmente a expressão dessas proteínas é regulada a nível pós-transcricional e/ou pós-traducional.

(a)



(b)

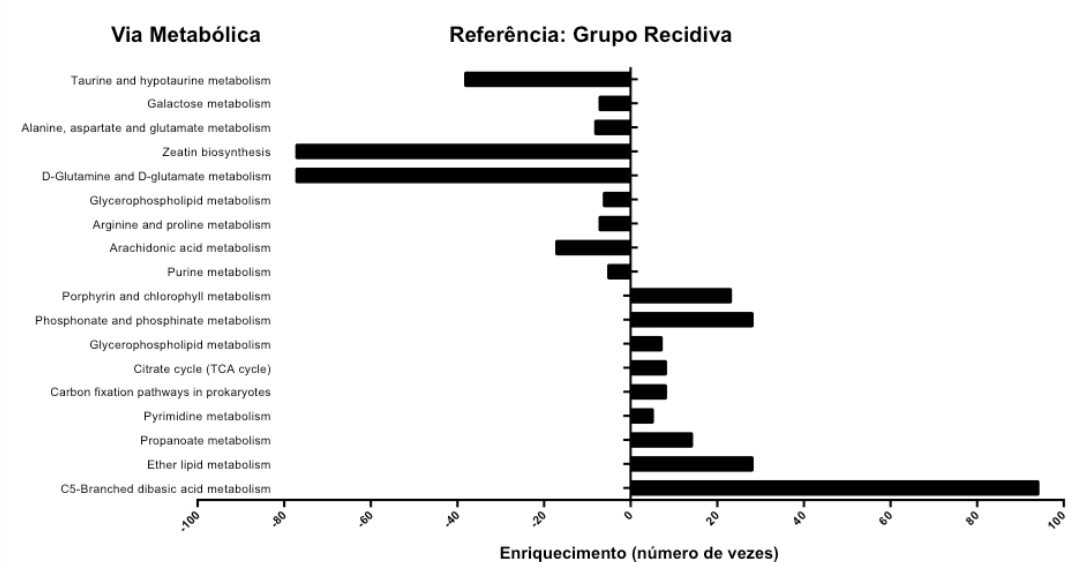


Figura 18 – Análise de enriquecimento. Processos biológicos (a) e vias metabólicas (b) que apresentaram significativa diferença entre os isolados dos grupos cura e recidiva, baseado na variação do número de cópias de genes (dose gênica). As análises de enriquecimento foram realizadas no site do TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), baseada nas anotações de processos biológicos do Gene Ontology e nas anotações de vias metabólicas do KEGG. Representação gráfica em referência ao grupo recidiva.

Tabela 15 – Correlação entre os dados das análises de CNV de genes e proteômica.

| Gene ID | Produto gênico | orthomclID ^a | GI ^b | Dose gênica | | | | | | Expressão proteica ^c | |
|--|---|-------------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------|---------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|
| | | | | Análise por grupo | | | Análise com os isolados da proteômica | | | C/R (MG14A/MG11A) | C/R (MG14A/MG11A) |
| | | | | Grupo Cura (C) | Grupo Recidiva (R) | Grupo C/R | MG14A (Cura) | MG11A (Recidiva) | C/R (MG14A/MG11A) | | |
| LinJ.28.2940 LinJ.28.2970 | Activated protein kinase c receptor (LACK) | OG5_127516 | 321398491 | 3,82 | 4,01 | 0,96 | 1,56 | 4,95 | 0,32 ↓ | ↓ | |
| LinJ.36.2130 LinJ.36.2140 | Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor | OG5_126788 | 134074164 | 4,11 | 4,23 | 0,97 | 3,22 | 4,94 | 0,65 ↓ | ↓ | |
| LinJ.04.0570 | Spermidine synthase (SPDSYN) | OG5_127074 | 134066976 | 2,35 | 2,15 | 1,09 | 3,15 | 3,15 | 1,00 | | |
| LinJ.13.1420 | Pyrroline-5-carboxylate reductase | OG5_126801 | 321399182 | 2,57 | 1,52 | 1,69 ↑ | 1,18 | 1,74 | 0,68 ↓ | ↓ | |
| LinJ.25.1210 | ATPase beta subunit | OG5_127099 | 134070254 | 3,03 | 3,75 | 0,81 | 2,90 | 3,92 | 0,74 ↓ | ↓ | |
| LinJ.23.0410 | NADP-dependent alcohol dehydrogenase | OG5_126661 | 134069817 | 2,88 | 2,57 | 1,12 | 1,62 | 3,12 | 0,52 ↓ | ↓ | |
| LinJ.25.2090 | 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | OG5_131052 | 134070342 | 1,70 | 2,54 | 0,67 ↓ | 1,63 | 1,96 | 0,83 | ↓ / ↑ | |
| LinJ.23.0120 | GDP-mannose pyrophosphorylase | OG5_127109 | 134069789 | 2,64 | 2,48 | 1,06 | 1,36 | 2,18 | 0,62 ↓ | ↓ | |
| LinJ.26.1550 | Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 | OG5_127067 | 134070535 | 2,48 | 2,30 | 1,08 | 2,43 | 2,53 | 0,96 | ↑ | |
| LinJ.36.1490 | Translation elongation factor 1-beta | OG5_127390 | 134074101 | 3,97 | 4,10 | 0,97 | 3,65 | 3,55 | 1,03 | ↓ | |
| LinJ.21.1820 | RNA helicase | OG5_127438 | 134069547 | 2,17 | 1,73 | 1,25 ↑ | 2,56 | 1,60 | 1,60 ↑ | ↑ | |
| LinJ.23.0050 | Mitochondrial peroxiredoxin | OG5_126593 | 16751316 | 2,04 | 1,85 | 1,11 | 1,84 | 2,58 | 0,71 ↓ | ↓ | |
| LinJ.08.1020 | Stress-induced protein sti1 | OG5_128289 | 134067520 | 2,27 | 2,34 | 0,97 | 2,02 | 2,82 | 0,72 ↓ | ↓ | |
| LinJ.15.1100 LinJ.15.1140 LinJ.15.1120 | Cytosolic peroxiredoxin | OG5_126593 | 16751318 | 6,15 | 5,45 | 1,13 | 6,20 | 5,62 | 1,10 | ↓ | |
| LinJ.26.2290 | Nitrilase | OG5_126651 | 134070599 | 1,97 | 1,99 | 0,99 | 1,47 | 1,30 | 1,13 | ↑ | |
| LinJ.30.3560 LinJ.30.3580 | S-adenosylmethionine synthetase | OG5_126734 | 321398550 | 3,92 | 3,72 | 1,05 | 4,66 | 4,01 | 1,16 | ↑ | |
| LinJ.04.1250 | Actin | OG5_126595 | 134067044 | 1,93 | 1,71 | 1,13 | 2,87 | 1,50 | 1,91 ↑ | ↑ | |
| LinJ.15.0320 LinJ.15.0330 | Ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor | OG5_142220 | 134068463 | 3,97 | 3,97 | 1,00 | 4,58 | 3,53 | 1,30 ↑ | ↓ | |
| LinJ.30.3130 | Conserved hypothetical protein / RNA-binding protein 42 | OG5_145290 | 134071523 | 1,96 | 1,82 | 1,07 | 1,63 | 1,24 | 1,31 ↑ | ↓ | |
| LinJ.36.7070 | Conserved hypothetical protein | OG5_150350 | 134073755 | 2,21 | 2,02 | 1,09 | 3,03 | 2,03 | 1,49 ↑ | ↓ | |
| LinJ.15.1500 | Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) | OG5_127352 | 134068565 | 1,66 | 1,57 | 1,05 | 1,49 | 0,92 | 1,62 ↑ | ↓ | |
| LinJ.04.0400 | Conserved hypothetical protein | OG5_148242 | 134066959 | 2,34 | 2,13 | 1,10 | 3,59 | 1,19 | 3,02 ↑ | ↑ | |

^a orthomclID, ID do grupo ortólogo

^b Número de Acesso correspondente ao banco de dados de *L. (L.) infantum* de acordo com NCBI.

^c A expressão proteica foi apresentada apenas como aumentada (↑) ou reduzida (↓) em relação ao isolado de *L. (L.) chagasi* MG14A, do grupo cura, uma vez que em alguns casos o mesmo produto gênico foi encontrado em diferentes *spot* proteicos. Setas verdes (↓/↑) e vermelhas (↓/↑) indicam correlação positiva e negativa entre os dados das abordagens genômica e proteômica, respectivamente.

OBS.1: Foi considerado diferença na dose de gene entre C e R quando esta foi ≥ 20%.

OBS.2: A variação no número de cópias do gene LinJ.13.1420 (destacado em negrito) entre os grupos cura e recidiva apresentou diferença significativa na análise de CNV (Tabela A1).

A análise de CNV também destacou uma diferença relevante entre os grupos cura e recidiva baseado na presença dos genes *in tandem* LinJ.31.2370 (*3'-nucleotidase/nuclease, putative*), LinJ.31.2380 (*3'-nucleotidase/nuclease, putative*) e LinJ.31.2390 (*helicase-like protein*), uma vez que que esses estão presentes em 11 dos 14 isolados do grupo cura e ausentes em 11 dos 12 isolados do grupo recidiva. A cobertura na região do cromossomo 31 relativa a esses três genes demonstrou a ausência de um quarto gene *in tandem* a esses, LinJ.31.2400 (*3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative*), que também estava ausentes em 11 dos 12 isolados do grupo recidiva (Figura 19). Essa diferença na presença do gene LinJ.31.2400 entre os isolados, não foi inicialmente detectada pelo fato da análise de CNV ter sido realizada por grupo ortólogo/por cromossomo e o referido gene ser ortólogo do gene LinJ.31.2320.

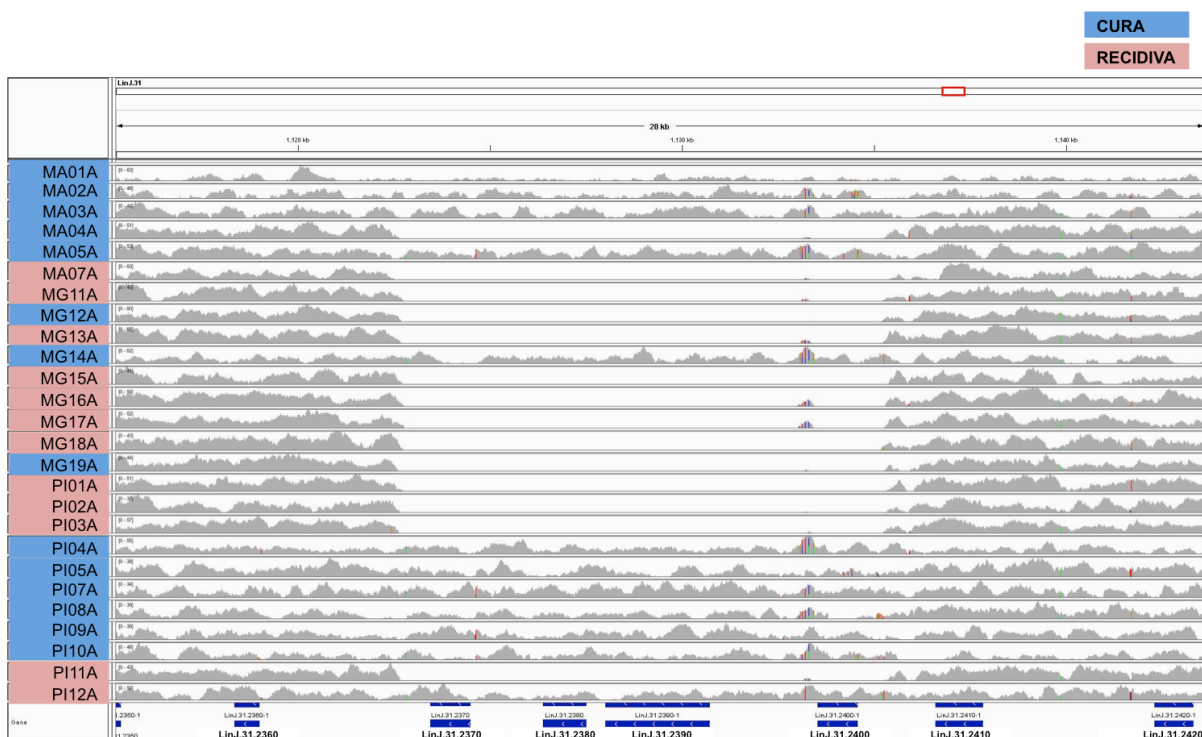


Figura 19 – Cobertura de sequenciamento dos isolados de *L. (L.) chagasi*. Região do cromossomo 31 que contém os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. Estão apresentados apenas os dados dos isolados obtidos antes do tratamento. Imagem obtida no *software* Integrative Genomics Viewer (IGV, v.2.3.40).

Para investigar se essa diferença qualitativa predita na análise de CNV era de fato verdadeira, a mesma foi validada por meio de reações de PCR para verificar a presença dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 nos isolados clínicos. Os resultados das reações de PCR de cada gene individual apresentou perfeita correlação com os dados da bioinformática. Contudo, os resultados da reação de PCR, capaz de simultaneamente detectar a presença dos quatro genes *in tandem*, assim como a ausência deles, mostrou que sete dos 12 isolados do grupo cura (MA02A, MA05A, PI04A, PI05A, PI08A, PI09A e PI10A) apresentam um perfil gênico heterogêneo para essa região (Figura 20). Considerando que essa observação pode representar casos de heterozigose ou de população heterogênea ou ambos, esses sete isolados clínicos, assim como outros três (MA01A, MG11A e MG14A) utilizados como controles para presença ou ausência desses quatro genes, foram clonados e posteriormente genotipados para essa região.

Os resultados da genotipagem dos clones obtidos dos isolados acima referidos mostraram que os isolados controles para a presença ou ausência dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 apresentam um genótipo único para essa região, enquanto que os isolados com genótipo misto são compostos de uma população heterogênea (Figura 21).

Para verificar a eficácia do processo de clonagem, dois casos de possíveis heterozigotos (PI05A-C13 e PI08A-C7) foram reclonados. O resultado da genotipagem mostrou que esses na verdade consistiam de uma população heterogênea e não clones (Figura 21). Dessa forma, nenhum caso de heterozigoto verdadeiro foi encontrado no presente estudo e, para definir os demais casos de possíveis heterozigotos é preciso recloná-los. Além disso, foi possível observar que a frequência de clones que não possuem esses quatro genes é inferior à dos clones que os possuem (em alguns casos sequer foi possível encontrar clones que não possuem esses genes), o que pode indicar uma diferença de crescimento entre eles.

A genotipagem dos clones também mostrou que para muitos dos clones foi possível observar um produto de PCR de baixa intensidade com tamanho próximo de 1,2 kb (referente ao produto de PCR relacionado com a perda do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400). Para descartar a possibilidade de *background* da reação de PCR esse produto foi ligado ao pGEM T easy vector e após clonagem foi sequenciado. Os dados do sequenciamento mostraram que de fato o produto corresponde ao fragmento de ~1,2 kb se refere à perda do locus contendo esses quatro genes. Dessa forma, é possível inferir que um baixo nível de recombinação está provavelmente ocorrendo.

Para os isolados clínicos obtidos após o tratamento com miltefosina e durante a falha terapêutica foi observado que, a região do genoma referente aos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 se mantém inalterada após a pressão da droga, exceto para o isolado PI01. Neste caso os isolados obtidos antes (PI01A) e após (PI01B) o tratamento não apresentaram os referidos genes, enquanto que o isolado obtido durante a recidiva (PI01C) os apresentou (Figura 20), sugerindo um possível caso de reinfecção. Contudo é preciso considerar a possibilidade de troca de amostras.

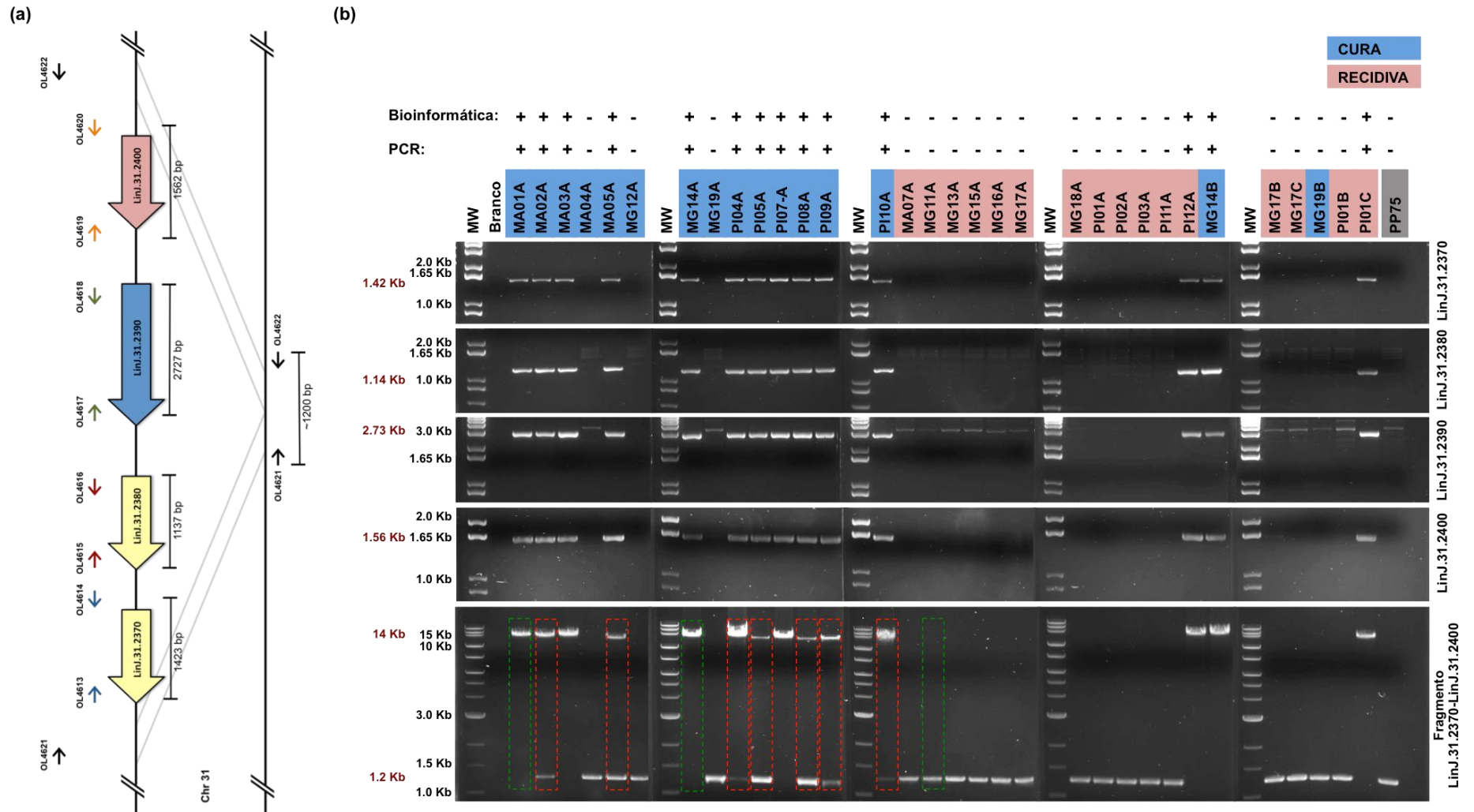


Figura 20 – Validação dos dados de CNV da análise de bioinformática. (a) Estratégias de PCR utilizadas para verificar a presença dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400, individualmente ou simultaneamente. (b) Resultados das reações de PCR apresentadas em “a”. Os retângulos pontilhados em vermelho destacam os isolados do grupo cura que apresentaram perfil gênico heterogêneo para a presença desses genes e foram subsequentemente clonados. Os retângulos pontilhados em verde destacam os isolados selecionados como controles no processo de clonagem.

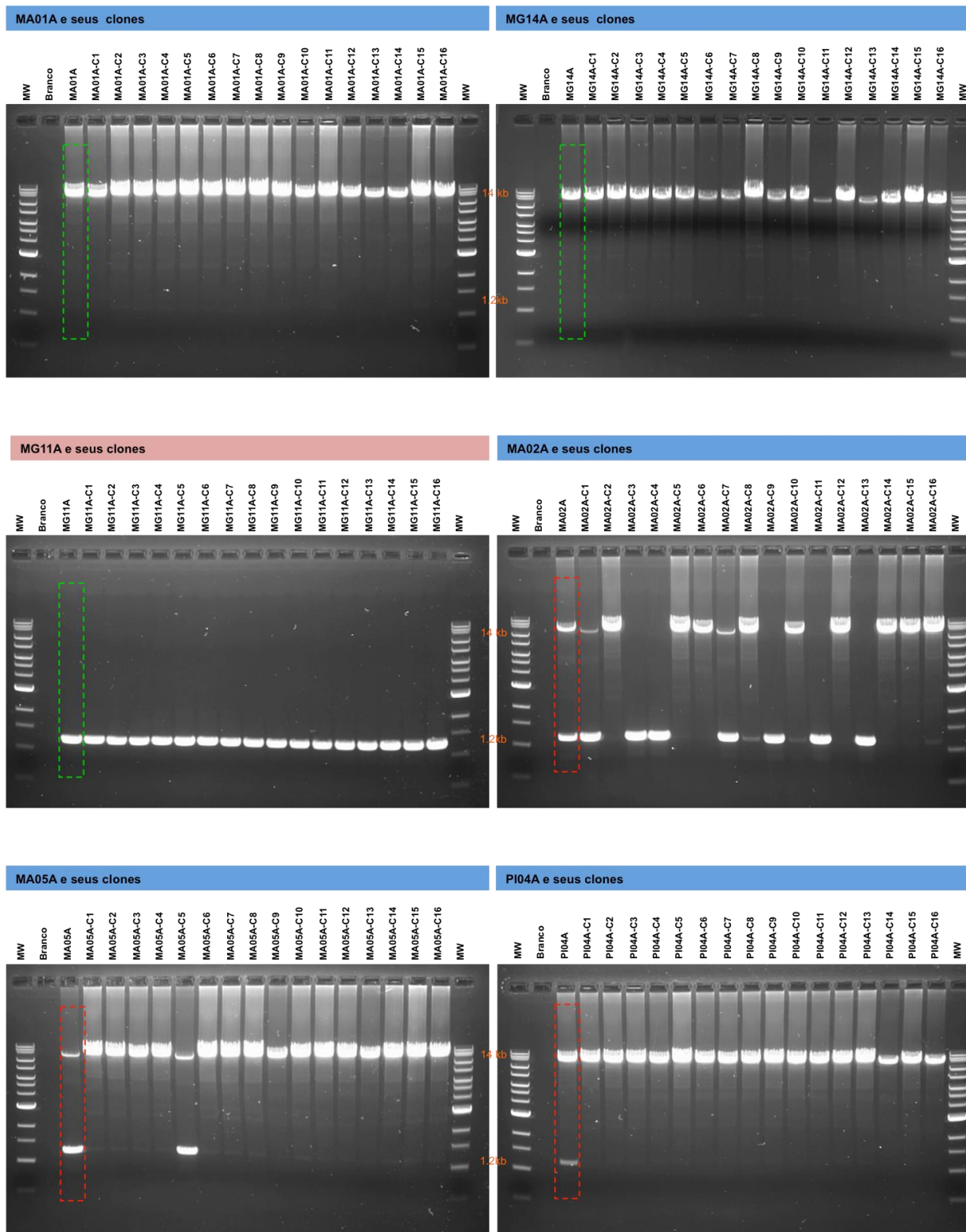


Figura 21 – Continuação na próxima página.

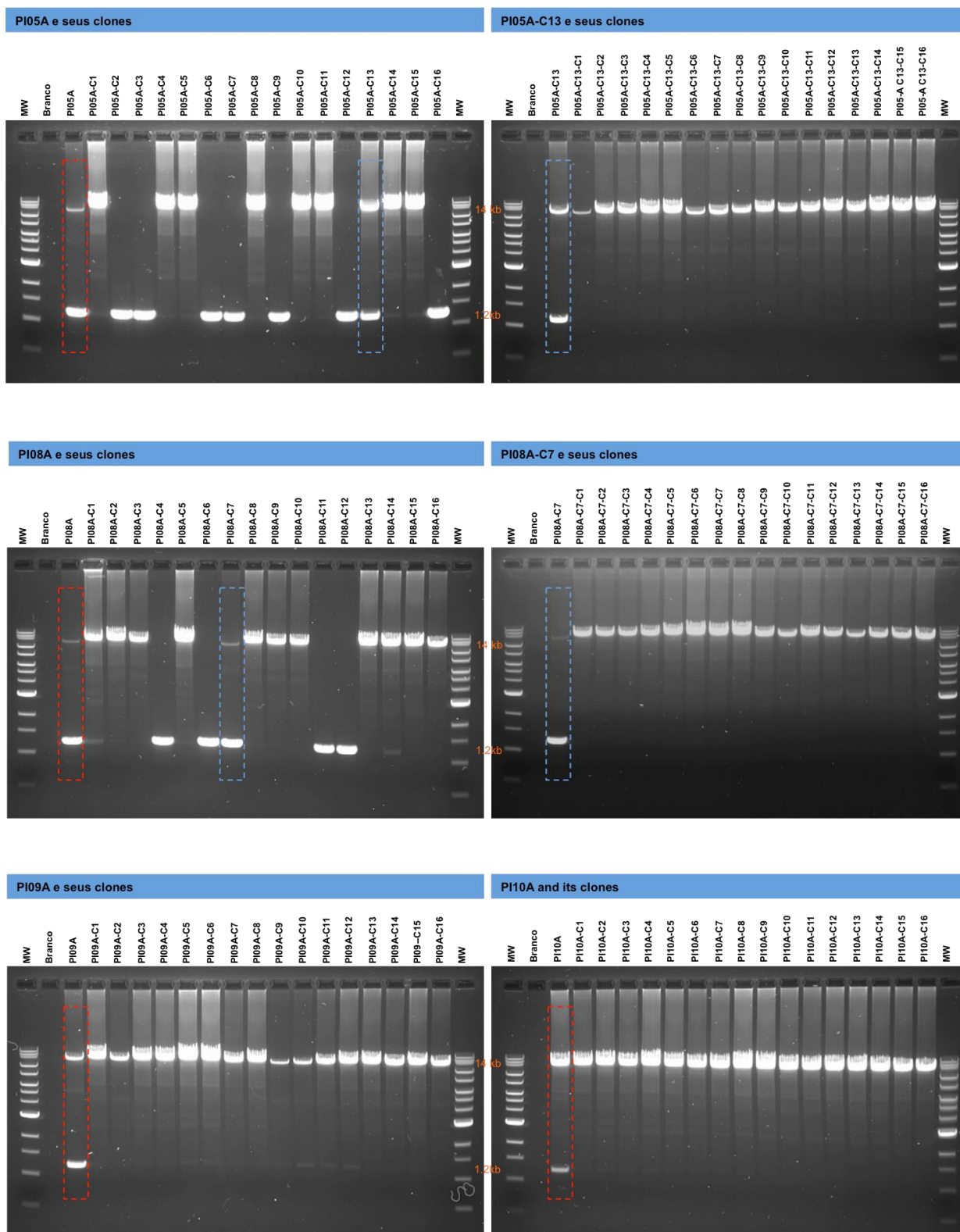


Figura 21 – Genotipagem dos clones obtidos dos isolados de *L. (L.) chagasi* para a região do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. As amostras destacadas com retângulos verde e vermelho representam os isolados utilizados como controles, para a presença ou ausência dos genes, e os isolados que apresentaram genótipo heterogêneo, respectivamente. Os retângulos azul indicam os clones recloneados. Os clones estão identificados pelas ID dos respectivos isolados seguido das ID de clonagem (C1-C16). Reação de PCR realizada de acordo com o ID 7 da tabela 5. Produtos de PCR separados em gel de agarose-TAE 0,6%. **Isolado do grupo cura; e **Isolado do grupo recidiva**.**

3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES OBTIDOS DOS ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

As formas promastigotas dos clones obtidos dos isolados PI05A e PI08A, do grupo cura, com diferentes genótipos em relação à presença do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 foram caracterizadas quanto: capacidade de crescimento em meio LIT suplementado com 10% SFBi e 2% de urina; e susceptibilidade *in vitro* à miltefosina.

Os resultados da avaliação da capacidade de crescimento em cultura mostraram que o clone PI05A-C1, que possui os quatro genes *in tandem*, apresentou uma maior taxa de crescimento quando comparado ao clone que não possui esses genes (PI05A-C2), mas inferior à taxa de crescimento do isolado clínico (PI05A) e da população heterogênea purificada (PI05A-C13) desse isolado. Contudo, o mesmo perfil de crescimento não foi observado entre os clones e a população heterogênea obtidas do isolado PI08A (Figura 22 – a/b.1 e a/b.3). Esses dados sugerem que os clones obtidos de isolados clínicos podem diferir em outros aspectos não avaliados neste estudo, e que a presença desses genes podem não estar diretamente relacionada com a capacidade de crescimento das formas promastigotas em cultura.

A análise de susceptibilidade *in vitro* das formas promastigotas dos isolados clínicos e seus respectivos clones mostrou que: os clones que possuem os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 (PI05A-C1, IC₅₀ 8,24 µM; e PI08A-C3, IC₅₀ 32,38 µM) são significativamente menos susceptível à miltefosina em relação aos clones que não possuem esses genes (PI05A-C2, IC₅₀ 1,43 µM; e PI08A-C4, IC₅₀ 3,46 µM) e aos isolados clínicos de origem (PI05A, IC₅₀ 4,82 µM; e PI08A, IC₅₀ 5,11 µM) (Figura 22 – a/b.1 e a/b.2). Esses dados vão de encontro à associação prévia entre a presença desses genes e o desfecho clínico de cura e demonstram que o fenótipo do isolado clínico não necessariamente corresponde ao fenótipo dos clones encontrados em maioria na população (PI05A e PI08A: 53,3% e 69,2% de clones que possuem o locus contendo os quatro genes, respectivamente). Contudo, é ainda preciso analisar a susceptibilidade *in vitro* desses clones à miltefosina na forma amastigota, a qual previamente exibiu uma correlação mais evidente com a resposta clínica apresentada pelos pacientes com LV.

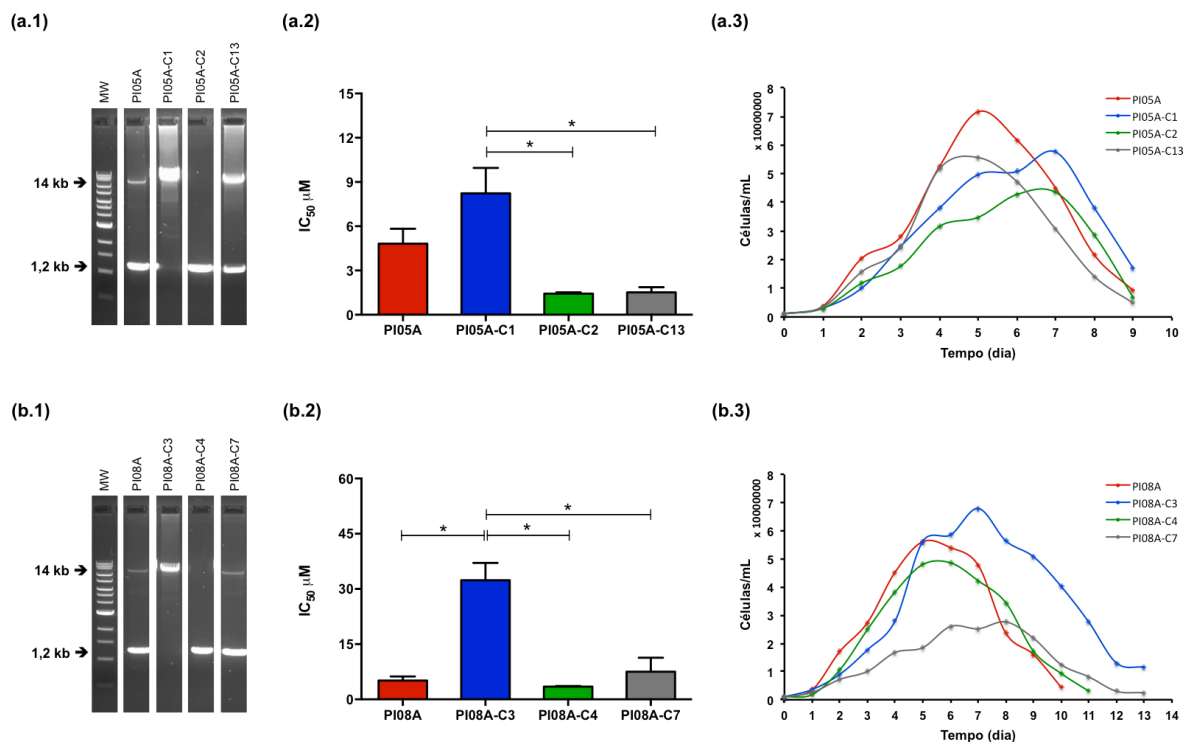


Figura 22 – Caracterização de clones obtidos de isolados clínicos de *L. (L.) chagasi*. (a) Isolado PI05A e dois clones (C1 e C2) e uma população mista (C13) obtidos deste. (b) Isolado PI08A e dois clones (C3 e C4) e uma população mista (C7) obtidos deste. a/b.1 – gel de agarose com os produtos de PCR referentes à reação ID 7, mostrando a presença (14 kb) ou não (1,2 kb) do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. a/b.2 – Susceptibilidade *in vitro* à miltefosina das formas promastigotas (* destaca diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados). a/b.3 – Curvas de crescimento em meio LIT suplementado com 10% de SFBi e 2% de urina.

3.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REEXPRESSIONÃO DOS GENES LINJ.31.2370, LINJ.31.2380, LINJ.31.2390 E LINJ.31.2400 NO FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA EM *L. (L.) chagasi*

Construções individuais contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 ou LinJ.31.2240 foram obtidas conforme descrito no item 6.6 e estão esquematizadas na figura 23. O vetor sem inserto também foi linearizado e transfectado e utilizado como controle nos ensaios de susceptibilidade *in vitro*. A integração dessas construções linearizadas (PacI/PmeI) no isolado MG11A foi verificada por reação de PCR (utilizando o *primer* Fw localizado no locus ribossomal e o *primer* Rv localizado na ORF do gene clonado na construção), a qual mostrou que todos os clones selecionados integraram as construções no locus ribossomal (Figura 23).

A expressão proteica correspondente aos genes reexpressos na estratégia *Tagged* foi verificada por *western blotting*, o qual mostrou que os genes transfectados, LinJ.31.2380-HA e LinJ.31.2390-Ty estão sendo transcritos e traduzidos (Figura 23). O *western blotting* para as proteínas fusionadas à Tag Ty apresentou reação inespecífica de alta intensidade com proteínas na região correspondente a 40 kDa (dados não mostrados), impossibilitando a verificação do produto gênico de LinJ.31.2370-Ty (39,1 kDa). Além disso, não foi possível visualizar a expressão do produto gênico de LinJ.31.2400-HA nas condições utilizadas. Dessa forma, melhores condições serão estabelecidas para verificar os produtos da reexpressão dos genes LinJ.31.2370-Ty e LinJ.31.2400-HA transfectados.

A análise da capacidade de crescimento em meio LIT, suplementado com 10% SFBi e 2% de urina, das formas promastigotas dos clones transfectados mostrou que: (i) os clones reexpressando o gene LinJ.31.2370, nas versões *Tagged* e *Untagged*, apresentaram, respectivamente, uma taxa de crescimento celular semelhante e discretamente menor em relação ao clone MG11A + pGL631 e, ambos exibiram densidade celular discretamente superior em relação à este controle; (ii) os clones reexpressando os genes LinJ.31.2380 (*Tagged* e *Untagged*) exibiram perfis de crescimento semelhantes ao clone MG11A + pGL631; (iii) os clones reexpressando os genes LinJ.31.2390 (*Tagged* e *Untagged*) apresentaram taxa de crescimento semelhante ao clone MG11A + pGL631, contudo a versão *Tagged* apresentou densidade celular um pouco inferior em relação aos clones MG11A + pGL631 e MG11A + pGL631-LinJ.31.2390; (iv) e o clone reexpressando o gene LinJ.31.2400-HA apresentou menor taxa de crescimento e densidade celular em relação ao clone MG11A + pGL631, enquanto que a versão *Untagged* exibiu taxa de crescimento semelhante, mas inferior densidade celular, em relação ao clone MG11A + pGL631 (Figura 24 (a)).

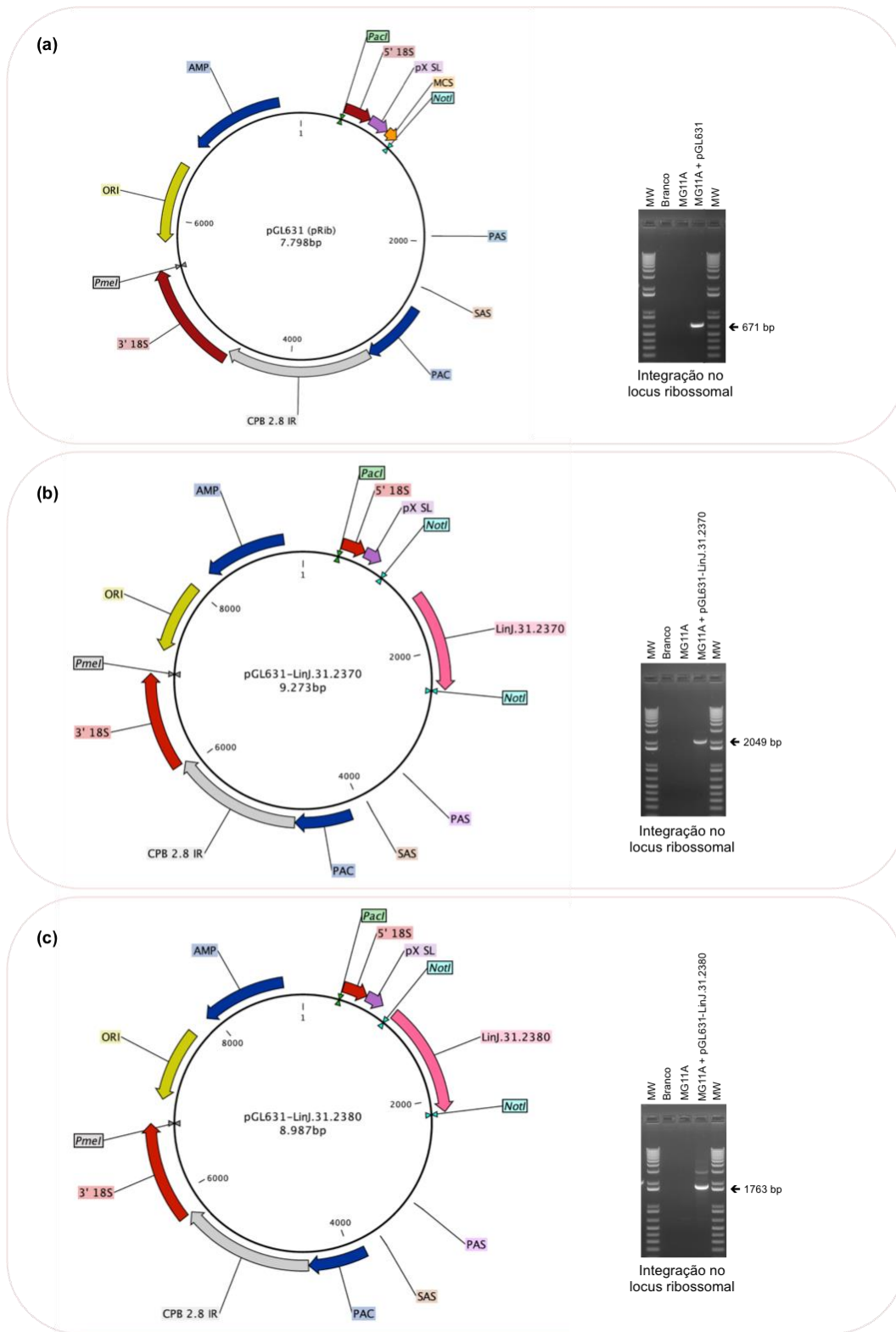


Figura 23 – Continuação na próxima página.

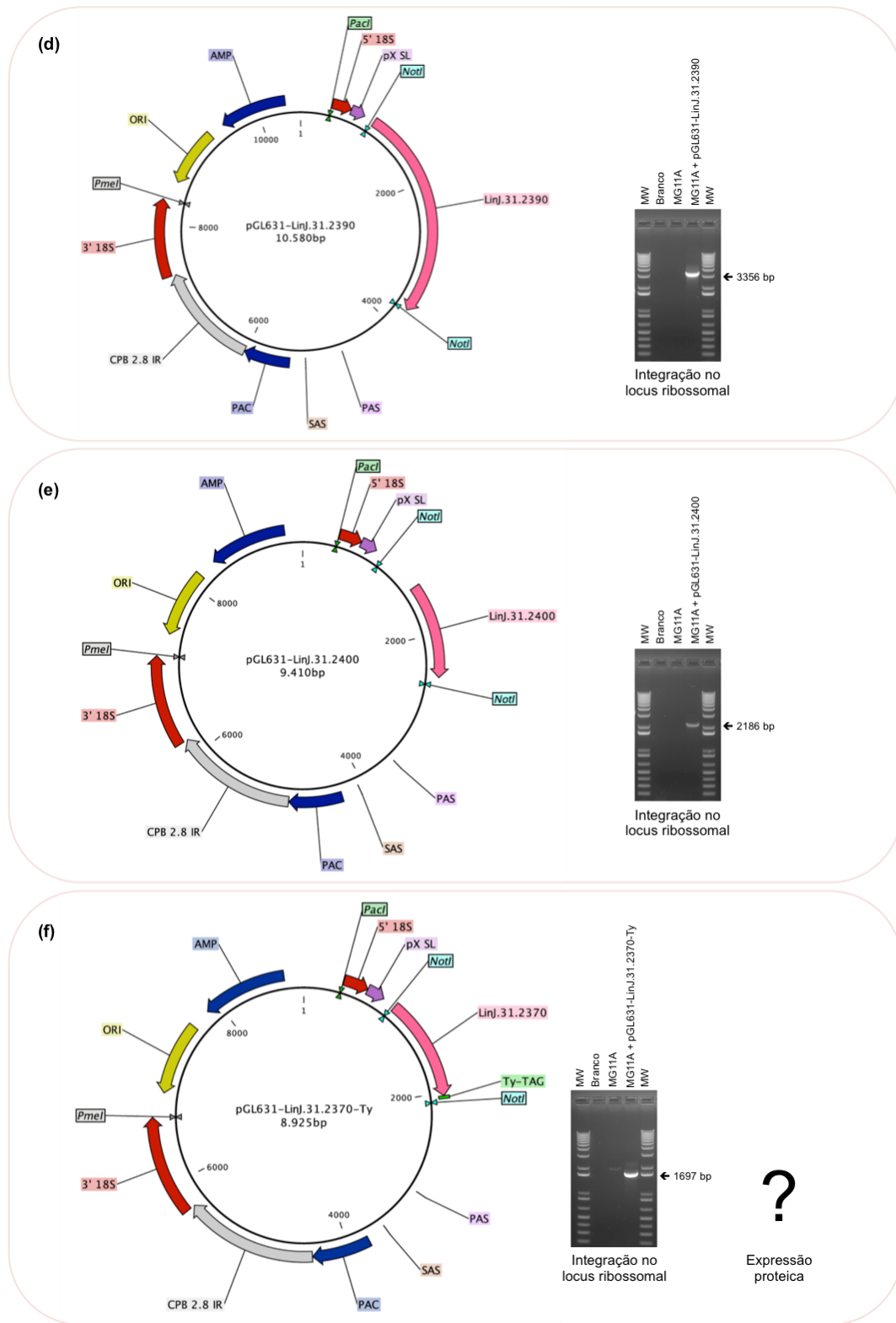


Figura 23 – Continuação na próxima página.

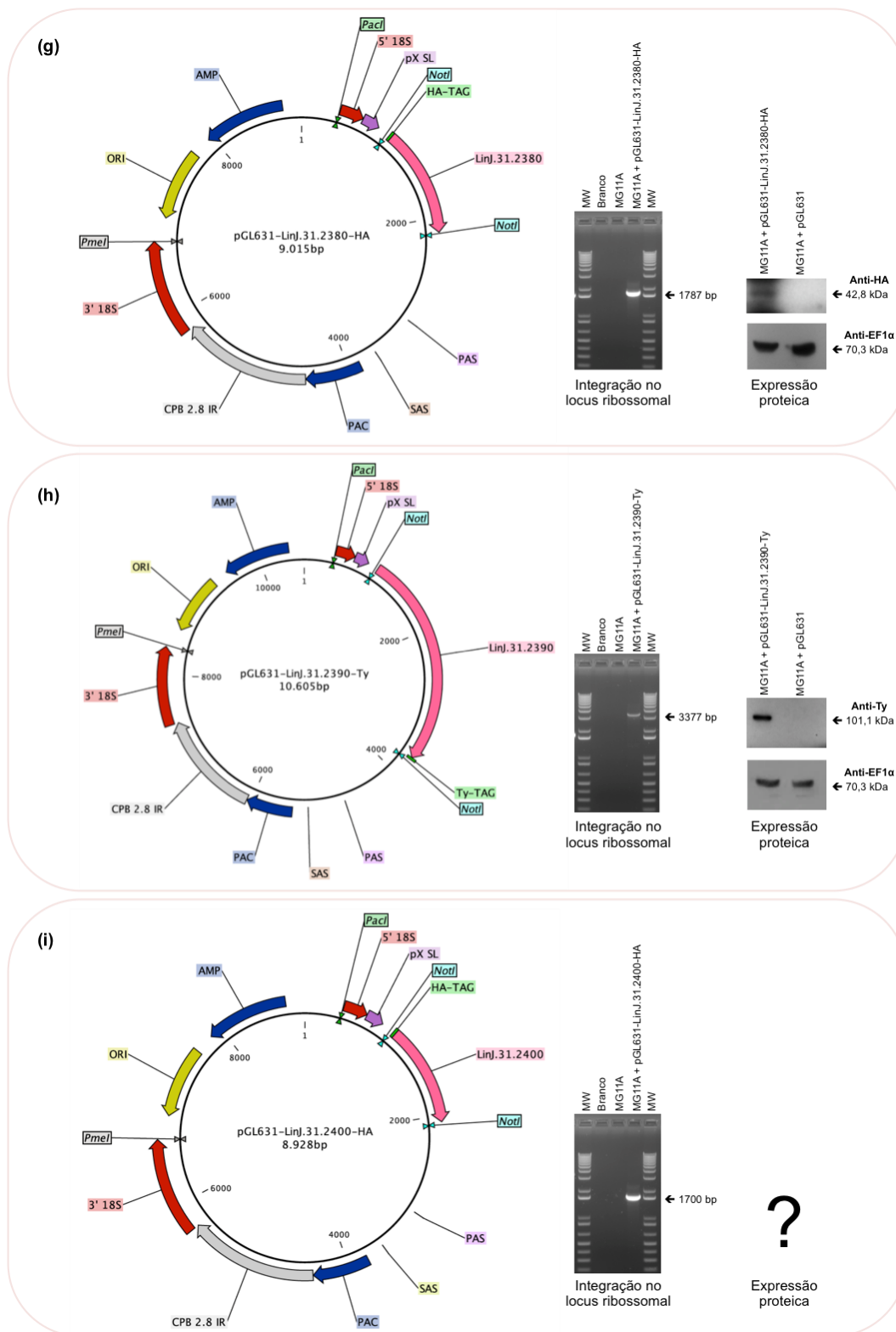


Figura 23 – Construções geradas a partir do vetor pGL631, verificação da integração das construções no locus ribossomal do isolado de *L. (L.) chagasi* (MG11A) e demonstração da expressão proteicas dos genes clonados. (a) pGL631. (b) pGL631-LinJ.31.2370. (c) pGL631-LinJ.31.2380. (d) pGL631-LinJ.31.2390. (e) pGL631-LinJ.31.2400. (f) pGL631-LinJ.31.2370-Ty. (g) pGL631-LinJ.31.2380-HA. (h) pGL631-LinJ.31.2390-Ty. (i) pGL631-LinJ.31.2400-HA. Os produtos de PCR foram separados e visualizados em gel de agarose-TAE 0,9%. Os valores de número de pares de bases dos produtos de PCR e de massa molecular das proteínas analisadas estão indicados ao lado das setas.

Os resultados da análise de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina demonstraram que a reexpressão dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no isolado MG11A não interferiu de forma significativa no fenótipo de resistência à droga (Figura 24 (b)).

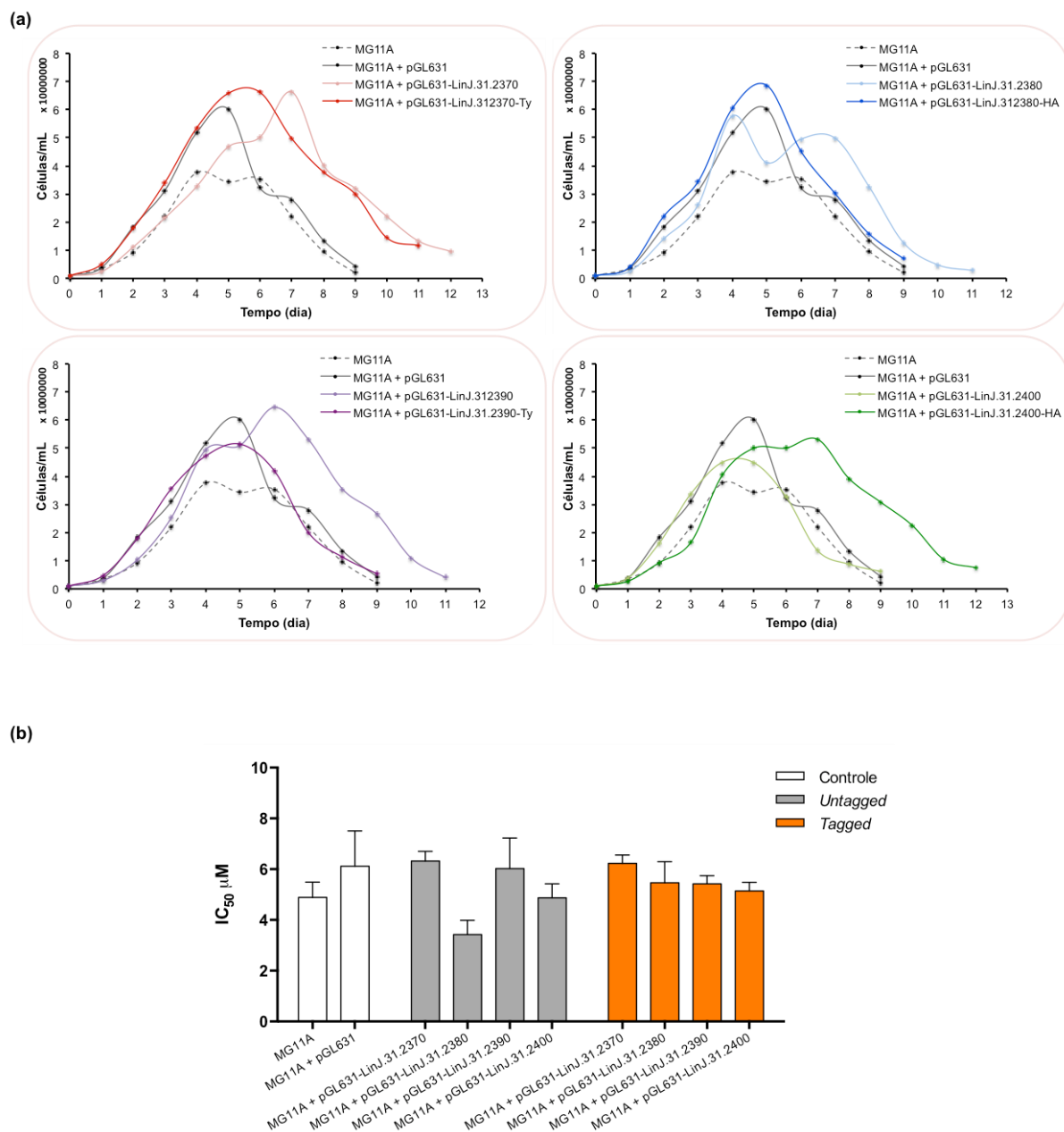


Figura 24 – Caracterização dos clones reexpressando os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. Curvas de crescimento (a) e perfis de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina (b) do isolado MG11A e de seus mutantes reexpressando os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 ou LinJ.31.2400 na versão *Tagged* (Ty ou HA) e *Untagged*.

3.5. MECANISMO DE PERDA DOS GENES LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 E LinJ.31.2240 EM ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

Para compreender o processo que levou a perda dos genes *in tandem* LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 nos isolados de *L. (L.) chagasi*, os produtos de PCR com início na região intergênica acima do gene LinJ.31.2370 e fim na região intergênica abaixo do gene LinJ.31.2400 (fragmento de 1,2 kb obtido na reação de PCR ID 8 – tabela 5) foram ligados ao pGEM T easy e, após clonagem, foram sequenciados. O sequenciamento foi realizado para todos os isolados que apresentaram perda dos referidos genes.

O alinhamento das sequências mostrou que a perda do referido locus ocorreu exatamente na mesma posição do genoma para todos os isolados, indicando que esse processo não ocorreu ao acaso (Figura 25). Diante desse resultado, foi realizada uma busca por sequências repetidas no cromossomo 31, as quais possibilitam o processo de recombinação homóloga e conseqüentemente a perda desse locus. Essa análise identificou 6 regiões repetidas em relação à sequência formada pela junção da região intergênica posicionada logo acima do gene LinJ.31.2370 e logo abaixo do gene LinJ.31.2400. Além disso, essa análise também mostrou que essas repetições estão direcionadas no mesmo sentido e que os quatro genes perdidos estão posicionados entre duas regiões repetidas (Figura 26). Esses resultados nos permitem inferir que o processo de recombinação gênica entre duas regiões repetidas levou à deleção gênica do locus, formando um elemento extracromossomal circular. Esse elemento extracromossomal possivelmente não foi mantido pelas células, uma vez que não foi possível identificar os genes internos (LinJ.31.2380 e LinJ.31.2390) por reação de PCR (Figura 20).

Baseado nos dados publicados por Ubeda e colaboradores (2014) foi possível determinar que essas sequências repetidas identificadas no cromossomo 31 apresentam elementos classificados como SIDER2 (*Short Interspersed DEgenerate Retroposons*), os quais atuam na regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional (Bringaud *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009).

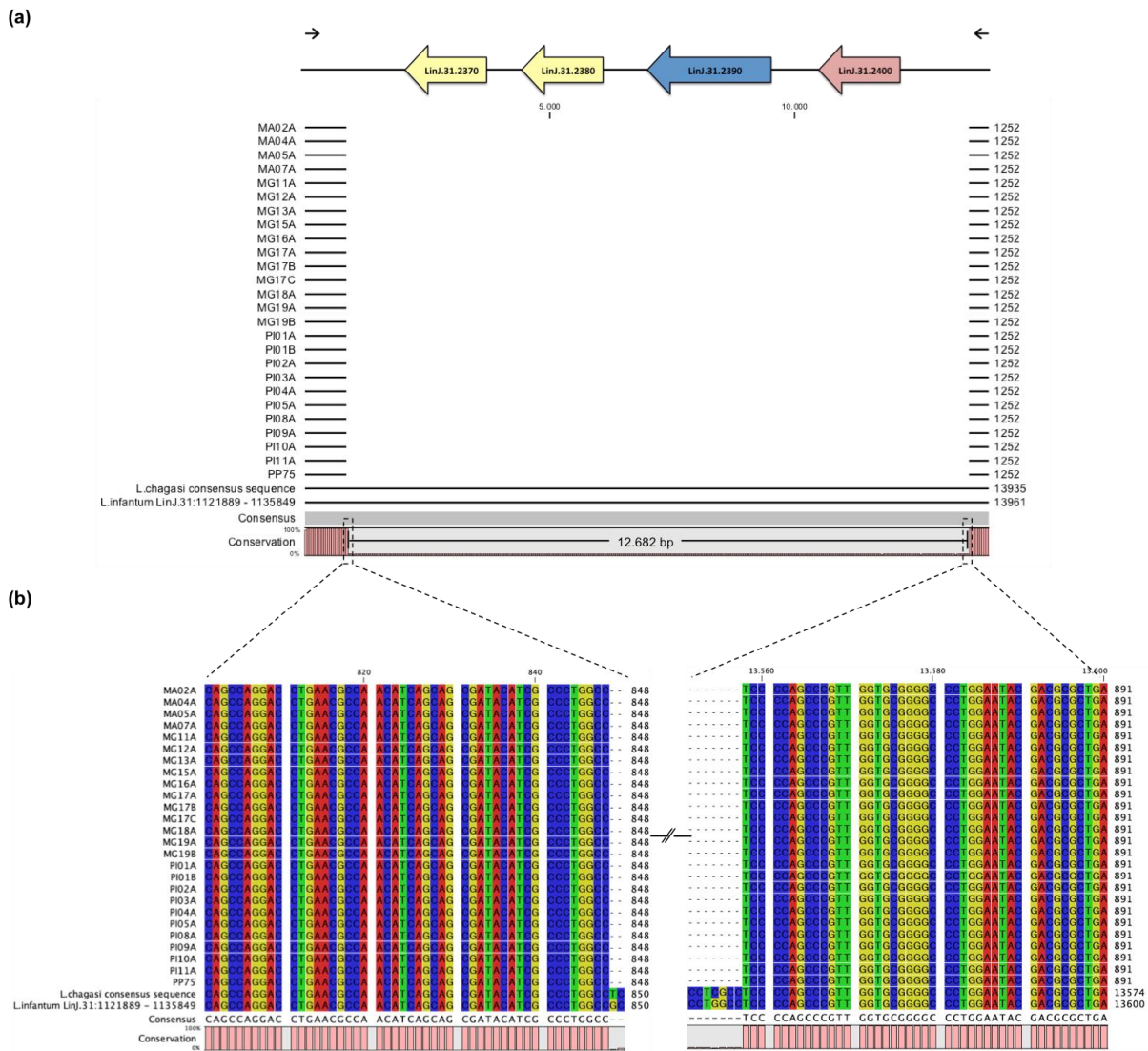


Figura 25 – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos formadas pela junção das regiões intergênicas posicionadas logo acima do gene LinJ.31.2370 e logo abaixo do gene LinJ.31.2400 nos isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Visualização global do alinhamento dos fragmentos sequenciados dos isolados clínicos contra a seqüência consenso de *L. (L.) chagasi* e o genoma de referência de *L. (L.) infantum* (JPCM5). (b) Zoom das extremidades das seqüências alinhadas, destacando a posição onde ocorreu a perda do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400.

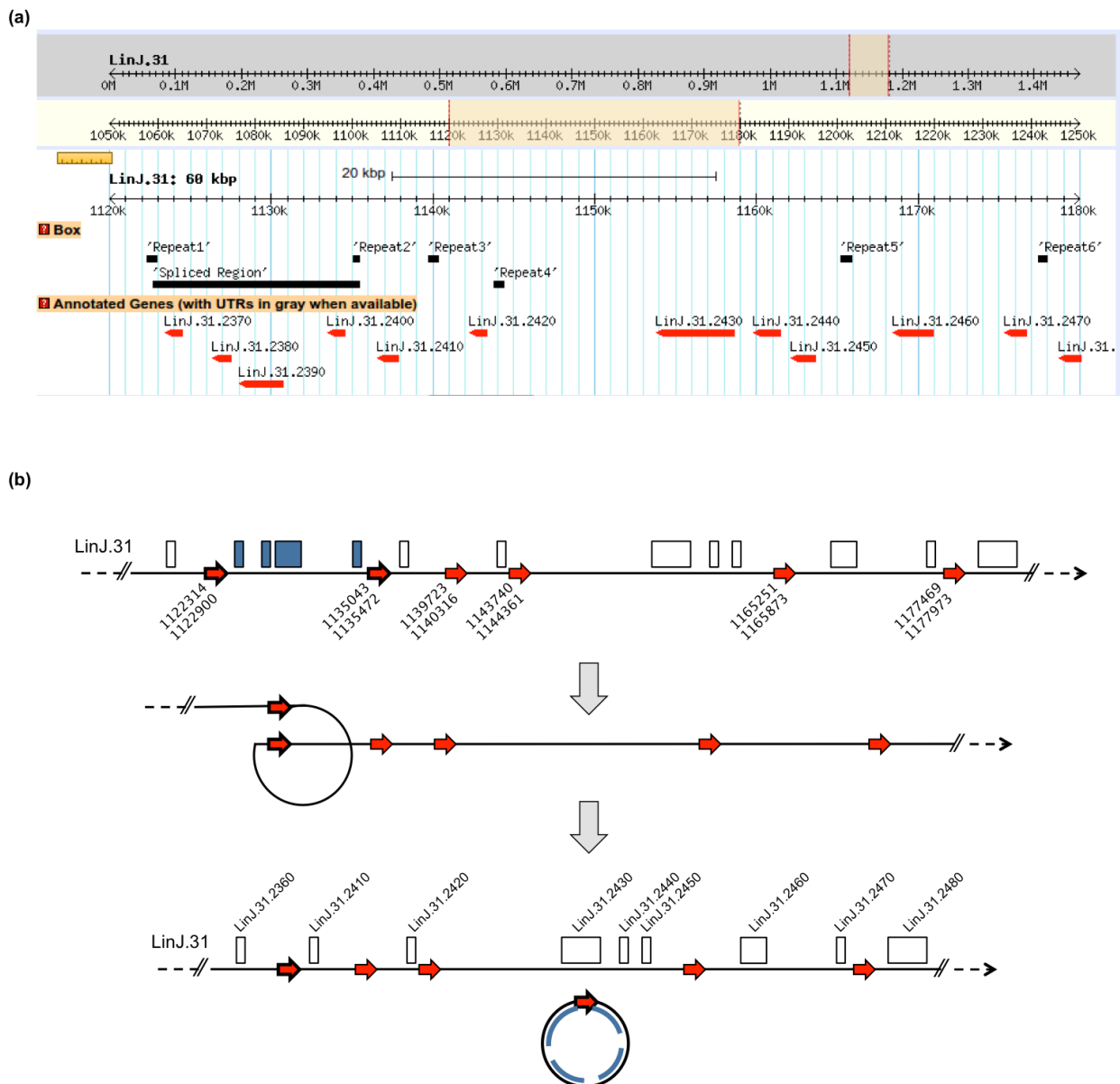


Figura 26 – Mecanismo de perda dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 nos isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Localização das sequências repetidas no cromossomo 31 baseado na sequência formada pela junção das regiões intergênicas posicionadas logo acima do gene LinJ.31.2370 e logo abaixo do gene LinJ.31.2400. As sequências repetidas estão identificadas como “repeat1”, “repeat2”, “repeat3”, “repeat4”, “repeat5” e “repeat6” e o locus deletado do genoma está identificado como “Spliced Region”. (b) Processo de recombinação homóloga entre as regiões repetidas “repeat1” e “repeat2”, destacadas pelas setas em negro e vermelha, levando à formação de um elemento extracromossomal, o qual contém os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400, destacados em azul.

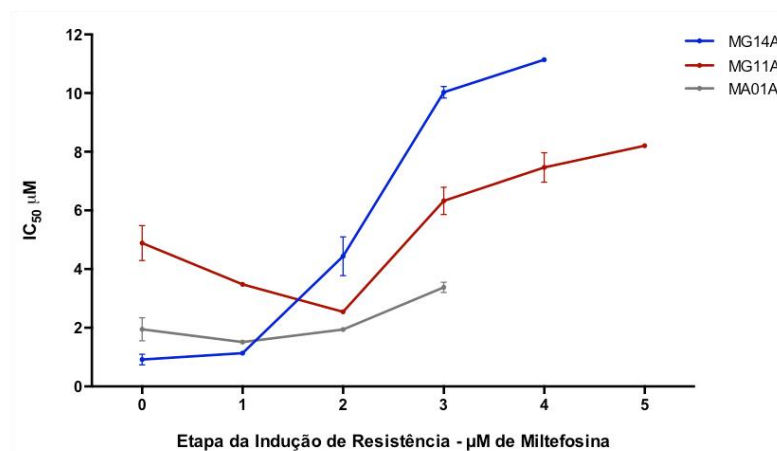
3.6. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA EM ISOLADOS DE *L. (L.) chagasi*

Considerando que a pressão de droga pode induzir a deleção gênica por recombinação homóloga, isolados de *L. (L.) chagasi* foram submetidos ao processo de indução de resistência *in vitro*, por cultivo em meio contendo concentrações crescentes de miltefosina. Para isto foram utilizados: (i) os isolados do grupo cura MA01A e MG14A, homogêneos quanto à presença do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400; (ii) e o isolado MG11A, previamente caracterizado como resistente à miltefosina e que não apresenta o locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400.

A análise de susceptibilidade *in vitro* das formas promastigotas desses isolados demonstrou que: (i) apesar do isolado MA01A ter exibido um discreto aumento na resistência à miltefosina, este não foi capaz de crescer em meio com concentração $\geq 3 \mu\text{M}$ de miltefosina; (ii) o isolado MG14A reverteu o fenótipo de susceptibilidade à miltefosina; (iii) e o isolado MG11A se tornou ainda mais resistente à miltefosina (Figura 27 (a)). Os mesmos isolados cultivados na ausência de pressão da miltefosina, pelas passagens correspondentes àquelas submetidas a pressão da droga, não sofreram variação significativa no fenótipo de resistência à miltefosina (dados não mostrados).

A investigação da perda do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 nos isolados MA01A e MG14A, após pressão da droga (até a concentração máxima utilizada para induzir a resistência neste estudo), revelou que a redução da susceptibilidade *in vitro* à miltefosina não foi acompanhada da deleção do locus contendo esses genes (Figura 27(b)).

(a)



(b)

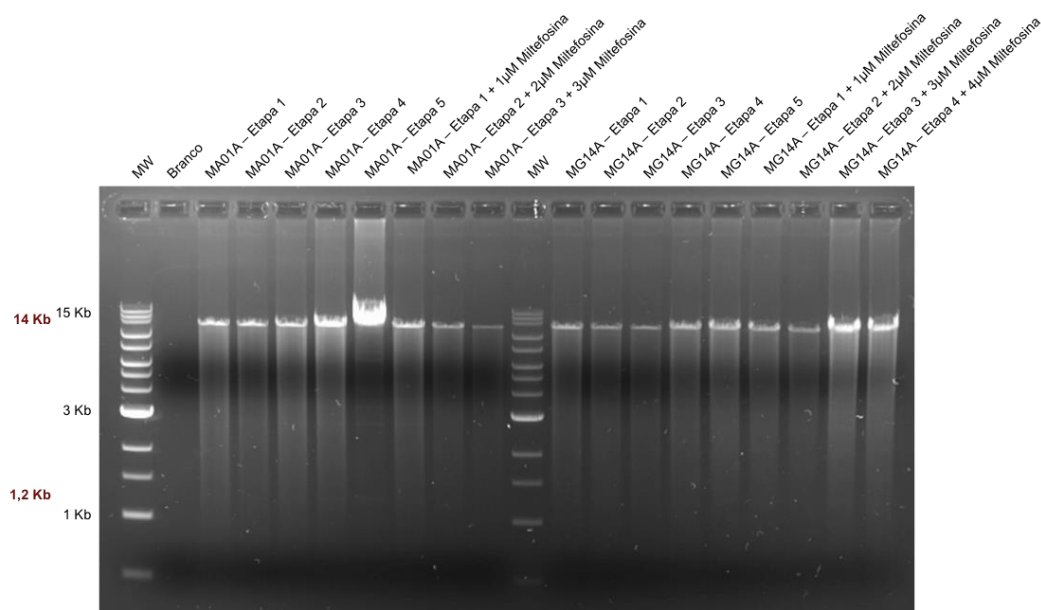


Figura 27 – Indução de resistência à miltefosina e concomitante verificação de alteração no genoma em isolados de *L. (L.) chagasi*. (a) Avaliação da susceptibilidade *in vitro* das formas promastigotas de MA01A, MG11A e MG14A após cultivo em meio LIT contendo miltefosina em concentrações crescentes. (b) Perfil gênico dos isolados MA01A e MG14A quanto à presença do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 (isolados cultivados na ausência e na presença de miltefosina durante o processo de indução de resistência). As concentrações de miltefosina utilizadas em cada etapa do processo de indução de resistência estão especificadas nas figuras. Gel de agarose-TAE 0,6%.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A miltefosina tem apresentado elevada taxa de cura em áreas endêmicas de LV na Índia (Sundar *et al.*, 1998; Sundar *et al.*, 1999; Sundar *et al.*, 2002a). Contudo, resultados obtidos de um estudo clínico realizado no Brasil, pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que apenas cerca de 50% dos pacientes portadores de leishmaniose visceral evoluíram para cura após o tratamento com miltefosina (dados não publicados – Dietze, R.). Um estudo prévio, utilizando ensaio de infecção de macrófagos para caracterizar isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes arrolados no ensaio clínico acima citado, revelou que a maioria dos isolados dos pacientes que apresentaram falha terapêutica eram resistentes *in vitro* à miltefosina, sugerindo que a falha ao tratamento poderia ser associada à resistência do parasita à droga (Monti-Rocha, 2012).

Este estudo acrescentou a caracterização do perfil de susceptibilidade *in vitro* das formas promastigotas desses isolados de *L. (L.) chagasi* à miltefosina. Apesar da análise estatística mostrar diferença no IC₅₀ entre as formas promastigotas dos isolados dos grupos cura e recidiva, a diferença em valor numérico absoluto é muito pequena (razão < 2), quando comparada com o da amastigota (razão > 2), mostrando que o teste de susceptibilidade *in vitro* para a forma amastigota apresenta uma correlação mais segura com o desfecho clínico.

Na tentativa de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na resistência do parasita *Leishmania* à miltefosina este estudo comparou o perfil de expressão proteica e o genoma de isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes portadores de LV que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina.

Na abordagem proteômica conduzida neste estudo, o proteoma solúvel dos isolados com diferentes susceptibilidade à miltefosina foram separados no sistema 2D-DIGE com alta resolução na faixa de pH 4 a 7, resolvendo em média 810 *spots* proteicos. Esse número representa uma cobertura de 10,1% dos ~8.000 ORFs preditos no genoma de *L. (L.) infantum*. Contudo, esse percentual pode estar superestimado, considerando a ocorrência de modificações pós-traducionais e processamentos proteicos, os quais podem ser evidenciados pela ocorrência de um mesmo produto gênico em diferentes *spots*.

O número total de *spots* observados no perfil 2D neste estudo foi relativamente menor quando comparado com outros trabalhos que utilizaram a mesma abordagem para analisar o proteoma de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (Costa *et al.*, 2011; Da Fonseca Pires *et al.*, 2014) e, consideravelmente menor em relação aos dados obtidos por Daneshvar e

colaboradores (2012). Essa diferença pode ser justificada considerando que o número de *spots* visualizados no 2D-DIGE pode ser influenciado por diversos fatores, tais como: tipo da amostra (espécie/cepa de parasita); preparo da amostra; tamanho e faixa de pH da IPG *strip*; tamanho do gel; assim como os parâmetros de detecção utilizados.

A análise proteômica comparativa revelou alterações significantes entre o perfil de expressão proteica dos isolados obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas à miltefosina. Os 32 *spots* proteicos (22 não-redundantes) diferencialmente expressos entre os isolados foram agrupados em 12 categorias funcionais. Muitas das proteínas identificadas em nosso estudo já foram previamente associadas com o fenótipo de resistência de *Leishmania* spp. a diferentes drogas com atividade anti-*Leishmania* (ver referências das tabelas 8 e 9).

A categoria funcional que apresentou o maior número de *spots* diferencialmente expressos entre os isolados analisados foi a classe das chaperonas e proteínas do *stress*. As chaperonas, também denominadas proteínas do choque térmico (Hsps), compreendem uma família altamente conservada de proteínas facilitadoras de *foldi*ng, que atuam em importantes aspectos da funcionalidade da célula e em uma variedade de respostas ao *stress* (químico e fisiológico). Essas proteínas tem sido associadas com a proteção celular, prevenindo a ativação da morte celular programada (para revisão consultar as referências: Beere (2004); Folgueira e Requena (2007)). A chaperona Hsp60 foi identificada em três *spots* diferentes e, todos eles apresentavam expressão aumentada no isolado do grupo recidiva. Esses *spots* podem representar diferentes variantes da proteína Hsp60, devido a modificações pós-traducionais, uma vez que pequenas diferenças entre os valores de pI e massa molecular calculado e predito foram observadas. Nível aumentado da proteína Hsp60 também tem sido observado em linhagens de *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* resistentes ao antimônio (Matrangolo *et al.*, 2013) e em *L. (L.) major* resistente ao metotrexato (Drummelsmith *et al.*, 2004). Essa abordagem proteômica também detectou aumento da expressão da proteína sti1 (*stress-induced protein*) no isolado do grupo recidiva. Essa proteína forma um complexo com as chaperonas Hsp70 e Hsp90 (também conhecida como Hsp83 em *Leishmania* spp. (Hubel e Clos, 1996)), atuando como cochaperona e é produzida em resposta ao *stress* (Lassle *et al.*, 1997; Hombach *et al.*, 2012). Tendo em vista essa interação de sti1 com Hsp83, o aumento na expressão observado pode estar associado com o fenótipo de resistência, uma vez que o aumento no nível de expressão de Hsp83 tem sido relacionado com resistência à miltefosina e ao antimonial em *L. (L.) donovani* (Vergnes *et al.*, 2007). Além disso, tem sido reportado que Hsp83 interfere com o potencial de membrana mitocondrial, reduzindo o processo de morte celular programada in *L. (L.)*

donovani (Vergnes *et al.*, 2007), o qual tem sido descrito como um possível mecanismo de ação da miltefosina (Paris *et al.*, 2004; Verma e Dey, 2004; Verma *et al.*, 2007).

Outra proteína com diferença de expressão entre os isolados dos grupos cura e recidiva destacada neste estudo é a peroxirredoxina, a qual pertence à classe de proteínas antioxidante/detoxicante. Essa proteína também foi identificada em três diferentes *spots*, representando duas peroxirredoxinas mitocondriais e uma citosólica, e todos esses *spots* apresentaram maior abundância no isolado do grupo recidiva. As peroxirredoxinas são encontradas em uma grande variedade de organismos e estão envolvidas na homeostase do sistema redox, apoptose, transdução de sinais e infecção por patógenos (Nathan e Shiloh, 2000; Droge, 2002; Hofmann *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003). As peroxirredoxinas são bem conhecidas pela sua atividade antioxidante, podendo utilizar diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) como substrato. Na família *Trypanosomatidae* as peroxirredoxinas são as principais enzimas antioxidantes (Wilkinson *et al.*, 2000). A expressão aumentada dessa proteína antioxidante tem sido associada com resistência ao antimônio em *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* (Matrangolo *et al.*, 2013) e com resistência à gentamicina em *L. (L.) infantum* (Daneshvar *et al.*, 2012). Harder e colaboradores (2006) mostraram que o aumento da expressão de peroxirredoxina mitocondrial em *L. (L.) donovani* foi acompanhado de proteção contra a morte celular programada. Nossos achados corroboram o estudo de Das e colaboradores (2013), o qual demonstrou que isolado de *L. (L.) donovani* não responsivo à miltefosina possui uma maquinaria antioxidante mais eficaz na remoção de ROS, aumentando a habilidade de manter a homeostase do sistema redox.

Outras duas proteínas com expressão aumentada no isolado do grupo recidiva, destacadas em nosso estudo, foram a álcool desidrogenase dependente de NADP (NADP-ADH) e o fator de alongação 1-beta (EF-1 β), que apesar de serem categorizadas nas classes referentes ao metabolismo de carboidrato e à biossíntese de proteínas, respectivamente, também possuem importante participação na manutenção da homeostase do sistema redox. NADP-ADH, também conhecida com aldeído redutase dependente de NADP, compreende uma classe de oxidorreductase que catalisa a oxidação reversível do etanol a acetoaldeído com concomitante redução do NADPH (Reid e Fewson, 1994). Em leveduras, tem sido demonstrado que durante condições de *stress* oxidativo, nas quais o nível de glutathiona está reduzido e as enzimas da via do glioxalato estão inativas, a atividade da aldeído redutase é responsável por 40% do processo de detoxificação do metilglioxal na célula (Gomes *et al.*, 2005). O complexo EF-1 β é uma parte funcional do fator de alongação 1. Esse complexo além de estar envolvido na síntese de proteínas, possui outras atividades distintas:

tripanotiona S-transferase e peroxidase (Vickers *et al.*, 2004a; Vickers *et al.*, 2004b). O sistema dependente de tripanotiona é comum a todas as espécies de *Leishmania* e apresenta importante função na sobrevivência do parasita, uma vez que neutraliza efeitos nocivos das ROS (para revisão consultar a referência Colotti e Ilari (2011)).

Embora estudos prévios tenham demonstrado um nível aumentado de enzimas envolvidas no sistema de biossíntese da tripanotiona em linhagens de *Leishmania* resistentes ao antimonial e ao metotrexato (Drummel-Smith *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2012), em nosso estudo foi observado menor nível de expressão de três enzimas (espermidina sintetase, S-adenosilmetionina sintetase e S-adenosilhomocisteína hidrolase) envolvidas na via de formação desse composto no isolado do grupo recidiva.

Outras proteínas diferencialmente expressas com função altamente específicas identificadas na abordagem proteômica, que podem estar associadas com o fenótipo de resistência à miltefosina, foram o PCNA (*Proliferative Cell Nuclear Antigen*) e a β -subunidade da ATPase mitocondrial. O PCNA participa no processo de replicação e reparo do DNA. Estudos prévios também observaram aumento da abundância relativa da proteína PCNA em isolados de *L. (L.) donovani* (Kumar *et al.*, 2010) e em uma linhagem de *L. (V.) braziliensis* (Matrangolo *et al.*, 2013) resistentes ao antimonial. A β -subunidade da ATPase mitocondrial é o elemento catalítico do transportador de H^+ que em levedura apresenta relação com a bomba de efluxo ABC, a qual está envolvida no fenômeno de multidroga resistência (Zhang e Moye-Rowley, 2001). Considerando que a resistência à miltefosina em *Leishmania* spp. tem sido associada com a expressão aumentada do transportador ABC, o qual está relacionado com a redução do acúmulo da droga na célula (Perez-Victoria *et al.*, 2001), o nível aumentado dessa subunidade no isolado do grupo recidiva pode também estar relacionado com o fenótipo de resistência.

Baseado nos dados obtidos na análise proteômica comparativa entre os isolados dos grupos cura (MG14A) e recidiva (MG11A) foi proposto um mecanismo multifatorial de resistência natural à miltefosina em *L. (L.) chagasi*, o qual está descrito na figura 28.

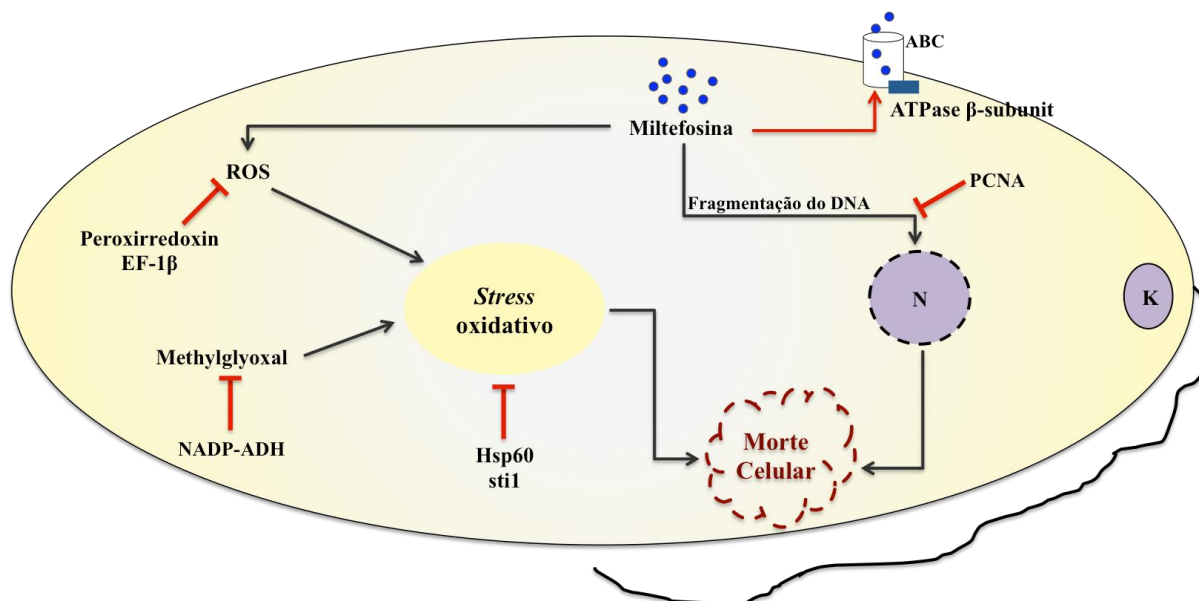


Figura 28 – Modelo proposto para o mecanismo de resistência natural à miltefosina em *L. (L.) chagasi*. A miltefosina (círculos azuis) induz um aumento no nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), que leva ao *stress oxidativo* e então à morte celular (Moreira *et al.*, 2011). O aumento da abundância relativa das proteínas peroxirredoxina e fator de alongação 1-beta (EF-1β) reduz o nível de ROS, fornecendo proteção contra o *stress oxidativo*. Além disso, o aumento na expressão das proteínas NADP-ADH (*NADP-dependent alcohol dehydrogenase*), chaperona Hsp60 e sti1 (*stress-induced protein*) também podem contribuir para manutenção da homeostase do sistema redox e assim inibir o *stress oxidativo*. A miltefosina também pode induzir o processo de morte celular por fragmentação do DNA (Paris *et al.*, 2004). Nessa via, o aumento da expressão da proteína PCNA (*Proliferative Cell Nuclear Antigen*) pode estar associado ao fenótipo de resistência à miltefosina, uma vez que essa proteína atua na reparação e replicação do DNA. A expressão aumentada da β-subunidade da ATPase (considerada elemento catalítico da bomba de efluxo ABC) também pode proteger a célula da morte celular induzida pela miltefosina, por redução do acúmulo intracelular da droga. N – núcleo; K – Kinetoplasto.

A abordagem genômica conduzida neste estudo mostrou que, apesar de algumas diferenças em termos de SNPs e InDels (797 SNPs e 275 InDels homozigotos), as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* são geneticamente muito similares, o que justifica alguns autores considerá-las sinônimas (Lukes *et al.*, 2007) e corrobora os dados da identificação de proteínas, visto que o banco de dados utilizado foi criado a partir do genoma de referência da espécie *L. (L.) infantum* (JPMC5).

Apesar da abordagem genômica por NGS ter identificado um elevado número de mutações somáticas (SNPs e InDels) nos isolados de *L. (L.) chagasi*, não foi observado mutações relevantes nos genes do transportador da miltefosina e da sua β-subunidade Ros3, as quais têm sido associadas com o fenótipo de resistência induzido em laboratório (Perez-Victoria *et al.*, 2003b; Perez-Victoria *et al.*, 2006a; Seifert *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2012; Kulshrestha *et al.*, 2014), assim como com o fenótipo de resistência natural (Cojean *et al.*, 2012) em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*.

Entretanto, diversas mutações pontuais foram observadas em diferentes genes que codificam para os transportadores ABC nos isolados analisados. Mutação pontual no transportador ABC (LiABCG4 - LinJ15.0940) também tem sido associada ao fenótipo de resistência à miltefosina em *L. (L.) infantum* (Castanys-Munoz *et al.*, 2007). Dentre as mutações pontuais nos genes de transportadores ABC identificadas neste estudo, a mais relevante foi observada no gene LinJ.23.0240, a qual está presente em 11 dos 14 isolados do grupo cura, sendo homozigótica em sete desses isolados. Contudo, nenhum SNP ou InDel identificado em nosso estudo foi capaz de discriminar completamente os isolados obtidos de pacientes que apresentaram diferentes desfechos clínicos ao tratamento com miltefosina. Resultado semelhante foi reportado por Downing e colaboradores (2011) em um estudo que também utilizou NGS para caracterizar isolados de *L. (L.) donovani* com diferentes perfis de susceptibilidade *in vitro* ao antimonial. É importante considerar que, as coberturas de sequenciamento obtidas em nossas análises (16x em média) não foram tão elevadas quanto às obtidas por Downing e colaboradores (66x em média), o que sugere cautela na utilização desses dados. De acordo com as boas práticas de bioinformática, é recomendado uma cobertura $\geq 20x$, principalmente em relação a genes localizados em cromossomos com ploidia maior do que dois (comunicação pessoal).

Além das alterações citadas acima, a análise de variação estrutural realizada neste estudo evidenciou diferenças em termos do número de cópias de cromossomos e de genes entre os isolados analisados. Esses dados corroboram os resultados prévios que demonstraram a significativa plasticidade gênica dos parasitas *Leishmania* spp. (Downing *et al.*, 2011; Rogers *et al.*, 2011). Apesar da diferença na ploidia entre os isolados analisados não discriminá-los, a análise de variação no número de cópias de genes identificou diferenças significativas entre os isolados dos grupos cura e recidiva em diversos grupos ortólogos.

Algumas dessas diferenças na dose gênica entre os isolados dos grupos cura (MG14A) e recidiva (MG11A) (*activated protein kinase c receptor, cChaperonin Hsp60, ATPase beta subunit, GDP-mannose pyrophosphorylase, RNA helicase, mitochondrial peroxiredoxin, stress-induced protein sti1, actin* e uma proteína hipotética (OG5_148242)) foram positivamente correlacionadas, enquanto outras (*ribonucleoprotein p18, proliferative cell nuclear antigen* e de duas proteínas hipotéticas (OG5_145290 e OG5_150350)) foram inversamente correlacionadas com o nível proteico, encontrado na análise do proteoma desses isolados. Apesar da estrutura do genoma de *Leishmania* spp. ser caracterizado pela presença de genes duplicados em *tandem arrays* (Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007), o que pode acarretar aumento da expressão gênica (Rogers *et al.*, 2011) e consequentemente da expressão proteica, a falta de correlação observada no presente estudo destaca a

importância da regulação a nível pós-transcricional e pós-traducional nos parasitos pertencentes à classe Kinetoplastida (Kabani *et al.*, 2009; Kramer, 2012).

A análise de CNV destacou alterações qualitativas significantes, entre os isolados dos grupos cura e recidiva, quanto a presença dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. Esses estavam presentes em 11 dos 14 isolados do grupo cura e em apenas um dos 12 isolados do grupo recidiva. Esses dados foram validados por reações de PCR, as quais mostraram uma correlação de 100% com os dados preditos da bioinformática.

Os genes *in tandem* LinJ.31.2370 e LinJ.31.2380 codificam para a proteína 3'-nucleotidase/nuclease (3'NT/NU), a qual pertence à família de nucleases de classe I (Wilson, 1982; Campbell *et al.*, 1991). Essa enzima (37,99 – 41,56 kDa) foi descrita como uma proteína ancorada à membrana e é encontrada em diferentes espécies do gênero *Leishmania*, incluindo *L. (L.) infantum* (Dwyer e Gottlieb, 1984; Hassan e Coombs, 1987; Bates, 1993; Sopwith *et al.*, 2002). Os parasitos *Leishmania* são auxotróficos para purinas, sendo incapazes de produzi-las pela síntese *de novo*. A caracterização da enzima 3'NT/NU mostrou que esta desempenha um papel central no metabolismo de purinas (Hammond e Gutteridge, 1984) e, em *Leishmania*, está envolvida no salvamento dessas bases, via hidrólise de 3'nucleotídeo ou de ácidos nucleicos (Gottlieb e Dwyer, 1983; Dwyer e Gottlieb, 1984). A atividade da enzima 3'NT/NU também tem sido associada com a sobrevivência da forma promastigota de *L. (L.) infantum* mediante interação com neutrófilos (Guimaraes-Costa *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que a enzima 3'NT/NU é estágio específica, sendo expressa apenas nas formas promastigotas metacíclicas e procíclicas (Sopwith *et al.*, 2002). Contudo, em um estudo posterior foi identificada uma outra enzima (LmaC1N, ~35 kDa) com atividade nuclease, a qual apresenta alta homologia com a enzima 3'NT/NU da classe I e é expressa apenas pela forma amastigota (Farajnia *et al.*, 2004). Considerando essas informações, pode-se sugerir que o envolvimento dos genes LinJ.31.2370 e LinJ.31.2380 no fenótipo de resistência à miltefosina em *L. (L.) chagasi* seja estágio específico.

O gene LinJ.31.2390 apresenta como produto a proteína *helicase-like* (99,95 kDa). As helicases são ATPases dependentes de ácidos nucleicos que atuam: no relaxamento de substratos *duplex* de DNA ou RNA e da estrutura helicoidal dos ácidos nucleicos de dupla fita; e em alguns casos são capazes de desfazer interações entre ácidos nucleicos com proteínas (Abdelhaleem, 2010). Essas enzimas atuam em diversos processos celulares incluindo: replicação e reparo do DNA, transcrição, síntese de ribossomo, maturação e *splicing* de RNA e processos de exportação nuclear (Singleton *et al.*, 2007). O gene

LinJ.31.2390 é sintênico e ortólogo (OG5_183927) ao gene LmjF.31.2320 de *L. (L.) major* (Tritypdb, 2015), o qual codifica para uma DNA-helicase classificada na família Swi/Snf (Fairman-Williams *et al.*, 2010; Gargantini *et al.*, 2012). As funções biológicas atribuídas às DNA-helicases em tripanossomatídeos incluem: replicação e manutenção do DNA mitocondrial (kDNA – *kinetoplast DNA*) (Liu *et al.*, 2009a; Liu *et al.*, 2009b; Liu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012), replicação do DNA genômico (Dang e Li, 2011); e manutenção da viabilidade e proliferação celular (Dang e Li, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Entretanto, até o momento não foi reportado o envolvimento das proteínas provenientes dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380 e LinJ.31.2390 com o fenótipo de resistência a drogas em tripanossomatídeos.

Por outro lado, a expressão reduzida da proteína 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase (LinJ.31.2400/LinJ.31.2320) foi reportada em uma linhagem de *L. (L.) donovani* resistente à paromomicina (Chawla *et al.*, 2011). A análise de variação estrutural realizada neste estudo identificou a deleção do gene LinJ.31.2400 na maioria dos isolados do grupo recidiva, sugerindo também o envolvimento dessa proteína no fenótipo de resistência à droga. É importante ressaltar que, a análise de detecção de InDels identificou inserções homozigóticas no gene LinJ.31.2400 que resultaram no efeito *Frame-Shift* para todos os isolados de *L. (L.) chagasi* que não possuem esse gene (11 dos 12 isolados do grupo recidiva). Dessa forma, essas alterações fazem referência ao gene ortólogo LinJ.31.2320 e indicam que esses isolados não são capazes de expressar nenhuma forma funcional da 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase. Essa enzima catalisa a reação reversível de isomerização da posição da dupla ligação e da configuração geométrica (*cis*- Δ^3 para *trans*- Δ^2) de um enoil-CoA, permitindo que ácidos graxos poli-insaturados sejam degradados na via clássica da β -oxidação (para revisão consultar a referência Hiltunen e Qin (2000)). A β -oxidação em *Leishmania* spp. ocorre nos glicosomas (Hart e Opperdoes, 1984) e, também é presumido que se processe na mitocôndria desses parasitas (Opperdoes e Szikora, 2006). Estudos têm mostrado que essa via metabólica é a principal fonte energética para a forma amastigota e que, as enzimas envolvidas no processo de β -oxidação em *Leishmania* apresentam maior atividade na forma intracelular amastigota em relação à forma promastigota, a qual utiliza a via glicolítica como principal fonte de obtenção de energia (Coombs *et al.*, 1982; Berman *et al.*, 1987; Opperdoes e Coombs, 2007). A ausência da enzima 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase nos isolados de *L. (L.) chagasi* do grupo recidiva pode causar aumento intracelular de ácidos graxos *cis*, acarretando diferença na composição de ácidos graxos e aumento da fluidez na membrana celular desses parasitas. No entanto, Rakotomanga e colaboradores (2005) observaram que o conteúdo de alquil-fosfolipídio insaturado na

membrana plasmática da linhagem de *L. (L.) donovani* resistente à miltefosina é inferior quando comparado com a linhagem sensível, sugerindo que a membrana plasmática da linhagem resistente apresenta menor fluidez. Entretanto, um estudo mais recente sobre as adaptações metabólicas em isolados de *L. (L.) donovani* com diferentes susceptibilidades ao antimonial mostrou que os parasitas resistentes apresentam membrana plasmática mais fluida (Berg *et al.*, 2013).

Ainda com relação ao metabolismo de lipídios nos isolados de *L. (L.) chagasi*, a análise de enriquecimento, utilizando os dados de CNV de genes, indicou que as vias de metabolismo de éter-lipídios e de glicerofosfolipídeos podem estar enriquecidas nos isolados do grupo recidiva. Os fosfolipídios (glicerofosfolipídeos e esfingofosfolipídeos) são os principais componentes das membranas biológicas dos parasitas *Leishmania* spp. A composição dos glicerofosfolipídeos nesses parasitas está representada basicamente por fosfatidilcolina (30 – 50%), fosfatidiletanolamina (10%) e fosfatidilinositol (10%) (Wassef *et al.*, 1985; Zheng *et al.*, 2010). Além disso, os éter-fosfolipídios, principalmente os das fosfatidiletanolaminas, representam uma parcela significativa da classe de glicerofosfolipídeos (Beach *et al.*, 1979; Wassef *et al.*, 1985). Os estudos de Lux e colaboradores (1996; 2000) sugerem que a miltefosina exerce sua atividade anti-*Leishmania* interferindo no metabolismo de alquil-lipídio e no remodelamento de éter-lipídios. Nesse contexto, o enriquecimento dessas vias metabólicas podem alterar o conteúdo de fosfolipídios na membrana dos parasitas, interferindo na atividade da miltefosina. Essa adaptação metabólica também pode contribuir para a manutenção da integridade da membrana celular e, conseqüentemente com o fenótipo de resistência à miltefosina.

A análise dos clones obtidos de isolados clínicos do grupo cura mostrou que estes, em sua maioria, são constituídos de uma população heterogênea, em relação à presença dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400, e que as formas promastigotas de clones que possuem esses genes (PI05A-C1 e PI08A-C3) são menos susceptíveis à miltefosina do que os clones que não os possuem (PI05A-C2 e PI08A-C4). Esses resultados vão de encontro com a associação inicial estabelecida entre a ausência desses genes e os isolados do grupo recidiva e mostram que, o fenótipo de uma população mista não necessariamente corresponde ao fenótipo dos clones encontrados em maioria na população constituinte do isolado clínico. Entretanto, a reexpressão individual dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no isolado do grupo recidiva (MG11A), o qual não os continham e que se apresentou resistente *in vitro* (IC₅₀ de 4,9 µM e >15 µM nas formas promastigota e amastigota, respectivamente), revelou que nenhum desses genes interfere no fenótipo de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina na forma promastigota. Esses

resultados sugerem, assim como a abordagem proteômica, que o mecanismo de resistência à miltefosina em *Leishmania* é multifatorial e pode variar entre os isolados de *L. (L.) chagasi* e entre a população que os compõe. Contudo, é preciso considerar que a avaliação desses clones foi realizada apenas nas formas promastigotas e que: os produtos gênicos de LinJ.31.2370 e LinJ.31.2380 são estágios específicos; e o metabolismo de lipídios, o qual apresentou diferenças entre os isolados dos grupos cura e recidiva, também é muito distinto entre as formas amastigotas e promastigotas. Nesse contexto, análises complementares são necessárias para verificar a susceptibilidade *in vitro* à miltefosina das formas intracelulares amastigotas, as quais têm sido melhor correlacionadas com o desfecho clínico. Além disso, é preciso considerar a necessidade de reexpressão simultânea de mais de um ou até mesmo dos quatro genes para reverter o fenotípico de resistência.

A análise do mecanismo de perda dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 indicou que o locus gênico que os contém foi deletado do genoma dos isolados clínicos após o processo de recombinação homóloga entre duas sequências repetidas com a mesma orientação no genoma (*Direct Repeated sequences – DRs*). Essas sequências repetidas em questão são classificadas como *SIDER2 (Short Interspersed DEgenerate Retroposons)* (Ubeda *et al.*, 2014), que comprovadamente controlam a regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional (Bringaud *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009), o que pode contribuir para uma variação ainda maior na expressão desses genes nos isolados clínicos analisados. O processo de recombinação homóloga tem sido descrito nos parasitas *Leishmania* como um sistema de amplificação gênica, com formação de elementos extracromossomais circular, induzido por pressão de droga (Ouellette *et al.*, 1991; Grondin *et al.*, 1996; Ubeda *et al.*, 2014). Esses elementos extracromossomais não parecem ter uma origem de replicação específica e são geralmente perdidos quando a pressão de droga é retirada (Beverley *et al.*, 1984; Ubeda *et al.*, 2008; Leprohon *et al.*, 2009), embora alguns elementos extracromossomais podem ser mantidos na ausência de pressão de droga (Tripp *et al.*, 1991). Entretanto, a indução de resistência por cultivo sob pressão da miltefosina, realizada neste estudo, mostrou que a redução da susceptibilidade à droga não foi acompanhada da deleção do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400. É importante considerar que a diferença destacada na análise de CNV entre os grupos cura e recidiva foi realizada apenas com os isolados obtidos antes do tratamento, ou seja, que não haviam sido submetidos à pressão de droga. Dessa forma, podemos supor que a perda desse locus pode ter ocorrido por alguma outra pressão, e que o genótipo alterado pode agora conferir vantagens adaptativas como, por exemplo, resistência à miltefosina.

Além disso, o crescimento sob pressão da miltefosina também evidenciou que, o isolado previamente caracterizado por apresentar resistência natural à droga (MG11A) foi capaz de intensificar ainda mais o seu fenótipo de resistência. Essa condição pode estar relacionada com: (i) a seleção de populações menos susceptíveis, corroborando os resultados que demonstraram que os isolados clínicos são constituídos de uma população heterogênea; (ii) e/ou com o desenvolvimento de um diferente mecanismo de resistência, o qual pode atuar em sinergismo com o mecanismo de resistência natural.

Neste trabalho utilizou-se as abordagens proteômica e genômica que, de forma complementar, destacaram diferentes vias que podem estar relacionadas com o mecanismo de resistência natural à miltefosina no parasita *Leishmania*, sugerindo que este é complexo e multifatorial. Assim, acreditamos que esses achados contribuem para um melhor entendimento do fenótipo de resistência à miltefosina em *L. (L.) chagasi*. Além disso, algumas das proteínas e dos genes destacados neste estudo, após uma melhor caracterização, podem ser utilizados como potenciais biomarcadores de resistência à miltefosina em *Leishmania*, contribuindo para o estabelecimento de estratégias terapêuticas mais apropriadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho, apresenta pela primeira vez, a utilização das análises proteômica (2D-DIGE) e genômica (NGS) comparativa para elucidar diferenças moleculares entre isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina.

Nossos resultados da abordagem proteômica revelaram que o isolado de *L. (L.) chagasi* obtido de paciente que apresentou falha ao tratamento com miltefosina, exibiu nível aumentado de proteínas envolvidas na homeostase do sistema redox, resposta ao *stress*, proteção à morte celular programada e na translocação de drogas, as quais provavelmente estão envolvidas na resistência natural à miltefosina.

A abordagem genômica mostrou que nenhum SNP ou InDel identificado neste estudo foi capaz de discriminar completamente os isolados obtidos de pacientes que apresentaram diferentes desfechos clínicos ao tratamento com miltefosina. Entretanto, a análise de variação estrutural destacou que a ausência dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 *in tandem*, pode estar relacionada com o fenótipo de resistência natural à miltefosina em *L. (L.) chagasi*.

Este estudo também mostrou que a perda do locus contendo os genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 *in tandem* ocorre por recombinação homóloga entre sequências repetidas presentes no genoma do parasita *L. (L.) chagasi*, mas aparentemente não é induzida por pressão da droga miltefosina.

As abordagens proteômica e genômica se mostraram técnicas complementares para o estudo do mecanismo de resistência natural à miltefosina no parasita *Leishmania*, sugerindo que esse é complexo e multifatorial.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Analisar a habilidade dos isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina de manter a homeostase do sistema redox, em cultivo sob pressão da miltefosina.

Investigar a influência do aumento da expressão de algumas proteínas destacadas na análise proteômica, em especial àquelas que apresentaram correlação positiva com a análise de variação estrutural de dose gênica (*Chaperonin Hsp60*, *ATPase beta subunit*, *RNA helicase*, *Mitochondrial peroxiredoxin*, *Stress-induced protein sti1*) no fenótipo de resistência à miltefosina em *L. (L.) chagasi*.

Verificar a influência dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400 no perfil de susceptibilidade *in vitro* à miltefosina das formas amastigotas de isolados de *L. (L.) chagasi*.

Verificar se o cultivo de isolados de *L. (L.) chagasi* heterogêneos, quanto à presença dos genes LinJ.31.2370, LinJ.31.2380, LinJ.31.2390 e LinJ.31.2400, sob pressão da miltefosina favorece o crescimento de parasitas com algum genótipo específico.

Identificar alterações no metaboloma dos isolados de *L. (L.) chagasi* obtidos de pacientes que apresentaram diferentes respostas clínicas ao tratamento com miltefosina, com o objetivo de identificar diferenças nos produtos finais da expressão gênica e das atividades enzimáticas, e assim contribuir para entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência natural do parasita à essa droga.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abdelhaleem, M. Helicases: an overview. **Methods Mol Biol**, v.587, p.1-12. 2010.
- Adler-Moore, J. e Proffitt, R. T. Effect of tissue penetration on AmBisome efficacy. **Curr Opin Investig Drugs**, v.4, n.2, p.179-85. 2003.
- Agabian, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v.61, n.7, p.1157-60. 1990.
- Anderson, L. e Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, v.18, n.3-4, p.533-7. 1997.
- Andrade, H. M., Murta, S. M., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirde, P. e Romanha, A. J. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. **J Proteome Res**, v.7, n.6, p.2357-67. 2008.
- Ansorge, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **N Biotechnol**, v.25, n.4, p.195-203. 2009.
- Azzouz, S., Maache, M., Garcia, R. G. e Osuna, A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.96, n.1, p.60-5. 2005.
- Bates, P. A. Characterization of developmentally-regulated nucleases in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **FEMS Microbiol Lett**, v.107, n.1, p.53-8. 1993.
- Beach, D. H., Holz, G. G., Jr. e Anekwe, G. E. Lipids of *Leishmania* promastigotes. **J Parasitol**, v.65, n.2, p.201-16. 1979.
- Beere, H. M. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **J Cell Sci**, v.117, n.Pt 13, p.2641-51. 2004.
- Bente, M., Harder, S., Wiesgigl, M., Heukeshoven, J., Gelhaus, C., Krause, E., Clos, J. e Bruchhaus, I. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Proteomics**, v.3, n.9, p.1811-29. 2003.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Keira Cheetham, R., Cox, A. J., Ellis, D. J., Flatbush, M. R., Gormley, N. A., Humphray, S. J., Irving, L. J., Karbelashvili, M. S., Kirk, S. M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K. S., Murray, L. J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M. L., Pratt, M. R., Rasolonjatovo, I. M., Reed, M. T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M. T., Sabot, A., Sankar, S. V., Scally, A., Schroth, G. P., Smith, M. E., Smith, V. P., Spiridou, A., Torrance, P. E., Tzonev, S. S., Vermaas, E. H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M. D., Anastasi, C., Aniebo, I. C., Bailey, D. M., Bancarz, I. R., Banerjee, S., Barbour, S. G., Baybayan, P. A., Benoit, V. A., Benson, K. F., Bevis, C., Black, P. J., Boodhun, A., Brennan, J. S., Bridgham, J. A., Brown, R. C., Brown, A. A., Buermann, D. H., Bundu, A. A., Burrows, J. C., Carter, N. P., Castillo, N., Chiara, E. C. M., Chang, S., Neil Cooley, R., Crake, N. R., Dada, O. O., Diakoumakos, K. D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D. J., Egbujor, U. C., Elmore, D. W., Etchin, S. S., Ewan, M. R., Fedurco, M., Fraser, L. J., Fuentes Fajardo, K. V., Scott Furey, W., George, D., Gietzen, K. J., Goddard, C. P., Golda, G. S., Granieri, P. A., Green, D. E., Gustafson, D. L., Hansen, N. F., Harnish, K., Haudenschield, C. D., Heyer, N. I., Hims, M. M., Ho, J. T., Horgan, A. M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D. V., Johnson, M. Q., James, T., Huw Jones, T. A., Kang, G. D., Kerelska, T. H., Kersey, A. D., Khrebtukova, I., Kindwall, A. P., Kingsbury, Z., Kokko-

Gonzales, P. I., Kumar, A., Laurent, M. A., Lawley, C. T., Lee, S. E., Lee, X., Liao, A. K., Loch, J. A., Lok, M., Luo, S., Mammen, R. M., Martin, J. W., Mccauley, P. G., Mcnitt, P., Mehta, P., Moon, K. W., Mullens, J. W., Newington, T., Ning, Z., Ling Ng, B., Novo, S. M., O'Neill, M. J., Osborne, M. A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L. L., Pickering, L., Pike, A. C., Pike, A. C., Chris Pinkard, D., Pliskin, D. P., Podhasky, J., Quijano, V. J., Raczy, C., Rae, V. H., Rawlings, S. R., Chiva Rodriguez, A., Roe, P. M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M. C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R. K., Rourke, N. J., Ruediger, S. T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R. M., Schenker, M. R., Seoane, J. M., Shaw, R. J., Shiver, M. K., Short, S. W., Sizto, N. L., Sluis, J. P., Smith, M. A., Ernest Sohna Sohna, J., Spence, E. J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C. L., Turcatti, G., Vandevondele, S., Verhovsky, Y., Virk, S. M., Wakelin, S., Walcott, G. C., Wang, J., Worsley, G. J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J. C., Hurler, M. E., Mccooke, N. J., West, J. S., Oaks, F. L., Lundberg, P. L., Klenerman, D., Durbin, R. e Smith, A. J. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v.456, n.7218, p.53-9. 2008.

Berg, M., Vanaerschot, M., Jankevics, A., Cuypers, B., Maes, I., Mukherjee, S., Khanal, B., Rijal, S., Roy, S., Opperdoes, F., Breitling, R. e Dujardin, J. C. Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. **Mol Microbiol**, v.90, n.2, p.428-42. 2013.

Berman, J. Miltefosine to treat leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, v.6, n.8, p.1381-8. 2005.

Berman, J. D., Gallalee, J. V., Best, J. M. e Hill, T. Uptake, distribution, and oxidation of fatty acids by *Leishmania mexicana* amastigotes. **J Parasitol**, v.73, n.3, p.555-60. 1987.

Bern, C., Maguire, J. H. e Alvar, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.10, p.e313. 2008.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivans, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E. e El-Sayed, N. M. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v.309, n.5733, p.416-22. 2005.

Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H. e Mottram, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int J Parasitol**, v.37, n.10, p.1063-75. 2007.

Beverley, S. M., Coderre, J. A., Santi, D. V. e Schimke, R. T. Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. **Cell**, v.38, n.2, p.431-9. 1984.

Bhattacharya, S. K., Sinha, P. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Jha, T. K., Pandey, K., Das, V. R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V. P., Ranjan, A., Verma, R. B., Anders, G., Sindermann, H. e Ganguly, N. K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.196, n.4, p.591-8. 2007.

Bio-Rad. **2-D Electrophoresis Workflow How-To Guide, Rev F. Bulletin 2651**. Disponível em <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2651.pdf>. Acesso em 22 de jun. 2015.

Biyani, N., Singh, A. K., Mandal, S., Chawla, B. e Madhubala, R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol**, v.179, n.2, p.91-9. 2011.

Borst, P., Zelcer, N. e Van Helvoort, A. ABC transporters in lipid transport. **Biochim Biophys Acta**, v.1486, n.1, p.128-44. 2000.

Bosch, I., Dunussi-Joannopoulos, K., Wu, R. L., Furlong, S. T. e Croop, J. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. **Biochemistry**, v.36, n.19, p.5685-94. 1997.

Brachwitz, H. e Vollgraf, C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. **Pharmacol Ther**, v.66, n.1, p.39-82. 1995.

Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde: Editora MS. Brasília - DF**, p.120. 2014.

Bringaud, F., Muller, M., Cerqueira, G. C., Smith, M., Rochette, A., El-Sayed, N. M., Papadopoulou, B. e Ghedin, E. Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. **PLoS Pathog**, v.3, n.9, p.1291-307. 2007.

Britto, C., Ravel, C., Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M., Dedet, J. P. e Wincker, P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v.222, n.1, p.107-17. 1998.

Burk, K., David, M., Junge, K. e Sindermann, H. Overview on the clinical development of miltefosine solution (Miltex) for the treatment of cutaneous breast cancer. **Drug Today**, v.30, p.59-72. 1994.

Campbell, T. A., Zlotnick, G. W., Neubert, T. A., Sacci, J. B., Jr. e Gottlieb, M. Purification and characterization of the 3'-nucleotidase/nuclease from promastigotes of *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol**, v.47, n.1, p.109-17. 1991.

Carnielli, J. B. T. **Análise Proteômica de Isolados de *Leishmania (Leishmania) chagasi* Sensíveis e Resistentes à Miltefosina**. (Mestrado). Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011. 110 p.

Carter, K. C., Hutchison, S., Henriquez, F. L., Legare, D., Ouellette, M., Roberts, C. W. e Mullen, A. B. Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.1, p.88-95. 2006.

- Castanys-Munoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F. e Castanys, S. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. **Mol Microbiol**, v.64, n.5, p.1141-53. 2007.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. e Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v.5, n.11, p.873-82. 2007.
- Chaudhuri, G., Chatterjee, T. K. e Banerjee, A. B. Growth factor requirements for *in vitro* growth of *Leishmania donovani*. **Indian J Med Res**, v.76, p.157-63. 1982.
- Chawla, B., Jhingran, A., Panigrahi, A., Stuart, K. D. e Madhubala, R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin - susceptible -resistant *Leishmania donovani*. **PLoS One**, v.6, n.10, p.e26660. 2011.
- Chrusciak-Talhari, A., Dietze, R., Chrusciak Talhari, C., Da Silva, R. M., Gadelha Yamashita, E. P., De Oliveira Penna, G., Lima Machado, P. R. e Talhari, S. Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.84, n.2, p.255-60. 2011.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang Le, L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X. e Ruden, D. M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. **Fly (Austin)**, v.6, n.2, p.80-92. 2012.
- Clayton, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, v.21, n.8, p.1881-8. 2002.
- Cock, P. J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L. e Rice, P. M. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. **Nucleic Acids Res**, v.38, n.6, p.1767-71. 2010.
- Coelho, A. C., Boisvert, S., Mukherjee, A., Leprohon, P., Corbeil, J. e Ouellette, M. Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, n.2, p.e1512. 2012.
- Cojean, S., Houze, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., Michard, F., Bories, C., Pratlong, F., Le Bras, J., Loiseau, P. M. e Matheron, S. *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. **Emerg Infect Dis**, v.18, n.4, p.704-6. 2012.
- Colotti, G. e Ilari, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v.40, n.2, p.269-85. 2011.
- Coombs, G. H., Craft, J. A. e Hart, D. T. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. **Mol Biochem Parasitol**, v.5, n.3, p.199-211. 1982.
- Costa, M. M., Andrade, H. M., Bartholomeu, D. C., Freitas, L. M., Pires, S. F., Chapeaurouge, A. D., Perales, J., Ferreira, A. T., Giusta, M. S., Melo, M. N. e Gazzinelli, R. T. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **J Proteome Res**, v.10, n.5, p.2172-84. 2011.

- Croft, S. L. e Coombs, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v.19, n.11, p.502-8. 2003.
- Croft, S. L. e Engel, J. Miltefosine – discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100 Suppl 1, p.S4-S8. 2006.
- Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W. e Chan, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem Pharmacol**, v.36, n.16, p.2633-6. 1987.
- Croft, S. L., Snowdon, D. e Yardley, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J Antimicrob Chemother**, v.38, n.6, p.1041-7. 1996.
- Croft, S. L., Sundar, S. e Fairlamb, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.1, p.111-26. 2006.
- Cunha, A. M. e Chagas, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem, *Leishmania chagasi*. **O Hospital**, v.11, p.3-9. 1937.
- Da Fonseca Pires, S., Fialho, L. C., Jr., Silva, S. O., Melo, M. N., De Souza, C. C., Tafuri, W. L., Bruna Romero, O. e De Andrade, H. M. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. **J Proteome Res**, v.13, n.4, p.1860-72. 2014.
- Daneshvar, H., Wyllie, S., Phillips, S., Hagan, P. e Burchmore, R. Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. **J Proteomics**, v.75, n.5, p.1463-71. 2012.
- Dang, H. Q. e Li, Z. The Cdc45.Mcm2-7.GINS protein complex in trypanosomes regulates DNA replication and interacts with two Orc1-like proteins in the origin recognition complex. **J Biol Chem**, v.286, n.37, p.32424-35. 2011.
- Das, M., Saudagar, P., Sundar, S. e Dubey, V. K. Miltefosine unresponsive *Leishmania donovani* has better ability of resist reactive oxygen species. **FEBS J**. 2013.
- Depristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., Philippakis, A. A., Del Angel, G., Rivas, M. A., Hanna, M., McKenna, A., Fennell, T. J., Kernytsky, A. M., Sivachenko, A. Y., Cibulskis, K., Gabriel, S. B., Altshuler, D. e Daly, M. J. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nat Genet**, v.43, n.5, p.491-8. 2011.
- Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P. e Reid, G. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. **J Microbiol Methods**, v.95, n.3, p.401-14. 2013.
- Di Giorgio, C., Faraut-Gambarelli, F., Imbert, A., Minodier, P., Gasquet, M. e Dumon, H. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v.44, n.1, p.71-6. 1999.
- Downing, T., Imamura, H., Decuypere, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., Cotton, J. A., Hilley, J. D., De Doncker, S., Maes, I., Mottram, J. C., Quail, M. A., Rijal, S., Sanders, M., Schonian, G., Stark, O., Sundar, S., Vanaerschot, M., Hertz-Fowler, C., Dujardin, J. C. e Berriman, M. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides

- insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Res**, v.21, n.12, p.2143-56. 2011.
- Droge, W. The plasma redox state and ageing. **Ageing Res Rev**, v.1, n.2, p.257-78. 2002.
- Drummelsmith, J., Brochu, V., Girard, I., Messier, N. e Ouellette, M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Mol Cell Proteomics**, v.2, n.3, p.146-55. 2003.
- Drummelsmith, J., Girard, I., Trudel, N. e Ouellette, M. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. **J Biol Chem**, v.279, n.32, p.33273-80. 2004.
- Durand, R., Paul, M., Pratlong, F., Rivollet, D., Dubreuil-Lemaire, M. L., Houin, R., Astier, A. e Deniau, M. *Leishmania infantum*: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.8, p.2141-3. 1998.
- Dwyer, D. M. e Gottlieb, M. Surface membrane localization of 3'- and 5'-nucleotidase activities in *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v.10, n.2, p.139-50. 1984.
- Ea-Utils. **Erik Aronesty (2011). Command-line tools for processing biological sequencing data**. Disponível em <<http://code.google.com/p/ea-utils>>. Acesso em 16 de jun. 2014.
- Eibl, H. e Unger, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. **Cancer Treat Rev**, v.17, n.2-3, p.233-42. 1990.
- El Fadili, K., Drummelsmith, J., Roy, G., Jardim, A. e Ouellette, M. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. **Exp Parasitol**, v.123, n.1, p.51-7. 2009.
- El Fakhry, Y., Ouellette, M. e Papadopoulou, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v.2, n.8, p.1007-17. 2002.
- Engel, J. Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country - TDR - pharmaceutical industry (Zentaris). **TDR News**, v.68, p.5. 2002.
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C. e Croft, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop**, v.81, n.2, p.151-7. 2002.
- Escobar, P., Yardley, V. e Croft, S. L. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.6, p.1872-5. 2001.
- Eue, I., Zeisig, R. e Arndt, D. Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U 937 cells. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.121, n.6, p.350-6. 1995.

- Fairman-Williams, M. E., Guenther, U. P. e Jankowsky, E. SF1 and SF2 helicases: family matters. **Curr Opin Struct Biol**, v.20, n.3, p.313-24. 2010.
- Farajnia, S., Alimohammadian, M. H., Reiner, N. E., Karimi, M., Ajdari, S. e Mahboudi, F. Molecular characterization of a novel amastigote stage specific Class I nuclease from *Leishmania major*. **Int J Parasitol**, v.34, n.8, p.899-908. 2004.
- Folgueira, C. e Requena, J. M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiol Rev**, v.31, n.4, p.359-77. 2007.
- Ganguly, N. K. Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. **TDR News**, n.68, p.2. 2002.
- Gargantini, P. R., Lujan, H. D. e Pereira, C. A. *In silico* analysis of trypanosomatids' helicases. **FEMS Microbiol Lett**, v.335, n.2, p.123-9. 2012.
- Gibson, W. C., Swinkels, B. W. e Borst, P. Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. **J Mol Biol**, v.201, n.2, p.315-25. 1988.
- Goad, L. J., Holz, G. G., Jr. e Beach, D. H. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. **Mol Biochem Parasitol**, v.10, n.2, p.161-70. 1984.
- Gomes, R. A., Sousa Silva, M., Vicente Miranda, H., Ferreira, A. E., Cordeiro, C. A. e Freire, A. P. Protein glycation in *Saccharomyces cerevisiae*. Argpyrimidine formation and methylglyoxal catabolism. **FEBS J**, v.272, n.17, p.4521-31. 2005.
- Gorg, A., Weiss, W. e Dunn, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, n.12, p.3665-85. 2004.
- Gottlieb, M. e Dwyer, D. M. Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v.7, n.4, p.303-17. 1983.
- Gradoni, L., Soteriadou, K., Louzir, H., Dakkak, A., Toz, S. O., Jaffe, C., Dedet, J. P., Campino, L., Canavate, C. e Dujardin, J. C. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. **Trop Med Int Health**, v.13, n.10, p.1272-6. 2008.
- Grondin, K., Roy, G. e Ouellette, M. Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*. **Mol Cell Biol**, v.16, n.7, p.3587-95. 1996.
- Guimaraes-Costa, A. B., Desouza-Vieira, T. S., Paletta-Silva, R., Freitas-Mesquita, A. L., Meyer-Fernandes, J. R. e Saraiva, E. M. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infect Immun**, v.82, n.4, p.1732-40. 2014.
- Guina, T., Wu, M., Miller, S. I., Purvine, S. O., Yi, E. C., Eng, J., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Ernst, R. K. e Lee, K. A. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. **J Am Soc Mass Spectrom**, v.14, n.7, p.742-51. 2003.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. e Aebersold, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol**, v.19, n.3, p.1720-30. 1999.

- Haile, S. e Papadopoulou, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr Opin Microbiol**, v.10, n.6, p.569-77. 2007.
- Hammond, D. J. e Gutteridge, W. E. Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. **Mol Biochem Parasitol**, v.13, n.3, p.243-61. 1984.
- Handman, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p.229-43. 2001.
- Harder, S., Bente, M., Isermann, K. e Bruchhaus, I. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryot Cell**, v.5, n.5, p.861-70. 2006.
- Hart, D. T. e Opperdoes, F. R. The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. **Mol Biochem Parasitol**, v.13, n.2, p.159-72. 1984.
- Hassan, H. F. e Coombs, G. H. Phosphomonoesterases of *Leishmania mexicana mexicana* and other flagellates. **Mol Biochem Parasitol**, v.23, n.3, p.285-96. 1987.
- Hiltunen, J. K. e Qin, Y. beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. **Biochim Biophys Acta**, v.1484, n.2-3, p.117-28. 2000.
- Hochhuth, C. H., Vehmeyer, K., Eibl, H. e Unger, C. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. **Cell Immunol**, v.141, n.1, p.161-8. 1992.
- Hofmann, B., Hecht, H. J. e Flohe, L. Peroxiredoxins. **Biol Chem**, v.383, n.3-4, p.347-64. 2002.
- Hombach, A., Ommen, G., Chrobak, M. e Clos, J. The Hsp90-Sti1 interaction is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. **Cell Microbiol**. 2012.
- Howard, M. K., Pharoah, M. M., Ashall, F. e Miles, M. A. Human urine stimulates growth of *Leishmania in vitro*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.85, n.4, p.477-9. 1991.
- Huang, X. C., Quesada, M. A. e Mathies, R. A. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. **Anal Chem**, v.64, n.18, p.2149-54. 1992.
- Hubel, A. e Clos, J. The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. **Exp Parasitol**, v.82, n.2, p.225-8. 1996.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarlioni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M.,

Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B. e Myler, P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v.309, n.5733, p.436-42. 2005.

Jensen, O. N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Curr Opin Chem Biol**, v.8, n.1, p.33-41. 2004.

Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., Voss, A. e Berman, J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.341, n.24, p.1795-800. 1999.

Kabani, S., Fenn, K., Ross, A., Ivens, A., Smith, T. K., Ghazal, P. e Matthews, K. Genome-wide expression profiling of *in vivo*-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. **BMC Genomics**, v.10, p.427. 2009.

Kambara, H. e Takahashi, S. Multiple-sheathflow capillary array DNA analyser. **Nature**, v.361, n.6412, p.565-6. 1993.

Kan, B., Habibi, H., Schmid, M., Liang, W., Wang, R., Wang, D. e Jungblut, P. R. Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. **Proteomics**, v.4, n.10, p.3061-7. 2004.

Kim, S., Yoo, H. J. e Hahn, J. H. Postelectrophoresis capillary scanning method for DNA sequencing. **Anal Chem**, v.68, n.5, p.936-9. 1996.

Kircher, M. e Kelso, J. High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. **Bioessays**, v.32, n.6, p.524-36. 2010.

Kothari, H., Kumar, P., Sundar, S. e Singh, N. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. **Parasitol Int**, v.56, n.1, p.77-80. 2007.

Kramer, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. **Mol Biochem Parasitol**, v.181, n.2, p.61-72. 2012.

Kuhlencord, A., Maniera, T., Eibl, H. e Unger, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, n.8, p.1630-4. 1992.

Kulshrestha, A., Bhandari, V., Mukhopadhyay, R., Ramesh, V., Sundar, S., Maes, L., Dujardin, J. C., Roy, S. e Salotra, P. Validation of a simple resazurin-based promastigote assay for the routine monitoring of miltefosine susceptibility in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Parasitol Res**, v.112, n.2, p.825-8. 2013.

Kulshrestha, A., Sharma, V., Singh, R. e Salotra, P. Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*. **Parasitol Res**, v.113, n.3, p.1171-84. 2014.

Kumar, A., Sisodia, B., Misra, P., Sundar, S., Shasany, A. K. e Dube, A. Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate

(SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. **Br J Clin Pharmacol**, v.70, n.4, p.609-17. 2010.

Lachaud, L., Bourgeois, N., Plourde, M., Leprohon, P., Bastien, P. e Ouellette, M. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. **Clin Infect Dis**, v.48, n.2, p.e16-22. 2009.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-5. 1970.

Laisson, R. e Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London. 1: 1-120 p. 1987.

Langmead, B. e Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, v.9, n.4, p.357-9. 2012.

Lassle, M., Blatch, G. L., Kundra, V., Takatori, T. e Zetter, B. R. Stress-inducible, murine protein mST11. Characterization of binding domains for heat shock proteins and *in vitro* phosphorylation by different kinases. **J Biol Chem**, v.272, n.3, p.1876-84. 1997.

Laveran, A. e Mesnil, F. Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani*). Parasite d'une fièvre de l'Inde. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences**, v.137, p.957-961. 1903.

Le Fichoux, Y., Rousseau, D., Ferrua, B., Ruetter, S., Lelievre, A., Grousson, D. e Kubar, J. Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.3, p.654-8. 1998.

Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R. e Nakhasi, H. L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death Differ**, v.9, n.1, p.53-64. 2002.

Leprohon, P., Legare, D., Raymond, F., Madore, E., Hardiman, G., Corbeil, J. e Ouellette, M. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. **Nucleic Acids Res**, v.37, n.5, p.1387-99. 2009.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. e Genome Project Data Processing, S. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v.25, n.16, p.2078-9. 2009.

Lira, R., Contreras, L. M., Rita, R. M. e Urbina, J. A. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **J Antimicrob Chemother**, v.47, n.5, p.537-46. 2001.

Liu, B., Wang, J., Yaffe, N., Lindsay, M. E., Zhao, Z., Zick, A., Shlomai, J. e Englund, P. T. Trypanosomes have six mitochondrial DNA helicases with one controlling kinetoplast maxicircle replication. **Mol Cell**, v.35, n.4, p.490-501. 2009a.

Liu, B., Wang, J., Yildirim, G. e Englund, P. T. TbPIF5 is a *Trypanosoma brucei* mitochondrial DNA helicase involved in processing of minicircle Okazaki fragments. **PLoS Pathog**, v.5, n.9, p.e1000589. 2009b.

Liu, B., Yildirim, G., Wang, J., Tolun, G., Griffith, J. D. e Englund, P. T. TbPIF1, a *Trypanosoma brucei* mitochondrial DNA helicase, is essential for kinetoplast minicircle replication. **J Biol Chem**, v.285, n.10, p.7056-66. 2010.

Lukes, J., Mauricio, I. L., Schonian, G., Dujardin, J. C., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Kuhls, K., Tintaya, K. W., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, F. J. e Miles, M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n.22, p.9375-80. 2007.

Luque-Ortega, J. R. e Rivas, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.4, p.1327-32. 2007.

Lux, H., Hart, D. T., Parker, P. J. e Klenner, T. Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipid analogues. **Adv Exp Med Biol**, v.416, p.201-11. 1996.

Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D. e Opperdoes, F. R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v.111, n.1, p.1-14. 2000.

Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E. e Tschudi, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v.6, n.2, p.163-9. 2000.

Maltezou, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**, v.2010, p.617521. 2010.

Maltezou, H. C., Siafas, C., Mavrikou, M., Spyridis, P., Stavrinadis, C., Karpathios, T. e Kafetzis, D. A. Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece. **Clin Infect Dis**, v.31, n.5, p.1139-43. 2000.

Mardis, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v.9, p.387-402. 2008.

Matrangolo, F. S., Liarte, D. B., Andrade, L. C., De Melo, M. F., Andrade, J. M., Ferreira, R. F., Santiago, A. S., Pirovani, C. P., Silva-Pereira, R. A. e Murta, S. M. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. **Mol Biochem Parasitol**, v.190, n.2, p.63-75. 2013.

Mcatee, C. P., Hoffman, P. S. e Berg, D. E. Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques. **Proteomics**, v.1, n.4, p.516-21. 2001.

Mcconville, M. J., Mullin, K. A., Ilgutz, S. C. e Teasdale, R. D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, n.1, p.122-54. 2002.

- Mcnicoll, F., Drummelsmith, J., Muller, M., Madore, E., Boilard, N., Ouellette, M. e Papadopoulou, B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v.6, n.12, p.3567-81. 2006.
- Minoche, A. E., Dohm, J. C. e Himmelbauer, H. Evaluation of genomic high-throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and genome analyzer systems. **Genome Biol**, v.12, n.11, p.R112. 2011.
- Minodier, P., Piarroux, R., Garnier, J. M., Unal, D., Perrimond, H. e Dumon, H. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. **Pediatr Infect Dis J**, v.17, n.8, p.701-4. 1998.
- Mißlitz, A., Mottram, J. C., Overath, P. e Aebischer, T. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v.107, n.2, p.251-61. 2000.
- Mojtahedi, Z., Clos, J. e Kamali-Sarvestani, E. *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Exp Parasitol**, v.119, n.3, p.422-9. 2008.
- Monge-Maillo, B. e Lopez-Velez, R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clin Infect Dis**, v.60, n.9, p.1398-404. 2015.
- Monti-Rocha, R. **Correlação entre sensibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Leishmania chagasi* à miltefosina e resposta ao tratamento**. Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012. 77 p.
- Moore, E. M. e Lockwood, D. N. Treatment of visceral leishmaniasis. **J Glob Infect Dis**, v.2, n.2, p.151-8. 2010.
- Moreira, W., Leprohon, P. e Ouellette, M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. **Cell Death Dis**, v.2, p.e201. 2011.
- Murray, H. W. e Delph-Etienne, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. **J Infect Dis**, v.181, n.2, p.795-9. 2000.
- Nathan, C. e Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.16, p.8841-8. 2000.
- Nature. **Genomic analysis**. Disponível em <<http://www.nature.com/subjects/genomic-analysis>>. Acesso em 10 de abr. 2015.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. e Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, n.6, p.255-62. 1988.
- Nicolle, C. Nouvelles acquisitions sur le Kala-azar: cultures, inoculations auchien, étiologie. **C R Acad Sci Paris**, v.146, p.498-499. 1908.

Nicolle, C. e Comte, C. Origine Canine du Kala-azar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, p.299-301. 1908.

Novy, F. G. e Mcneal, W. J. The cultivation of *trypanosoma brucei*. A preliminary note. **J Am Med Assoc**, v.XLI, n.21, p.1266-1268. 1903.

O'farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v.250, n.10, p.4007-21. 1975.

Opperdoes, F. R. e Coombs, G. H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends Parasitol**, v.23, n.4, p.149-58. 2007.

Opperdoes, F. R. e Szikora, J. P. *In silico* prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol**, v.147, n.2, p.193-206. 2006.

Ouellette, M., Hettema, E., Wust, D., Fase-Fowler, F. e Borst, P. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. **EMBO J**, v.10, n.4, p.1009-16. 1991.

Pagliano, P., Carannante, N., Rossi, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Faella, F. S. e Gaeta, G. B. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.2, p.229-33. 2005.

Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C. e Breard, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.3, p.852-9. 2004.

Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R., Barrell, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C., Smith, D. F. e Berriman, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet**, v.39, n.7, p.839-47. 2007.

Perez-Victoria, F. J., Castanys, S. e Gamarro, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.8, p.2397-403. 2003a.

Perez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M. e Castanys, S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. **J Biol Chem**, v.278, n.50, p.49965-71. 2003b.

Perez-Victoria, F. J., Sanchez-Canete, M. P., Castanys, S. e Gamarro, F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **J Biol Chem**, v.281, n.33, p.23766-75. 2006a.

Perez-Victoria, F. J., Sanchez-Canete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., Castanys, S. e Gamarro, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resist Updat**, v.9, n.1-2, p.26-39. 2006b.

- Perez-Victoria, J. M., Perez-Victoria, F. J., Parodi-Talice, A., Jimenez, I. A., Ravelo, A. G., Castanys, S. e Gamarro, F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.9, p.2468-74. 2001.
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., Van Meer, G. e Holthuis, J. C. Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. **Mol Biol Cell**, v.14, n.3, p.1240-54. 2003.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I., Daly, M. J. e Sham, P. C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **Am J Hum Genet**, v.81, n.3, p.559-75. 2007.
- Raguenaud, M. E., Jansson, A., Vanlerberghe, V., Deborggraeve, S., Dujardin, J. C., Ofanos, G., Reid, T. e Boelaert, M. Epidemiology and clinical features of patients with visceral leishmaniasis treated by an MSF clinic in Bakool region, Somalia, 2004-2006. **PLoS Negl Trop Dis**, v.1, n.1, p.e85. 2007.
- Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M. e Loiseau, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.7, p.2677-86. 2005.
- Reid, M. F. e Fewson, C. A. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. **Crit Rev Microbiol**, v.20, n.1, p.13-56. 1994.
- Ritt, J. F., Raymond, F., Leprohon, P., Legare, D., Corbeil, J. e Ouellette, M. Gene amplification and point mutations in pyrimidine metabolic genes in 5-fluorouracil resistant *Leishmania infantum*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, n.11, p.e2564. 2013.
- Rittig, M. G. e Bogdan, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**, v.16, n.7, p.292-7. 2000.
- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J. C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Fowler, C. e Mottram, J. C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res**, v.21, n.12, p.2129-42. 2011.
- Rybczynska, M., Liu, R., Lu, P., Sharom, F. J., Steinfelds, E., Pietro, A. D., Spitaler, M., Grunicke, H. e Hofmann, J. MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. **Br J Cancer**, v.84, n.10, p.1405-11. 2001.
- Safa, O., Parkin, S. M., Matthew, A. M. e Bibby, M. C. Morphological and immunological observations on the effects of hexadecylphosphocholine (HPC) in nude mice bearing MT-1 breast cancer xenografts. **Anticancer Res**, v.17, n.1A, p.37-43. 1997.
- Sanchez-Canete, M. P., Carvalho, L., Perez-Victoria, F. J., Gamarro, F. e Castanys, S. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.4, p.1305-13. 2009.

Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. e Smith, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v.265, n.5596, p.687-95. 1977.

Santa-Rita, R. M., Barbosa, H. S. e De Castro, S. L. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res**, v.100, n.1, p.187-90. 2006.

Santa-Rita, R. M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H. S. e De Castro, S. L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob Chemother**, v.54, n.4, p.704-10. 2004.

Santa-Rita, R. M., Lira, R., Barbosa, H. S., Urbina, J. A. e De Castro, S. L. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.5, p.780-4. 2005.

Santa-Rita, R. M., Santos Barbosa, H., Meirelles, M. N. e De Castro, S. L. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v.75, n.2, p.219-28. 2000.

Segatto, M., Ribeiro, L. S., Costa, D. L., Costa, C. H., Oliveira, M. R., Carvalho, S. F., Macedo, A. M., Valadares, H. M., Dietze, R., Brito, C. F. e Lemos, E. M. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107, n.1, p.39-47. 2012.

Seifert, K., Matu, S., Javier Perez-Victoria, F., Castanys, S., Gamarro, F. e Croft, S. L. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **Int J Antimicrob Agents**, v.22, n.4, p.380-7. 2003.

Seifert, K., Perez-Victoria, F. J., Stettler, M., Sanchez-Canete, M. P., Castanys, S., Gamarro, F. e Croft, S. L. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. **Int J Antimicrob Agents**, v.30, n.3, p.229-35. 2007.

Sharma, S., Singh, G., Chavan, H. D. e Dey, C. S. Proteomic analysis of wild type and arsenite-resistant *Leishmania donovani*. **Exp Parasitol**, v.123, n.4, p.369-76. 2009.

Sindermann, H., Engel, K. R., Fischer, C. e Bommer, W. Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. **Clin Infect Dis**, v.39, n.10, p.1520-3. 2004.

Singh, G., Chavan, H. D. e Dey, C. S. Proteomic analysis of miltefosine-resistant *Leishmania* reveals the possible involvement of eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). **Int J Antimicrob Agents**, v.31, n.6, p.584-6. 2008.

Singh, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Indian J Med Res**, v.123, n.3, p.411-22. 2006.

Singh, V. K., Jayaswal, R. K. e Wilkinson, B. J. Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. **FEMS Microbiol Lett**, v.199, n.1, p.79-84. 2001.

- Singleton, M. R., Dillingham, M. S. e Wigley, D. B. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. **Annu Rev Biochem**, v.76, p.23-50. 2007.
- Smith, M., Bringaud, F. e Papadopoulou, B. Organization and evolution of two SIDER retroposon subfamilies and their impact on the *Leishmania* genome. **BMC Genomics**, v.10, p.240. 2009.
- Sopwith, W. F., Debrabant, A., Yamage, M., Dwyer, D. M. e Bates, P. A. Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in *Leishmania mexicana*. **Int J Parasitol**, v.32, n.4, p.449-59. 2002.
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J. e Sindermann, H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v.38, n.9, p.1266-72. 2004.
- Soto, J., Rea, J., Balderrama, M., Toledo, J., Soto, P., Valda, L. e Berman, J. D. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.78, n.2, p.210-1. 2008.
- Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P. e Pages, M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. **Mol Microbiol**, v.86, n.1, p.15-23. 2012.
- Sterkers, Y., Lachaud, L., Crobu, L., Bastien, P. e Pages, M. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. **Cell Microbiol**, v.13, n.2, p.274-83. 2011.
- Sundar, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**, v.6, n.11, p.849-54. 2001.
- Sundar, S., Chakravarty, J., Rai, V. K., Agrawal, N., Singh, S. P., Chauhan, V. e Murray, H. W. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clin Infect Dis**, v.45, n.5, p.556-61. 2007.
- Sundar, S. e Chatterjee, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**, v.123, n.3, p.345-52. 2006.
- Sundar, S., Gupta, L. B., Makharia, M. K., Singh, M. K., Voss, A., Rosenkaimer, F., Engel, J. e Murray, H. W. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. **Ann Trop Med Parasitol**, v.93, n.6, p.589-97. 1999.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A. e Berman, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.347, n.22, p.1739-46. 2002a.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Mishra, M., Singh, V. R. e Buffels, R. Low-dose liposomal amphotericin B in refractory Indian visceral leishmaniasis: a multicenter study. **Am J Trop Med Hyg**, v.66, n.2, p.143-6. 2002b.
- Sundar, S., Mehta, H., Suresh, A. V., Singh, S. P., Rai, M. e Murray, H. W. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations. **Clin Infect Dis**, v.38, n.3, p.377-83. 2004.

Sundar, S., More, D. K., Singh, M. K., Singh, V. P., Sharma, S., Makharia, A., Kumar, P. C. e Murray, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, v.31, n.4, p.1104-7. 2000.

Sundar, S., Rosenkaimer, F., Makharia, M. K., Goyal, A. K., Mandal, A. K., Voss, A., Hilgard, P. e Murray, H. W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **Lancet**, v.352, n.9143, p.1821-3. 1998.

Thakur, C. P. e Narayan, S. A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v.98, n.2, p.129-38. 2004.

Thakur, C. P., Pandey, A. K., Sinha, G. P., Roy, S., Behbehani, K. e Olliaro, P. Comparison of three treatment regimens with liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in India: a randomized dose-finding study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.90, n.3, p.319-22. 1996.

Thakur, C. P., Singh, R. K., Hassan, S. M., Kumar, R., Narain, S. e Kumar, A. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.93, n.3, p.319-23. 1999.

Thakur, C. P., Sinha, P. K., Singh, R. K., Hassan, S. M. e Narain, S. Miltefosine in a case of visceral leishmaniasis with HIV co-infection; and rising incidence of this disease in India. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.94, n.6, p.696-7. 2000.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L. e Pachter, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat Protoc**, v.7, n.3, p.562-78. 2012.

Tripp, C. A., Myler, P. J. e Stuart, K. A DNA sequence (LD1) which occurs in several genomic organizations in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v.47, n.2, p.151-6. 1991.

Tritypdb. **TriTrypDB - Kinetoplastid Genomics Resource**. Disponível em <<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>>. Acesso em 12 de Abr. 2015.

Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M. e Tairi, A. P. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Res**, v.36, n.4, p.e25. 2008.

Ubeda, J. M., Legare, D., Raymond, F., Ouameur, A. A., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Tremblay, M. J., Olivier, M., Papadopoulou, B. e Ouellette, M. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. **Genome Biol**, v.9, n.7, p.R115. 2008.

Ubeda, J. M., Raymond, F., Mukherjee, A., Plourde, M., Gingras, H., Roy, G., Lapointe, A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Corbeil, J. e Ouellette, M. Genome-wide stochastic adaptive DNA amplification at direct and inverted DNA repeats in the parasite *Leishmania*. **PLoS Biol**, v.12, n.5, p.e1001868. 2014.

Unger, C. M., T.; Kaufmann-Kolle, P.; Eibl, H. *In vivo* antileishmanial activity of hexadecylphosphocholine and other alkylphosphocholines. **Drugs of Today**, v.34, n.(Suppl. F), p.133. 1998.

- Unlu, M., Morgan, M. E. e Minden, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v.18, n.11, p.2071-7. 1997.
- Van Der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., Banks, E., Garimella, K. V., Altshuler, D., Gabriel, S. e DePristo, M. A. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. **Curr Protoc Bioinformatics**, v.11, n.1110, p.11 10 1-11 10 33. 2013.
- Van Der Sanden, M. H., Houweling, M., Duijsings, D., Vaandrager, A. B. e Van Golde, L. M. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis is not the primary pathway in hexadecylphosphocholine-induced apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1636, n.2-3, p.99-107. 2004.
- Van Hellemond, J. J. e Tielens, A. G. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v.85, n.1, p.135-8. 1997.
- Vehmeier, K., Scheurich, P., Eibl, H. e Unger, C. Hexadecylphosphocholine-mediated enhancement of T-cell responses to interleukin 2. **Cell Immunol**, v.137, n.1, p.232-8. 1991.
- Vercauteren, F. G., Arckens, L. e Quirion, R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. **Amino Acids**, v.33, n.3, p.405-14. 2007.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J. e Ouellette, M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. **Mol Cell Proteomics**, v.6, n.1, p.88-101. 2007.
- Vergote, D., Bouchut, A., Sautiere, P. E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M. e Mitta, G. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. **Int J Parasitol**, v.35, n.2, p.215-24. 2005.
- Verma, N. K. e Dey, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.8, p.3010-5. 2004.
- Verma, N. K., Singh, G. e Dey, C. S. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. **Exp Parasitol**, v.116, n.1, p.1-13. 2007.
- Vickers, T. J., Greig, N. e Fairlamb, A. H. A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.36, p.13186-91. 2004a.
- Vickers, T. J., Wyllie, S. e Fairlamb, A. H. *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. **J Biol Chem**, v.279, n.47, p.49003-9. 2004b.
- Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S. e Saha, B. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. **J Immunol**, v.182, n.11, p.7146-54. 2009.

Walker, J., Gongora, R., Vasquez, J. J., Drummelsmith, J., Burchmore, R., Roy, G., Ouellette, M., Gomez, M. A. e Saravia, N. G. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. **Mol Biochem Parasitol**, v.183, n.2, p.166-76. 2012.

Wang, J., Englund, P. T. e Jensen, R. E. TbPIF8, a *Trypanosoma brucei* protein related to the yeast Pif1 helicase, is essential for cell viability and mitochondrial genome maintenance. **Mol Microbiol**, v.83, n.3, p.471-85. 2012.

Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L. e Humphery-Smith, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v.16, n.7, p.1090-4. 1995.

Wassef, M. K., Fioretti, T. B. e Dwyer, D. M. Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. **Lipids**, v.20, n.2, p.108-15. 1985.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n.949, p.xii-xiii, 1-186, back cover. 2010.

WHO. World Health Organization. **Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NDT)**. Disponível em <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png>. Acesso em 22 de jun. 2015.

Wikipedia. **Leishmaniasis**. Disponível em <<http://en.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis>>. Acesso em 20 de nov. 2010.

Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A. e Kelly, J. M. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v.275, n.11, p.8220-5. 2000.

Wilson, C. M. Plant nucleases: biochemistry and development of multiple molecular forms. **Isozymes Curr Top Biol Med Res**, v.6, p.33-54. 1982.

Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J. P. e Bastien, P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Res**, v.24, n.9, p.1688-94. 1996.

Wood, Z. A., Poole, L. B. e Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v.300, n.5619, p.650-3. 2003.

Wyllie, S., Vickers, T. J. e Fairlamb, A. H. Roles of trypanothione S-transferase and trypanothione peroxidase in resistance to antimonials. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.4, p.1359-65. 2008.

Yardley, V., Croft, S. L., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Koirala, S., Rijal, S., Miranda, C., Llanos-Cuentas, A. e Chappuis, F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, n.2, p.272-5. 2005.

Zagursky, R. J. e McCormick, R. M. DNA sequencing separations in capillary gels on a modified commercial DNA sequencing instrument. **Biotechniques**, v.9, n.1, p.74-9. 1990.

Zeisig, R., Rudolf, M., Eue, I. e Arndt, D. Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages *in vitro*. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.121, n.2, p.69-75. 1995.

Zhang, X. e Moye-Rowley, W. S. *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance gene expression inversely correlates with the status of the F(0) component of the mitochondrial ATPase. **J Biol Chem**, v.276, n.51, p.47844-52. 2001.

Zheng, L., T'kind, R., Decuypere, S., Von Freyend, S. J., Coombs, G. H. e Watson, D. G. Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.24, n.14, p.2074-82. 2010.

Zufferey, R. e Mamoun, C. B. Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogs. **Mol Biochem Parasitol**, v.125, n.1-2, p.127-34. 2002.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1 – DADOS DA ANÁLISE GENÔMICA DE CNV

Tabela A1 – Grupos ortólogos/Genes com variação no número de cópias (dose gênica) entre os isolados de *L. (L.) chagasi* dos grupos cura e recidiva (p < 0,05).

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | | |
|------------------|--|---|----------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------|----------------------|----------------------|------------|------------|-------|-------|-------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | | | | PI-11 A | PI-12 A | | | |
| OG5_128581 | LinJ.34.2100 | clathrin coat assembly protein AP17, putative | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,010 | 0,012 |
| OG5_LinJ.22.0002 | LinJ.22.0002 | hypothetical protein | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,010 | 0,012 | |
| OG5_126624 | LinJ.31.2560 | uridine kinase-like protein | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,010 | 0,012 | | |
| OG5_148059 | LinJ.19.0630 | histone H3 variant, putative | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 7,81 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,010 | 0,009 | | |
| OG5_151479 | LinJ.11.0800 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,36 | 2,85 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,041 | 0,038 | | |
| OG5_148814 | LinJ.28.0780 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,38 | 1,15 | 1,25 | 0,00 | 3,01 | 1,05 | 0,00 | 1,97 | 0,96 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,11 | 2,72 | 3,86 | 0,54 | 0,99 | 1,65 | 5,26 | 1,06 | 1,79 | 3,84 | 1,20 | 1,85 | 1,49 | 0,39 | 0,010 | 0,008 | | | |
| OG5_151424 | LinJ.02.0030 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,95 | 0,91 | 0,84 | 0,77 | 2,18 | 0,78 | 3,88 | 2,30 | 0,77 | 2,03 | 0,90 | 0,00 | 0,00 | 1,72 | 1,41 | 0,00 | 3,55 | 2,38 | 1,31 | 4,03 | 1,59 | 4,35 | 2,98 | 1,91 | 4,73 | 1,17 | 0,53 | 0,025 | 0,023 | | | |
| OG5_173553 | LinJ.29.1450 | amastin-like protein | 1 | 2,05 | 1,88 | 1,03 | 1,46 | 2,60 | 1,65 | 1,42 | 1,65 | 0,77 | 0,92 | 1,67 | 0,96 | 1,78 | 1,88 | 3,85 | 0,00 | 3,56 | 0,00 | 2,75 | 5,07 | 2,60 | 1,53 | 4,43 | 1,98 | 5,45 | 3,17 | 0,54 | 0,019 | 0,017 | | | |
| OG5_151558 | LinJ.34.2800 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,52 | 0,00 | 2,88 | 0,00 | 1,17 | 0,00 | 2,86 | 1,09 | 1,09 | 1,44 | 2,57 | 1,40 | 3,63 | 1,24 | 3,11 | 2,88 | 3,06 | 3,36 | 0,00 | 1,12 | 2,36 | 4,07 | 1,44 | 5,63 | 2,05 | 2,47 | 0,57 | 0,035 | 0,032 | | | |
| OG5_150122 | LinJ.25.0530 | RNA-binding protein, putative | 1 | 1,39 | 0,00 | 0,44 | 2,00 | 1,35 | 0,67 | 1,20 | 1,10 | 2,20 | 1,53 | 0,00 | 2,21 | 1,25 | 2,68 | 1,66 | 4,25 | 1,66 | 3,68 | 2,37 | 2,16 | 1,59 | 1,06 | 2,75 | 3,22 | 0,70 | 1,93 | 0,57 | 0,025 | 0,023 | | | |
| OG5_143954 | LinJ.35.3180 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,00 | 1,69 | 0,00 | 0,00 | 1,27 | 1,44 | 0,94 | 1,58 | 0,00 | 5,61 | 3,37 | 1,74 | 1,36 | 0,00 | 1,21 | 1,87 | 1,53 | 4,20 | 2,24 | 4,53 | 2,62 | 2,60 | 3,49 | 1,81 | 2,23 | 0,00 | 0,57 | 0,023 | 0,020 | | | |
| OG5_142814 | LinJ.36.0220 | mitochondrial inner membrane signal peptidase, putative,serine peptidase clan SF, family S26B, putative | 1 | 1,21 | 2,18 | 1,23 | 1,30 | 3,04 | 0,47 | 0,87 | 1,44 | 1,47 | 0,56 | 0,63 | 0,61 | 1,76 | 2,82 | 0,91 | 1,71 | 2,49 | 2,11 | 1,97 | 2,47 | 3,11 | 2,27 | 1,86 | 4,32 | 1,86 | 2,43 | 0,61 | 0,008 | 0,008 | | | |
| OG5_183407 | LinJ.16.0860 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,21 | 0,91 | 1,03 | 0,83 | 0,89 | 0,40 | 1,48 | 2,07 | 1,27 | 1,39 | 2,19 | 1,96 | 2,85 | 0,99 | 1,91 | 2,01 | 1,22 | 1,34 | 2,76 | 2,31 | 2,61 | 1,99 | 4,59 | 1,35 | 2,42 | 3,02 | 0,64 | 0,020 | 0,020 | | | |
| OG5_148894 | LinJ.32.0130 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,48 | 3,07 | 0,47 | 0,69 | 1,21 | 1,40 | 1,69 | 1,14 | 2,31 | 1,58 | 2,02 | 0,78 | 0,47 | 0,87 | 3,07 | 3,03 | 1,76 | 2,13 | 0,62 | 1,95 | 1,57 | 1,78 | 3,00 | 1,26 | 1,85 | 3,27 | 0,65 | 0,023 | 0,024 | | | |
| OG5_131052 | LinJ.25.2090 | 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase, putative | 1 | 0,91 | 1,34 | 1,16 | 0,68 | 2,48 | 2,98 | 1,63 | 3,43 | 1,50 | 1,80 | 2,39 | 0,60 | 2,31 | 0,61 | 1,11 | 1,96 | 2,13 | 2,55 | 2,36 | 3,78 | 2,64 | 1,69 | 2,46 | 4,35 | 2,14 | 3,38 | 0,67 | 0,036 | 0,035 | | | |
| OG5_148684 | LinJ.24.1900 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,93 | 1,24 | 1,29 | 2,30 | 1,56 | 1,00 | 2,29 | 2,57 | 0,76 | 1,61 | 0,96 | 1,88 | 2,10 | 1,30 | 3,64 | 1,30 | 1,49 | 1,60 | 3,22 | 1,76 | 2,65 | 2,12 | 2,35 | 0,39 | 4,38 | 2,81 | 0,67 | 0,041 | 0,040 | | | |
| OG5_146975 | LinJ.30.2560 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,61 | 2,07 | 0,56 | 2,03 | 1,34 | 1,51 | 2,38 | 1,99 | 1,66 | 1,25 | 1,15 | 1,65 | 0,78 | 1,10 | 1,70 | 2,52 | 1,84 | 1,71 | 2,25 | 2,78 | 1,77 | 1,92 | 2,38 | 2,42 | 2,68 | 2,29 | 0,69 | 0,001 | 0,001 | | | |
| OG5_150010 | LinJ.15.1230 LinJ.15.1240 LinJ.15.1250 LinJ.15.1260 | nucleoside transporter 1, putative | 4 | 3,01 | 3,24 | 4,37 | 5,21 | 4,15 | 5,33 | 3,13 | 8,14 | 4,15 | 3,17 | 2,83 | 3,15 | 3,57 | 3,80 | 3,81 | 8,53 | 7,43 | 7,57 | 7,73 | 4,95 | 6,56 | 3,95 | 7,27 | 3,56 | 6,20 | 3,77 | 0,69 | 0,013 | 0,013 | | | |
| OG5_148428 | LinJ.15.1620 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,61 | 2,64 | 1,14 | 0,84 | 0,48 | 0,89 | 1,58 | 2,32 | 0,92 | 1,21 | 1,73 | 0,60 | 1,08 | 1,66 | 1,76 | 2,19 | 1,89 | 1,90 | 1,49 | 2,22 | 0,99 | 2,68 | 1,17 | 2,49 | 1,34 | 1,89 | 0,69 | 0,015 | 0,015 | | | |
| OG5_129658 | LinJ.34.4360 | d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- like protein | 1 | 3,88 | 2,00 | 2,54 | 4,32 | 3,29 | 3,06 | 2,72 | 2,32 | 3,58 | 2,00 | 2,92 | 1,46 | 3,83 | 2,92 | 5,01 | 3,31 | 6,79 | 3,76 | 4,59 | 5,37 | 3,30 | 4,27 | 2,36 | 3,44 | 4,29 | 4,16 | 0,69 | 0,003 | 0,003 | | | |
| OG5_166727 | LinJ.24.2230 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,32 | 1,72 | 1,99 | 1,73 | 1,10 | 1,47 | 1,88 | 2,42 | 1,64 | 1,14 | 2,18 | 1,36 | 1,05 | 0,64 | 2,03 | 2,07 | 1,56 | 1,57 | 1,65 | 2,78 | 2,13 | 2,57 | 1,99 | 3,56 | 3,00 | 2,99 | 0,70 | 0,011 | 0,011 | | | |
| OG5_130312 | LinJ.36.4720 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,68 | 2,17 | 0,71 | 1,03 | 2,10 | 2,10 | 1,81 | 1,41 | 1,46 | 2,96 | 0,78 | 0,37 | 1,08 | 1,35 | 1,05 | 1,56 | 1,99 | 2,57 | 2,49 | 1,98 | 2,40 | 1,36 | 2,91 | 0,89 | 2,78 | 2,51 | 0,70 | 0,046 | 0,046 | | | |
| OG5_183108 | LinJ.01.0690 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,22 | 1,10 | 2,14 | 2,20 | 1,91 | 1,98 | 1,70 | 1,56 | 1,78 | 0,88 | 1,81 | 1,21 | 0,49 | 0,72 | 2,00 | 2,68 | 1,50 | 2,43 | 1,73 | 1,78 | 1,99 | 2,73 | 1,80 | 2,22 | 2,72 | 2,92 | 0,70 | 0,011 | 0,011 | | | |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | |
|----------------|------------------------------|---|----------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|----------------------|----------------------|-------|-------|
| | | | | MA-01 | MA-02 | MA-03 | MA-04 | MA-05 | MG-12 | MG-14 | MG-19 | PI-04 | PI-05 | PI-07 | PI-08 | PI-09 | PI-10 | MA-07 | MG-11 | MG-13 | MG-15 | MG-16 | MG-17 | MG-18 | PI-01 | PI-02 | PI-03 | | | | PI-11 | PI-12 |
| | | | | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | A | A |
| OG5_128569 | LinJ.25.0830 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,88 | 1,93 | 1,66 | 0,95 | 1,94 | 4,16 | 2,01 | 2,09 | 1,05 | 1,83 | 1,40 | 1,70 | 1,59 | 0,00 | 1,90 | 1,85 | 2,60 | 1,58 | 2,27 | 2,41 | 2,28 | 2,38 | 2,20 | 2,68 | 2,35 | 3,70 | 0,71 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_127876 | LinJ.24.0160 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,40 | 0,83 | 3,02 | 1,65 | 0,39 | 1,34 | 1,31 | 1,10 | 2,27 | 3,21 | 0,48 | 0,47 | 1,67 | 0,43 | 1,99 | 2,15 | 3,18 | 2,00 | 2,34 | 0,70 | 1,51 | 2,12 | 1,88 | 2,34 | 1,82 | 1,55 | 0,71 | 0,037 | 0,035 |
| OG5_151723 | LinJ.28.0450 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,61 | 0,60 | 2,21 | 1,69 | 2,08 | 1,49 | 1,32 | 1,68 | 0,97 | 1,45 | 2,08 | 1,78 | 2,65 | 2,30 | 1,85 | 1,37 | 3,06 | 2,94 | 3,88 | 1,68 | 2,14 | 2,53 | 2,87 | 2,39 | 1,31 | 2,37 | 0,72 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_142346 | LinJ.23.1870 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,60 | 1,73 | 3,25 | 2,18 | 2,60 | 1,28 | 2,93 | 1,40 | 2,93 | 3,35 | 2,01 | 1,36 | 3,60 | 3,24 | 4,65 | 3,58 | 2,77 | 2,24 | 2,00 | 4,56 | 3,79 | 3,69 | 3,24 | 4,28 | 1,59 | 4,45 | 0,72 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_127075 | LinJ.25.2110 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,65 | 1,03 | 1,73 | 2,04 | 2,69 | 1,14 | 1,84 | 1,10 | 1,00 | 2,33 | 1,40 | 1,36 | 2,19 | 2,09 | 1,98 | 2,10 | 1,63 | 3,09 | 3,16 | 1,83 | 1,18 | 1,78 | 1,90 | 3,15 | 2,86 | 3,16 | 0,73 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_150308 | LinJ.11.1300 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,58 | 1,25 | 1,74 | 1,54 | 1,76 | 1,68 | 2,03 | 2,48 | 1,52 | 1,91 | 1,19 | 1,15 | 1,98 | 2,06 | 1,98 | 2,55 | 2,67 | 1,62 | 1,65 | 2,86 | 1,76 | 2,25 | 1,89 | 3,45 | 3,19 | 1,52 | 0,75 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_145213 | LinJ.25.1500 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,25 | 2,33 | 1,43 | 1,38 | 1,39 | 1,86 | 1,98 | 2,11 | 1,84 | 2,24 | 1,23 | 2,56 | 4,53 | 1,12 | 2,73 | 2,80 | 2,07 | 3,10 | 3,15 | 2,06 | 1,31 | 3,26 | 3,40 | 3,22 | 1,75 | 3,52 | 0,75 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_127106 | LinJ.25.2220 LinJ.25.2230 | succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative | 2 | 3,12 | 3,23 | 3,24 | 3,95 | 3,51 | 2,52 | 4,77 | 5,74 | 3,93 | 3,80 | 4,47 | 2,91 | 2,54 | 4,26 | 5,91 | 3,35 | 5,58 | 4,69 | 4,10 | 4,08 | 5,03 | 6,13 | 4,77 | 4,81 | 3,53 | 7,51 | 0,75 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_130965 | LinJ.08.0830 | mitochondrial DNA polymerase beta | 1 | 1,68 | 3,07 | 1,34 | 1,18 | 3,61 | 2,00 | 1,50 | 1,67 | 2,26 | 1,52 | 2,27 | 2,36 | 1,33 | 1,53 | 1,92 | 2,42 | 1,79 | 2,40 | 2,85 | 1,93 | 2,68 | 3,38 | 1,43 | 4,65 | 2,00 | 3,62 | 0,75 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_126649 | LinJ.25.1530 | cyclin (CYCA) | 1 | 1,36 | 1,62 | 2,59 | 2,76 | 1,71 | 2,82 | 2,00 | 2,60 | 1,92 | 2,16 | 2,12 | 1,14 | 2,47 | 1,64 | 3,17 | 2,74 | 2,05 | 2,62 | 2,52 | 3,21 | 1,60 | 2,40 | 2,80 | 3,20 | 2,01 | 4,36 | 0,76 | 0,023 | 0,024 |
| OG5_154422 | LinJ.34.0340 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,03 | 2,01 | 1,90 | 1,74 | 2,00 | 1,54 | 1,82 | 1,55 | 1,82 | 2,09 | 1,25 | 1,96 | 0,57 | 2,14 | 2,52 | 2,35 | 2,90 | 2,18 | 1,60 | 2,31 | 1,78 | 1,70 | 2,42 | 1,99 | 2,60 | 2,10 | 0,76 | 0,005 | 0,005 |
| OG5_148710 | LinJ.25.1620 | protein kinase, putative | 1 | 1,64 | 1,90 | 1,73 | 2,21 | 1,82 | 1,56 | 1,75 | 2,15 | 2,01 | 1,57 | 1,99 | 2,01 | 1,46 | 2,02 | 2,43 | 1,91 | 2,33 | 2,53 | 2,42 | 2,07 | 1,82 | 2,43 | 2,14 | 3,05 | 2,68 | 3,29 | 0,76 | 0,000 | 0,000 |
| OG5_181727 | LinJ.08.0310 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,33 | 2,13 | 2,06 | 2,35 | 2,74 | 2,04 | 1,68 | 1,48 | 2,58 | 2,19 | 1,74 | 6,18 | 1,24 | 1,34 | 1,87 | 4,35 | 2,16 | 3,31 | 2,06 | 4,03 | 2,44 | 3,26 | 0,79 | 4,07 | 2,56 | 4,15 | 0,76 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_143956 | LinJ.36.1080 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,71 | 1,44 | 1,89 | 1,31 | 2,28 | 1,60 | 1,87 | 1,63 | 1,73 | 1,91 | 1,22 | 1,49 | 1,51 | 1,20 | 1,99 | 1,58 | 2,07 | 2,13 | 1,59 | 1,68 | 2,20 | 2,64 | 1,92 | 2,35 | 2,49 | 3,05 | 0,76 | 0,003 | 0,002 |
| OG5_183564 | LinJ.12.0860 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,14 | 1,90 | 1,95 | 1,64 | 1,89 | 1,89 | 1,74 | 1,69 | 1,95 | 1,81 | 1,53 | 1,71 | 2,24 | 1,18 | 2,38 | 2,96 | 1,97 | 2,19 | 2,60 | 1,89 | 1,93 | 2,44 | 1,94 | 1,97 | 1,89 | 3,76 | 0,77 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_142238 | LinJ.29.2020 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,65 | 1,70 | 1,86 | 1,96 | 1,59 | 2,00 | 1,53 | 2,50 | 0,90 | 1,27 | 1,49 | 1,49 | 1,66 | 2,24 | 2,49 | 2,23 | 2,17 | 2,44 | 2,00 | 3,18 | 1,95 | 2,10 | 2,68 | 2,14 | 1,54 | 1,59 | 0,77 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_129009 | LinJ.29.1100 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,37 | 1,32 | 1,08 | 1,43 | 2,29 | 2,86 | 2,48 | 1,85 | 1,84 | 1,24 | 1,68 | 1,33 | 1,73 | 1,71 | 1,42 | 2,07 | 2,32 | 2,83 | 2,10 | 1,93 | 2,36 | 3,21 | 1,45 | 3,05 | 2,50 | 1,55 | 0,77 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_183681 | LinJ.25.1950 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,70 | 1,53 | 1,54 | 1,33 | 1,71 | 2,04 | 1,82 | 2,01 | 2,62 | 1,68 | 1,73 | 2,41 | 1,57 | 2,15 | 2,71 | 2,27 | 2,25 | 2,21 | 2,40 | 1,67 | 2,06 | 2,45 | 2,10 | 3,43 | 1,50 | 3,43 | 0,78 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_137332 | LinJ.27.2250 | protein phosphatase-like protein | 1 | 1,34 | 2,68 | 2,24 | 1,54 | 2,24 | 1,83 | 1,91 | 1,67 | 1,56 | 2,21 | 1,55 | 1,30 | 2,21 | 2,07 | 1,81 | 1,56 | 2,35 | 3,26 | 3,00 | 2,71 | 2,50 | 2,40 | 1,67 | 2,98 | 2,62 | 2,15 | 0,78 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_151670 | LinJ.25.1250 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,53 | 1,77 | 2,04 | 2,01 | 1,71 | 1,35 | 2,07 | 1,60 | 2,38 | 1,69 | 1,46 | 1,80 | 2,16 | 2,23 | 2,48 | 1,84 | 1,70 | 2,39 | 1,57 | 1,81 | 2,44 | 2,74 | 2,01 | 3,33 | 2,84 | 3,02 | 0,79 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_145225 | LinJ.34.3920 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,55 | 3,01 | 1,04 | 1,48 | 1,30 | 1,98 | 1,75 | 1,29 | 1,85 | 1,38 | 1,29 | 1,08 | 1,87 | 2,29 | 1,93 | 2,81 | 2,18 | 2,37 | 2,09 | 2,63 | 1,54 | 1,48 | 1,93 | 2,73 | 1,68 | 1,87 | 0,79 | 0,015 | 0,015 |
| OG5_147501 | LinJ.20.1330 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,05 | 1,82 | 2,48 | 3,35 | 2,56 | 2,95 | 2,49 | 2,79 | 2,60 | 2,09 | 1,48 | 1,09 | 1,99 | 2,30 | 2,82 | 2,62 | 3,36 | 2,80 | 2,13 | 3,19 | 3,12 | 2,93 | 1,98 | 3,68 | 2,01 | 4,10 | 0,79 | 0,023 | 0,024 |
| OG5_127409 | LinJ.20.0310 | developmentally regulated phosphoprotein-like protein | 1 | 3,54 | 1,50 | 1,82 | 2,50 | 1,42 | 1,66 | 1,73 | 1,83 | 1,71 | 2,10 | 0,87 | 1,30 | 1,87 | 1,12 | 3,38 | 2,60 | 2,08 | 1,04 | 1,80 | 1,80 | 2,34 | 2,17 | 2,13 | 2,87 | 1,94 | 2,90 | 0,79 | 0,029 | 0,026 |
| OG5_146036 | LinJ.30.2330 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,99 | 2,21 | 1,28 | 1,94 | 1,43 | 2,41 | 2,29 | 1,99 | 2,04 | 1,62 | 1,07 | 1,33 | 1,62 | 0,90 | 2,51 | 2,39 | 1,51 | 2,20 | 2,38 | 3,07 | 1,70 | 2,63 | 2,72 | 2,33 | 1,67 | 2,02 | 0,79 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_129880 | LinJ.18.1530 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,47 | 2,41 | 1,74 | 2,04 | 1,32 | 2,41 | 2,56 | 1,90 | 2,28 | 1,27 | 1,59 | 1,25 | 1,01 | 2,20 | 1,61 | 2,43 | 1,74 | 2,82 | 2,39 | 1,88 | 3,01 | 1,82 | 2,56 | 3,17 | 1,75 | 2,34 | 0,79 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_183736 | LinJ.27.0681 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,91 | 1,28 | 1,40 | 1,93 | 1,99 | 2,14 | 1,95 | 2,17 | 1,72 | 1,56 | 0,78 | 1,67 | 1,72 | 1,94 | 2,01 | 2,83 | 1,50 | 2,48 | 2,48 | 2,11 | 1,40 | 2,63 | 1,62 | 2,02 | 2,59 | 2,41 | 0,79 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_130133 | LinJ.24.2330 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,96 | 2,04 | 1,37 | 1,58 | 1,68 | 1,88 | 1,20 | 1,85 | 1,97 | 1,31 | 1,13 | 1,74 | 1,46 | 1,46 | 2,26 | 2,27 | 2,77 | 1,51 | 2,19 | 1,62 | 2,43 | 1,71 | 1,85 | 1,54 | 1,62 | 1,46 | 0,80 | 0,031 | 0,028 |
| OG5_149347 | LinJ.22.1270 | aquaporin, putative | 1 | 1,90 | 3,41 | 1,22 | 1,56 | 2,37 | 1,48 | 2,07 | 2,48 | 1,55 | 1,93 | 2,00 | 1,44 | 3,19 | 1,61 | 1,94 | 1,80 | 2,55 | 2,99 | 2,41 | 3,10 | 2,24 | 3,96 | 1,68 | 2,92 | 2,13 | 2,48 | 0,80 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_146020 | LinJ.29.0300 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,42 | 2,18 | 1,35 | 2,50 | 2,04 | 2,39 | 1,61 | 1,41 | 2,29 | 1,32 | 1,72 | 2,23 | 1,94 | 1,90 | 1,65 | 2,50 | 2,55 | 3,39 | 2,47 | 2,48 | 1,58 | 2,16 | 1,89 | 1,77 | 2,88 | 2,83 | 0,80 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_183806 | LinJ.29.0900 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,36 | 2,06 | 1,35 | 2,63 | 1,96 | 1,94 | 2,09 | 2,13 | 1,64 | 1,44 | 2,52 | 2,05 | 2,12 | 1,81 | 2,77 | 2,37 | 1,93 | 2,61 | 2,17 | 2,71 | 1,69 | 2,41 | 3,13 | 3,49 | 2,18 | 2,54 | 0,80 | 0,008 | 0,007 |
| OG5_126940 | LinJ.06.0410 LinJ.06.0430 | 60S ribosomal protein L19, putative | 2 | 2,45 | 6,92 | 3,44 | 4,40 | 3,70 | 3,03 | 5,61 | 5,50 | 4,42 | 1,76 | 3,68 | 3,39 | 3,14 | 4,06 | 4,81 | 5,31 | 5,11 | 3,93 | 6,02 | 4,05 | 6,01 | 4,49 | 5,19 | 5,63 | 4,40 | 4,03 | 0,81 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_127099 | LinJ.25.1210 | ATPase beta subunit, putative | 1 | 3,82 | 2,37 | 3,54 | 3,29 | 3,60 | 3,11 | 2,90 | 3,22 | 2,47 | 2,43 | 3,05 | 2,71 | 1,53 | 4,32 | 4,04 | 3,92 | 2,56 | 3,95 | 4,39 | 3,57 | 3,43 | 3,02 | 3,06 | 4,32 | 2,75 | 5,96 | 0,81 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_184163 | LinJ.36.4550 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,74 | 1,93 | 1,36 | 1,11 | 1,99 | 1,81 | 1,68 | 1,11 | 1,75 | 1,23 | 2,71 | 2,10 | 1,43 | 1,96 | 2,36 | 1,98 | 2,06 | 1,79 | 2,20 | 2,07 | 2,13 | 2,37 | 2,41 | 1,87 | 2,29 | 1,80 | 0,81 | 0,006 | 0,004 |
| OG5_151748 | LinJ.28.2930 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,23 | 1,97 | 1,79 | 1,75 | 1,50 | 2,45 | 1,66 | 1,92 | 1,75 | 1,49 | 1,41 | 1,78 | 0,95 | 2,10 | 1,73 | 2,82 | 2,22 | 2,02 | 2,49 | 2,09 | 2,00 | 2,46 | 2,23 | 2,82 | 1,18 | 2,14 | 0,81 | 0,015 | 0,015 |
| OG5_149045 | LinJ.36.0380 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,36 | 1,63 | 1,64 | 2,04 | 1,61 | 2,27 | 2,67 | 1,09 | 1,96 | 1,77 | 1,64 | 1,58 | 0,91 | 1,79 | 1,79 | 2,07 | 1,90 | 3,22 | 2,49 | 1,83 | 2,23 | 2,17 | 2,39 | 1,95 | 1,54 | 1,77 | 0,81 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_151663 | LinJ.25.0150 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,95 | 1,62 | 1,62 | 1,09 | 1,77 | 2,14 | 1,61 | 1,72 | 1,85 | 1,01 | 1,74 | 1,41 | 1,09 | 1,70 | 1,58 | 1,91 | 1,54 | 1,41 | 2,20 | 1,87 | 1,35 | 2,00 | 2,21 | 2,28 | 1,82 | 2,30 | 0,81 | 0,031 | 0,031 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | |
|----------------------|--------------|---|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | | | | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_126828 | LinJ.03.0970 | aminoalcohol phosphotransferase, putative | 1 | 1,65 | 1,27 | 0,77 | 1,31 | 1,25 | 1,24 | 1,18 | 3,17 | 1,31 | 1,17 | 2,06 | 1,12 | 1,60 | 1,54 | 2,33 | 1,73 | 1,88 | 1,63 | 2,55 | 1,20 | 2,08 | 2,51 | 0,82 | 1,42 | 1,59 | 1,90 | 0,82 | 0,048 | 0,045 |
| OG5_183683 | LinJ.25.2410 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,99 | 2,03 | 2,18 | 1,69 | 2,17 | 1,71 | 1,56 | 1,42 | 1,60 | 2,37 | 1,95 | 1,86 | 1,85 | 2,46 | 2,38 | 1,62 | 2,09 | 2,84 | 2,07 | 2,27 | 2,16 | 2,66 | 2,11 | 2,89 | 1,86 | 3,17 | 0,82 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_127854 | LinJ.07.1300 | proteasome regulatory non-ATP-ase subunit, putative | 1 | 1,44 | 1,63 | 1,72 | 1,82 | 1,41 | 1,85 | 1,37 | 1,72 | 1,93 | 1,98 | 1,93 | 1,78 | 2,57 | 2,00 | 3,13 | 2,54 | 2,16 | 1,74 | 2,21 | 1,15 | 2,42 | 1,93 | 2,12 | 1,64 | 3,10 | 2,18 | 0,82 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_143937 | LinJ.30.3140 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,78 | 1,79 | 1,35 | 2,12 | 2,34 | 1,78 | 1,51 | 1,70 | 1,59 | 1,72 | 1,57 | 1,33 | 1,56 | 2,68 | 2,48 | 1,88 | 2,53 | 2,28 | 1,96 | 2,46 | 2,19 | 1,82 | 2,31 | 2,06 | 2,13 | 1,82 | 0,82 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_126710 | LinJ.31.0110 | O-sialoglycoprotein endopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MK, Family M67 | 1 | 3,74 | 2,69 | 3,24 | 3,70 | 4,09 | 4,86 | 3,17 | 3,74 | 3,97 | 3,97 | 3,12 | 2,91 | 2,07 | 3,64 | 3,27 | 3,72 | 3,70 | 4,25 | 3,63 | 4,50 | 5,60 | 5,18 | 4,36 | 5,13 | 3,96 | 3,73 | 0,82 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_129160 | LinJ.18.1130 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,88 | 1,77 | 1,25 | 2,64 | 1,88 | 2,34 | 2,06 | 1,87 | 2,15 | 1,75 | 2,35 | 1,35 | 2,18 | 1,99 | 1,45 | 2,45 | 2,22 | 1,51 | 2,10 | 2,57 | 1,99 | 3,15 | 2,54 | 2,83 | 2,46 | 2,11 | 0,83 | 0,046 | 0,047 |
| OG5_177084 | LinJ.20.1060 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,45 | 1,82 | 1,80 | 3,15 | 2,03 | 2,18 | 2,46 | 1,74 | 1,89 | 2,02 | 2,28 | 1,81 | 1,47 | 2,00 | 2,80 | 3,17 | 1,90 | 1,90 | 1,98 | 2,39 | 2,66 | 2,26 | 2,16 | 3,58 | 2,04 | 3,24 | 0,83 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_172620 | LinJ.12.0430 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,75 | 1,82 | 1,68 | 2,19 | 2,02 | 2,21 | 2,12 | 1,83 | 2,12 | 1,56 | 2,10 | 1,81 | 1,99 | 2,01 | 2,20 | 3,01 | 1,91 | 2,37 | 2,55 | 1,59 | 2,80 | 1,86 | 1,79 | 2,22 | 2,54 | 3,29 | 0,83 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_183676 | LinJ.25.1080 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,61 | 1,79 | 1,84 | 2,15 | 1,92 | 1,76 | 1,68 | 2,03 | 1,89 | 1,64 | 1,64 | 2,30 | 1,92 | 1,97 | 2,09 | 2,35 | 1,99 | 1,97 | 1,83 | 1,93 | 2,14 | 1,54 | 2,02 | 3,59 | 2,58 | 2,98 | 0,83 | 0,022 | 0,019 |
| OG5_133432 | LinJ.19.1380 | phosphatidic acid phosphatase protein-like protein | 1 | 1,52 | 1,61 | 1,55 | 1,93 | 2,92 | 1,67 | 1,63 | 2,12 | 1,58 | 2,10 | 1,45 | 1,58 | 2,06 | 1,85 | 2,44 | 1,97 | 1,99 | 1,25 | 2,59 | 2,63 | 1,84 | 1,99 | 2,48 | 2,13 | 2,37 | 2,70 | 0,83 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_linfLinJ.12.0670 | LinJ.12.0670 | surface antigen protein 2, putative | 1 | 1,16 | 2,28 | 2,50 | 2,43 | 1,65 | 1,65 | 1,57 | 2,38 | 1,77 | 2,27 | 1,38 | 1,62 | 1,63 | 2,58 | 1,86 | 2,86 | 2,07 | 1,86 | 1,75 | 2,38 | 1,79 | 2,67 | 2,55 | 2,85 | 2,46 | 2,54 | 0,83 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_128279 | LinJ.30.3150 | S-adenosylmethionine decarboxylase (ADOMETDC) | 1 | 1,84 | 1,93 | 1,27 | 1,72 | 1,39 | 1,03 | 2,00 | 1,74 | 2,12 | 1,74 | 3,18 | 1,74 | 1,06 | 2,06 | 2,07 | 2,34 | 2,33 | 2,25 | 1,54 | 1,52 | 2,43 | 2,06 | 2,04 | 2,78 | 2,13 | 2,01 | 0,83 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_149104 | LinJ.36.5030 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,05 | 1,63 | 1,94 | 1,33 | 2,05 | 2,05 | 2,03 | 1,51 | 1,97 | 1,77 | 2,52 | 2,02 | 1,72 | 2,10 | 1,94 | 1,89 | 2,29 | 2,00 | 2,21 | 2,41 | 2,75 | 3,16 | 2,81 | 1,14 | 2,56 | 2,25 | 0,83 | 0,037 | 0,034 |
| OG5_147502 | LinJ.12.0570 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,48 | 2,48 | 2,28 | 2,23 | 2,21 | 2,77 | 1,86 | 2,28 | 2,06 | 1,92 | 1,71 | 2,02 | 1,85 | 2,06 | 2,69 | 3,88 | 2,10 | 2,41 | 2,38 | 2,29 | 2,62 | 2,68 | 2,06 | 2,32 | 2,02 | 3,44 | 0,84 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_128622 | LinJ.36.1260 | GPI alpha-mannosyltransferase III (GPI10) | 1 | 1,37 | 1,74 | 2,19 | 2,15 | 1,78 | 2,46 | 1,69 | 1,80 | 1,99 | 1,67 | 1,32 | 2,00 | 1,03 | 1,80 | 2,02 | 2,65 | 1,85 | 2,04 | 2,24 | 2,15 | 2,12 | 2,78 | 2,10 | 2,13 | 1,77 | 1,68 | 0,84 | 0,033 | 0,030 |
| OG5_131535 | LinJ.12.0470 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,94 | 1,73 | 1,94 | 1,77 | 2,03 | 2,02 | 2,00 | 1,86 | 1,90 | 1,31 | 1,69 | 2,01 | 1,66 | 1,94 | 1,90 | 2,72 | 2,39 | 2,10 | 2,06 | 2,06 | 1,42 | 2,27 | 2,01 | 2,47 | 2,13 | 2,77 | 0,84 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_183321 | LinJ.12.0440 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,73 | 1,90 | 2,09 | 2,60 | 1,74 | 1,91 | 1,79 | 1,87 | 1,75 | 2,00 | 1,72 | 2,71 | 2,02 | 1,87 | 2,60 | 2,74 | 1,96 | 1,98 | 2,18 | 2,37 | 1,98 | 2,15 | 2,75 | 1,75 | 2,07 | 3,73 | 0,84 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_127222 | LinJ.16.0830 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,12 | 1,99 | 1,51 | 5,08 | 2,02 | 1,66 | 1,89 | 1,44 | 2,17 | 2,33 | 0,89 | 1,26 | 2,78 | 2,06 | 3,63 | 2,08 | 3,19 | 3,07 | 2,22 | 2,10 | 3,01 | 1,84 | 2,30 | 2,07 | 2,28 | 1,98 | 0,84 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_151735 | LinJ.28.1330 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,93 | 2,30 | 2,64 | 2,57 | 2,00 | 1,77 | 1,85 | 1,60 | 2,07 | 1,71 | 1,77 | 1,96 | 1,50 | 1,41 | 2,37 | 2,66 | 2,25 | 2,61 | 2,47 | 2,42 | 2,73 | 2,22 | 1,69 | 1,43 | 2,40 | 2,30 | 0,84 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_154553 | LinJ.34.0110 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,20 | 2,08 | 1,92 | 1,36 | 1,83 | 2,04 | 2,11 | 1,75 | 1,83 | 1,49 | 2,32 | 1,79 | 1,31 | 1,28 | 1,82 | 2,01 | 1,95 | 2,37 | 2,30 | 2,16 | 1,99 | 2,16 | 2,16 | 2,11 | 2,62 | 2,08 | 0,84 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_152835 | LinJ.29.0710 | RNA-binding protein, putative | 1 | 1,68 | 1,67 | 1,58 | 1,74 | 2,04 | 2,07 | 2,18 | 1,82 | 1,87 | 2,40 | 1,03 | 2,58 | 2,06 | 1,88 | 2,00 | 1,82 | 1,86 | 2,26 | 2,29 | 2,75 | 2,14 | 2,29 | 2,32 | 2,43 | 2,36 | 2,50 | 0,84 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_146332 | LinJ.36.6500 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,71 | 1,81 | 2,04 | 1,81 | 2,06 | 2,13 | 2,10 | 2,14 | 1,68 | 1,67 | 2,00 | 1,65 | 1,96 | 1,73 | 2,46 | 2,43 | 2,03 | 2,26 | 2,15 | 2,67 | 1,68 | 2,18 | 2,64 | 2,00 | 2,34 | 2,07 | 0,84 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_183818 | LinJ.29.1500 | RNA binding protein, putative | 1 | 1,61 | 1,65 | 2,29 | 2,21 | 1,92 | 2,27 | 1,92 | 2,12 | 1,87 | 2,12 | 1,98 | 2,14 | 1,57 | 1,69 | 2,72 | 2,25 | 2,33 | 2,50 | 2,36 | 2,04 | 2,12 | 2,51 | 2,23 | 2,64 | 1,67 | 2,34 | 0,85 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_150386 | LinJ.34.2300 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,48 | 2,11 | 1,61 | 2,58 | 2,60 | 1,57 | 1,94 | 1,77 | 2,35 | 2,18 | 1,86 | 1,85 | 2,33 | 1,28 | 2,18 | 2,26 | 2,66 | 2,77 | 2,31 | 2,43 | 1,86 | 2,43 | 1,62 | 2,59 | 2,47 | 2,28 | 0,85 | 0,031 | 0,028 |
| OG5_128438 | LinJ.16.0850 | metallopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MP, Family M67 | 1 | 3,10 | 1,50 | 2,24 | 2,04 | 2,12 | 1,62 | 2,04 | 1,95 | 2,11 | 1,61 | 1,87 | 1,09 | 1,36 | 1,70 | 1,56 | 2,43 | 2,72 | 2,09 | 1,52 | 2,19 | 2,38 | 2,60 | 2,27 | 2,51 | 1,81 | 2,62 | 0,85 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_183310 | LinJ.12.0180 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,00 | 1,97 | 1,89 | 1,81 | 2,06 | 2,10 | 1,66 | 2,00 | 2,13 | 2,11 | 1,64 | 2,16 | 2,02 | 1,77 | 2,36 | 3,01 | 1,95 | 1,85 | 2,61 | 2,09 | 2,11 | 2,52 | 1,78 | 1,90 | 2,25 | 3,20 | 0,85 | 0,046 | 0,047 |
| OG5_154705 | LinJ.32.3730 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,40 | 3,17 | 1,87 | 1,47 | 1,39 | 1,42 | 1,88 | 1,71 | 3,08 | 1,50 | 2,64 | 2,26 | 2,13 | 1,82 | 1,64 | 2,33 | 2,24 | 2,30 | 2,46 | 2,64 | 2,45 | 1,87 | 3,07 | 2,13 | 2,43 | 2,35 | 0,85 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_146483 | LinJ.25.1550 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,79 | 1,87 | 1,72 | 2,21 | 2,10 | 2,44 | 2,02 | 2,14 | 2,20 | 2,41 | 1,78 | 2,12 | 2,24 | 1,92 | 2,26 | 2,44 | 2,16 | 2,66 | 2,17 | 1,88 | 2,32 | 2,00 | 2,14 | 3,36 | 2,39 | 3,36 | 0,85 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_131473 | LinJ.18.1250 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,06 | 1,72 | 1,70 | 3,14 | 1,94 | 2,03 | 2,26 | 2,64 | 1,53 | 1,63 | 1,09 | 2,12 | 1,73 | 2,27 | 2,15 | 2,10 | 2,48 | 2,01 | 2,28 | 2,18 | 2,36 | 2,34 | 2,30 | 3,22 | 2,17 | 2,43 | 0,85 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_145880 | LinJ.11.0380 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,46 | 2,30 | 1,75 | 2,25 | 2,05 | 2,14 | 1,75 | 2,18 | 1,83 | 1,93 | 2,37 | 1,91 | 2,25 | 2,12 | 2,54 | 2,13 | 2,25 | 2,62 | 2,19 | 1,92 | 2,29 | 2,30 | 2,26 | 3,76 | 2,19 | 2,04 | 0,85 | 0,025 | 0,023 |
| OG5_183490 | LinJ.34.0440 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,87 | 2,30 | 1,89 | 2,31 | 1,68 | 2,48 | 2,05 | 1,33 | 1,07 | 2,07 | 1,65 | 2,01 | 2,40 | 1,26 | 1,35 | 2,39 | 2,47 | 2,64 | 2,70 | 2,34 | 2,55 | 2,01 | 2,18 | 2,21 | 1,59 | 2,09 | 0,85 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_151591 | LinJ.20.0320 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,05 | 1,85 | 1,77 | 3,24 | 1,76 | 1,79 | 1,74 | 1,37 | 1,99 | 2,04 | 1,56 | 2,00 | 1,73 | 2,19 | 2,63 | 2,89 | 2,10 | 2,01 | 2,64 | 2,12 | 1,95 | 2,24 | 2,38 | 2,74 | 1,68 | 2,86 | 0,85 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_173492 | LinJ.25.2420 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,44 | 2,02 | 1,78 | 2,54 | 1,88 | 2,45 | 1,82 | 2,16 | 1,70 | 1,72 | 1,71 | 2,13 | 1,53 | 2,01 | 2,67 | 2,07 | 1,90 | 2,04 | 2,03 | 2,18 | 1,88 | 2,61 | 1,86 | 3,00 | 2,03 | 2,74 | 0,85 | 0,015 | 0,015 |
| OG5_183325 | LinJ.12.0070 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,06 | 2,29 | 1,78 | 2,00 | 2,40 | 2,09 | 2,06 | 2,04 | 1,67 | 1,85 | 1,93 | 1,50 | 2,14 | 1,88 | 2,14 | 3,14 | 2,15 | 2,16 | 2,11 | 1,96 | 1,76 | 2,16 | 2,25 | 2,47 | 2,04 | 3,41 | 0,85 | 0,020 | 0,020 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | | | |
|----------------|--------------|---|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|---------|-------------|---------|---------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | | | | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_129330 | LinJ.28.0760 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,10 | 1,87 | 1,74 | 1,24 | 1,98 | 1,94 | 2,17 | 2,09 | 1,77 | 1,57 | 1,48 | 2,24 | 1,45 | 1,52 | 2,55 | 2,36 | 2,05 | 2,29 | 1,77 | 1,81 | 1,83 | 2,34 | 2,53 | 2,15 | 1,79 | 1,80 | 0,85 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_183871 | LinJ.31.0050 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 3,97 | 3,18 | 3,43 | 4,97 | 2,88 | 3,51 | 3,11 | 3,43 | 3,13 | 3,35 | 3,57 | 2,97 | 3,34 | 3,57 | 4,03 | 4,17 | 4,06 | 3,41 | 4,12 | 3,81 | 3,66 | 4,81 | 3,77 | 3,87 | 4,00 | 4,83 | 0,85 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_148820 | LinJ.28.1580 | ATPase, putative | 1 | 2,78 | 1,85 | 1,78 | 2,18 | 1,62 | 1,70 | 1,76 | 1,42 | 1,94 | 2,12 | 1,56 | 1,47 | 1,71 | 1,60 | 2,14 | 1,73 | 2,01 | 1,92 | 2,14 | 2,88 | 2,03 | 1,83 | 2,39 | 2,21 | 2,39 | 1,87 | 0,86 | 0,009 | 0,007 |
| OG5_153063 | LinJ.36.4890 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,17 | 2,22 | 2,33 | 1,98 | 1,93 | 2,18 | 1,98 | 1,67 | 1,75 | 1,61 | 1,48 | 1,70 | 1,70 | 1,59 | 2,13 | 2,01 | 2,16 | 1,85 | 2,45 | 2,78 | 1,85 | 2,19 | 2,44 | 1,72 | 2,17 | 2,60 | 0,86 | 0,025 | 0,023 |
| OG5_129265 | LinJ.19.0870 | folate/biopterin transporter, putative | 1 | 2,09 | 1,97 | 1,88 | 1,91 | 1,71 | 2,40 | 1,98 | 2,30 | 2,11 | 1,47 | 1,98 | 2,00 | 1,88 | 1,80 | 2,93 | 2,67 | 1,53 | 2,22 | 2,60 | 2,05 | 2,49 | 1,66 | 2,30 | 2,45 | 2,12 | 2,48 | 0,86 | 0,011 | 0,011 |
| OG5_161858 | LinJ.20.1430 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,20 | 2,38 | 1,92 | 3,00 | 2,13 | 2,08 | 2,10 | 2,15 | 1,73 | 1,94 | 2,36 | 2,14 | 2,11 | 1,98 | 3,32 | 3,41 | 2,30 | 2,38 | 2,10 | 2,82 | 2,43 | 2,03 | 2,05 | 2,71 | 2,19 | 3,45 | 0,86 | 0,045 | 0,042 |
| OG5_151510 | LinJ.16.1580 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,65 | 1,48 | 1,89 | 3,24 | 1,47 | 1,86 | 1,61 | 2,03 | 1,70 | 1,41 | 2,14 | 1,67 | 1,82 | 1,37 | 2,38 | 2,29 | 2,43 | 2,47 | 2,38 | 1,38 | 1,79 | 2,06 | 2,50 | 1,95 | 2,47 | 2,20 | 0,86 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_183830 | LinJ.29.2300 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,96 | 1,90 | 1,41 | 1,53 | 1,42 | 1,59 | 1,82 | 1,90 | 1,97 | 1,90 | 1,57 | 1,70 | 2,06 | 1,97 | 2,01 | 2,16 | 1,92 | 2,51 | 1,76 | 2,26 | 1,63 | 2,52 | 2,18 | 1,80 | 2,10 | 1,77 | 0,86 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_148517 | LinJ.34.0750 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,41 | 1,76 | 1,80 | 2,82 | 2,14 | 2,70 | 2,05 | 1,99 | 2,50 | 1,70 | 1,23 | 2,01 | 1,69 | 1,73 | 2,13 | 2,31 | 2,06 | 2,54 | 2,11 | 2,19 | 2,37 | 2,39 | 2,68 | 2,54 | 2,51 | 2,57 | 0,86 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_151746 | LinJ.28.2800 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,74 | 1,82 | 1,73 | 1,76 | 2,20 | 2,44 | 1,82 | 1,71 | 1,78 | 2,36 | 1,31 | 1,42 | 2,11 | 2,27 | 1,85 | 2,31 | 2,63 | 2,35 | 2,18 | 2,38 | 2,14 | 2,67 | 2,06 | 1,84 | 2,66 | 2,24 | 0,86 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_183298 | LinJ.11.0740 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,66 | 1,91 | 2,00 | 2,32 | 1,87 | 2,11 | 2,04 | 1,77 | 2,09 | 1,71 | 1,87 | 1,44 | 1,88 | 2,31 | 2,35 | 2,06 | 2,10 | 2,07 | 2,08 | 2,24 | 2,22 | 1,91 | 2,25 | 3,09 | 2,09 | 2,29 | 0,86 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_183314 | LinJ.12.0280 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,60 | 1,84 | 1,51 | 2,10 | 1,68 | 2,36 | 2,05 | 2,00 | 2,39 | 2,03 | 1,81 | 1,98 | 2,09 | 2,24 | 2,32 | 2,91 | 2,27 | 2,56 | 2,36 | 2,57 | 2,24 | 2,45 | 1,77 | 2,16 | 1,96 | 2,75 | 0,87 | 0,029 | 0,026 |
| OG5_145949 | LinJ.20.1570 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,04 | 2,26 | 1,82 | 2,92 | 2,26 | 2,18 | 2,11 | 2,11 | 1,89 | 1,82 | 1,89 | 1,83 | 2,18 | 1,95 | 3,09 | 3,11 | 2,21 | 2,36 | 1,93 | 2,38 | 2,21 | 2,25 | 1,99 | 3,27 | 1,93 | 3,08 | 0,87 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_128078 | LinJ.36.4710 | Mitochondrial N(5)-glutamine methyltransferase MTQ1, putative | 1 | 1,79 | 1,74 | 1,98 | 2,03 | 2,15 | 1,99 | 2,04 | 1,94 | 1,88 | 1,98 | 1,21 | 2,17 | 2,86 | 2,02 | 2,84 | 2,67 | 2,07 | 2,14 | 2,66 | 1,77 | 2,15 | 2,40 | 2,20 | 2,66 | 2,06 | 1,70 | 0,87 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_129322 | LinJ.36.2000 | T-lymphocyte triggering factor, putative | 1 | 1,91 | 1,56 | 1,64 | 1,70 | 1,74 | 1,84 | 1,70 | 2,02 | 1,94 | 2,37 | 2,43 | 2,57 | 1,82 | 1,20 | 1,96 | 1,99 | 2,09 | 2,06 | 1,77 | 2,10 | 2,45 | 2,19 | 2,98 | 2,16 | 2,15 | 2,01 | 0,88 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_137586 | LinJ.12.0330 | pumilio protein 4, putative (PUF4) | 1 | 1,63 | 2,08 | 2,12 | 2,01 | 1,88 | 2,08 | 1,73 | 2,06 | 1,91 | 1,85 | 2,03 | 2,27 | 2,14 | 2,10 | 2,10 | 3,08 | 1,87 | 2,76 | 1,94 | 2,06 | 2,26 | 2,28 | 2,36 | 1,64 | 2,27 | 2,69 | 0,88 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_140412 | LinJ.31.3090 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,76 | 3,31 | 4,64 | 5,15 | 3,44 | 3,23 | 3,64 | 3,43 | 3,33 | 3,28 | 3,61 | 4,00 | 3,57 | 4,24 | 4,39 | 4,58 | 3,74 | 4,01 | 3,77 | 3,83 | 3,78 | 5,56 | 4,49 | 4,91 | 4,60 | 3,85 | 0,88 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_144382 | LinJ.02.0630 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,33 | 1,53 | 1,59 | 3,20 | 1,85 | 1,40 | 1,59 | 1,55 | 1,63 | 1,59 | 2,49 | 2,22 | 1,87 | 1,62 | 2,30 | 1,80 | 2,09 | 1,99 | 1,99 | 2,68 | 1,78 | 2,84 | 1,63 | 1,88 | 1,55 | 2,29 | 0,88 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_145891 | LinJ.12.0210 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,80 | 2,00 | 1,91 | 1,87 | 2,18 | 1,93 | 2,08 | 2,27 | 2,11 | 2,12 | 2,11 | 1,92 | 1,97 | 1,76 | 2,14 | 3,36 | 1,82 | 2,18 | 2,01 | 1,94 | 2,35 | 2,31 | 2,26 | 2,09 | 1,91 | 2,93 | 0,88 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_183113 | LinJ.02.0130 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,79 | 1,84 | 2,10 | 2,79 | 1,80 | 1,83 | 1,94 | 1,69 | 2,01 | 1,89 | 1,87 | 1,44 | 1,65 | 2,14 | 2,16 | 1,89 | 1,97 | 1,98 | 2,08 | 2,91 | 2,10 | 2,98 | 1,81 | 2,03 | 2,20 | 1,95 | 0,88 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_139601 | LinJ.29.1330 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,18 | 1,69 | 1,69 | 1,45 | 2,38 | 1,69 | 2,17 | 1,80 | 2,30 | 1,84 | 2,02 | 1,84 | 2,02 | 1,96 | 2,23 | 1,36 | 1,99 | 2,01 | 2,14 | 2,20 | 2,64 | 1,82 | 2,68 | 2,51 | 2,27 | 2,40 | 0,88 | 0,048 | 0,045 |
| OG5_138262 | LinJ.10.0680 | flagellar glycoprotein-like protein | 1 | 1,69 | 1,77 | 1,64 | 1,77 | 1,52 | 1,59 | 1,97 | 2,39 | 1,77 | 2,60 | 1,79 | 2,40 | 1,82 | 1,61 | 2,46 | 1,87 | 2,09 | 2,19 | 2,08 | 2,29 | 1,84 | 1,55 | 2,36 | 2,26 | 2,43 | 2,14 | 0,88 | 0,041 | 0,040 |
| OG5_183649 | LinJ.24.1190 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,78 | 1,88 | 2,36 | 2,12 | 1,98 | 1,82 | 2,58 | 1,84 | 1,41 | 2,24 | 1,59 | 2,01 | 1,83 | 1,89 | 2,14 | 2,58 | 2,38 | 2,23 | 2,39 | 2,49 | 2,02 | 1,81 | 2,42 | 2,18 | 2,01 | 1,82 | 0,88 | 0,035 | 0,032 |
| OG5_148589 | LinJ.21.0630 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,51 | 1,64 | 2,73 | 1,70 | 2,03 | 1,86 | 2,91 | 1,93 | 1,28 | 1,85 | 1,34 | 1,24 | 1,71 | 2,11 | 2,05 | 1,97 | 2,59 | 2,56 | 2,13 | 2,34 | 1,36 | 1,86 | 1,87 | 2,26 | 1,95 | 2,08 | 0,89 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_134931 | LinJ.34.2200 | DNAJ-like protein | 1 | 1,71 | 1,52 | 1,74 | 2,38 | 1,93 | 2,01 | 1,54 | 1,66 | 1,84 | 1,77 | 2,00 | 1,98 | 2,69 | 2,06 | 2,06 | 2,25 | 2,35 | 2,06 | 2,19 | 2,02 | 2,13 | 2,59 | 2,12 | 1,98 | 2,07 | 2,17 | 0,89 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_127672 | LinJ.36.4390 | UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate N-acetylglucosamine phosphotransferase, putative | 1 | 2,11 | 1,74 | 2,92 | 1,59 | 1,62 | 1,90 | 1,51 | 1,80 | 1,51 | 1,78 | 1,55 | 2,15 | 2,06 | 2,13 | 1,94 | 2,25 | 2,25 | 2,04 | 1,59 | 1,89 | 1,91 | 2,26 | 2,45 | 2,12 | 2,70 | 2,09 | 0,89 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_180808 | LinJ.31.0380 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 3,87 | 3,02 | 3,48 | 4,48 | 3,61 | 4,10 | 3,48 | 4,03 | 3,76 | 4,00 | 3,96 | 3,35 | 3,92 | 3,77 | 4,54 | 4,32 | 4,36 | 4,82 | 3,75 | 4,03 | 4,08 | 5,30 | 4,26 | 4,46 | 3,15 | 3,98 | 0,89 | 0,011 | 0,011 |
| OG5_134503 | LinJ.28.1030 | oxidoreductase-like protein | 1 | 1,59 | 1,48 | 1,63 | 1,42 | 1,71 | 1,55 | 2,04 | 2,00 | 1,85 | 1,55 | 1,87 | 2,25 | 2,04 | 1,55 | 2,05 | 2,04 | 1,73 | 1,85 | 2,00 | 1,76 | 2,44 | 2,12 | 2,34 | 1,75 | 1,76 | 1,82 | 0,89 | 0,040 | 0,037 |
| OG5_183603 | LinJ.22.1140 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,85 | 1,93 | 1,61 | 1,92 | 1,77 | 2,52 | 2,34 | 1,59 | 2,00 | 1,58 | 2,16 | 2,29 | 1,90 | 2,00 | 2,36 | 2,11 | 2,13 | 1,36 | 2,08 | 2,62 | 2,25 | 2,32 | 2,14 | 2,38 | 2,42 | 2,24 | 0,89 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_143911 | LinJ.11.0860 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,09 | 2,07 | 1,85 | 1,93 | 2,30 | 2,12 | 2,14 | 1,91 | 1,74 | 1,92 | 1,96 | 2,08 | 2,01 | 2,00 | 1,84 | 1,58 | 2,00 | 2,27 | 2,31 | 2,25 | 2,27 | 2,24 | 2,18 | 3,29 | 2,32 | 2,30 | 0,90 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_157188 | LinJ.29.1910 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,60 | 2,00 | 2,15 | 1,83 | 1,84 | 1,91 | 2,00 | 1,92 | 1,69 | 2,31 | 2,01 | 1,67 | 1,67 | 2,07 | 2,01 | 1,88 | 2,31 | 2,28 | 2,10 | 2,25 | 2,16 | 1,43 | 1,75 | 2,27 | 2,37 | 2,58 | 0,90 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_148185 | LinJ.24.1580 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,93 | 1,96 | 1,88 | 1,59 | 2,04 | 2,43 | 2,44 | 1,90 | 2,12 | 1,74 | 2,05 | 2,05 | 2,05 | 2,21 | 2,20 | 2,03 | 2,08 | 2,40 | 1,87 | 2,28 | 2,12 | 2,59 | 2,17 | 2,42 | 2,36 | 2,44 | 0,90 | 0,035 | 0,032 |
| OG5_144927 | LinJ.17.1410 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,43 | 1,95 | 1,73 | 1,74 | 1,80 | 1,89 | 1,54 | 2,07 | 2,09 | 1,86 | 1,91 | 1,65 | 1,78 | 1,74 | 2,24 | 1,92 | 1,95 | 2,22 | 2,26 | 1,99 | 2,00 | 1,92 | 2,23 | 1,82 | 1,92 | 2,10 | 0,91 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_183935 | LinJ.31.2730 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 4,49 | 3,96 | 3,93 | 4,15 | 3,72 | 4,07 | 3,61 | 4,19 | 3,97 | 4,25 | 2,68 | 3,94 | 4,16 | 4,10 | 5,15 | 4,20 | 4,26 | 4,50 | 3,46 | 4,50 | 5,06 | 5,57 | 2,91 | 3,65 | 4,31 | 4,26 | 0,91 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_152166 | LinJ.03.0500 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,61 | 1,99 | 1,89 | 1,96 | 1,37 | 2,00 | 1,99 | 4,09 | 2,00 | 1,62 | 2,10 | 1,84 | 1,54 | 2,00 | 2,16 | 2,92 | 2,54 | 2,10 | 2,23 | 1,99 | 1,75 | 2,66 | 1,77 | 2,14 | 1,77 | 2,24 | 0,91 | 0,048 | 0,045 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | |
|----------------|--|--|----------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------|----------------------|----------------------|------------|------------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | | | | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_127091 | LinJ.07.0640 LinJ.07.0650 | hypothetical protein, conserved | 2 | 4,25 | 4,04 | 3,91 | 3,96 | 4,70 | 4,29 | 4,25 | 3,59 | 4,05 | 5,55 | 3,96 | 2,85 | 3,05 | 4,03 | 4,05 | 3,30 | 4,88 | 4,84 | 4,22 | 4,46 | 4,77 | 4,34 | 4,93 | 4,13 | 4,42 | 4,50 | 0,92 | 0,025 | 0,022 |
| OG5_128085 | LinJ.30.3440 | CAS/CSE/importin domain protein, putative | 1 | 2,05 | 2,54 | 2,22 | 1,92 | 2,12 | 1,77 | 1,78 | 1,92 | 1,95 | 1,61 | 1,45 | 1,69 | 1,91 | 1,67 | 2,13 | 1,91 | 1,86 | 2,20 | 2,05 | 2,32 | 2,30 | 1,95 | 2,09 | 1,82 | 1,98 | 2,18 | 0,92 | 0,046 | 0,047 |
| OG5_126880 | LinJ.18.0090 | alpha glucosidase II subunit, putative | 1 | 2,00 | 2,10 | 1,65 | 3,20 | 1,51 | 1,93 | 1,37 | 1,81 | 1,82 | 1,54 | 1,69 | 1,81 | 2,08 | 1,99 | 2,04 | 2,27 | 1,95 | 1,91 | 1,68 | 2,10 | 2,01 | 2,18 | 1,95 | 2,62 | 2,01 | 1,92 | 0,92 | 0,051 | 0,048 |
| OG5_143849 | LinJ.27.1870 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,09 | 2,42 | 2,11 | 1,78 | 2,32 | 2,10 | 1,86 | 1,89 | 2,01 | 2,04 | 2,22 | 2,03 | 1,92 | 2,03 | 2,12 | 2,41 | 2,26 | 2,36 | 2,25 | 2,36 | 1,98 | 1,84 | 2,49 | 2,17 | 2,07 | 2,37 | 0,93 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_141729 | LinJ.31.1230 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,98 | 3,86 | 4,03 | 4,98 | 3,80 | 3,91 | 4,16 | 3,86 | 3,83 | 3,91 | 3,68 | 4,20 | 4,57 | 4,07 | 4,06 | 4,05 | 4,04 | 4,08 | 4,03 | 4,29 | 4,10 | 5,23 | 3,95 | 5,45 | 4,50 | 4,35 | 0,93 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_166755 | LinJ.31.0420 | calpain-like protein, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative | 1 | 3,86 | 4,01 | 4,01 | 5,11 | 3,92 | 3,92 | 3,86 | 4,59 | 3,83 | 3,75 | 4,12 | 4,12 | 3,67 | 4,38 | 4,28 | 4,40 | 3,57 | 4,54 | 4,13 | 3,99 | 4,47 | 5,26 | 4,35 | 4,46 | 4,53 | 4,32 | 0,94 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_183149 | LinJ.04.0830 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,01 | 1,89 | 1,85 | 1,87 | 1,92 | 1,80 | 2,54 | 1,80 | 1,73 | 1,53 | 2,30 | 1,90 | 1,60 | 2,08 | 2,09 | 2,17 | 2,14 | 2,05 | 1,80 | 1,81 | 2,01 | 2,03 | 2,31 | 1,95 | 2,11 | 1,97 | 0,94 | 0,051 | 0,048 |
| OG5_127551 | LinJ.07.0440 | ubiquitin-protein ligase-like, putative | 1 | 1,92 | 2,00 | 1,93 | 2,02 | 2,12 | 2,17 | 2,07 | 2,06 | 2,09 | 2,16 | 2,07 | 2,02 | 2,11 | 1,80 | 2,08 | 2,10 | 2,02 | 2,00 | 2,18 | 1,89 | 2,15 | 2,27 | 2,29 | 2,29 | 2,42 | 2,21 | 0,94 | 0,037 | 0,034 |
| OG5_141043 | LinJ.36.1800 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,04 | 2,02 | 1,87 | 2,04 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,03 | 2,06 | 1,86 | 1,93 | 1,83 | 1,86 | 2,03 | 2,20 | 2,05 | 2,07 | 2,07 | 2,09 | 2,15 | 1,98 | 1,95 | 2,08 | 2,14 | 1,97 | 1,87 | 0,96 | 0,021 | 0,018 |
| OG5_130635 | LinJ.27.2520 LinJ.27.0500 LinJ.27.0510 | cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative, calpain-like cysteine peptidase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative | 3 | 6,35 | 6,21 | 6,32 | 6,34 | 6,29 | 6,65 | 6,85 | 6,25 | 6,67 | 6,22 | 6,34 | 7,16 | 6,21 | 6,28 | 5,84 | 6,12 | 6,09 | 6,17 | 6,77 | 6,31 | 6,48 | 6,06 | 6,66 | 6,11 | 6,06 | 5,98 | 1,04 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_152421 | LinJ.34.1500 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,09 | 2,10 | 2,18 | 1,80 | 1,97 | 2,00 | 2,02 | 2,16 | 2,12 | 2,18 | 2,16 | 2,11 | 1,97 | 2,08 | 2,16 | 2,04 | 2,08 | 2,00 | 1,96 | 1,97 | 1,93 | 1,97 | 1,96 | 1,86 | 1,91 | 2,07 | 1,04 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_131582 | LinJ.27.1740 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,21 | 2,12 | 2,15 | 2,08 | 1,73 | 2,10 | 2,51 | 2,13 | 2,13 | 2,40 | 2,44 | 2,18 | 2,00 | 2,29 | 2,04 | 1,99 | 2,18 | 2,07 | 1,97 | 2,17 | 2,14 | 1,94 | 1,92 | 2,22 | 1,90 | 2,01 | 1,06 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_179419 | LinJ.27.1720 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,51 | 2,85 | 2,50 | 2,27 | 2,19 | 2,79 | 2,64 | 2,31 | 2,32 | 2,57 | 2,33 | 2,74 | 2,32 | 2,43 | 2,24 | 2,39 | 2,63 | 2,49 | 2,03 | 2,50 | 2,26 | 2,31 | 2,33 | 2,29 | 2,28 | 2,08 | 1,07 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_173489 | LinJ.24.1940 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,87 | 2,12 | 2,16 | 1,93 | 2,67 | 2,22 | 2,35 | 2,16 | 2,16 | 2,22 | 2,01 | 2,32 | 2,21 | 2,21 | 1,96 | 2,46 | 2,18 | 1,98 | 2,07 | 2,05 | 2,37 | 2,00 | 1,76 | 2,06 | 2,12 | 2,01 | 1,08 | 0,035 | 0,032 |
| OG5_146120 | LinJ.36.6050 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,85 | 2,06 | 1,93 | 1,73 | 1,88 | 2,09 | 1,86 | 1,93 | 2,13 | 2,25 | 2,18 | 2,37 | 2,10 | 2,00 | 1,77 | 1,88 | 2,08 | 1,73 | 2,03 | 2,12 | 1,66 | 1,86 | 1,75 | 1,69 | 1,85 | 1,85 | 1,09 | 0,013 | 0,011 |
| OG5_173539 | LinJ.36.2880 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,55 | 1,94 | 2,39 | 2,46 | 2,07 | 2,68 | 2,43 | 2,04 | 2,44 | 2,52 | 2,29 | 2,44 | 2,46 | 2,83 | 2,31 | 2,40 | 1,81 | 2,28 | 2,55 | 2,45 | 1,70 | 1,97 | 1,94 | 2,33 | 2,20 | 2,30 | 1,10 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_139992 | LinJ.29.0360 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,17 | 2,00 | 2,11 | 1,90 | 2,20 | 2,15 | 2,03 | 2,18 | 1,77 | 1,94 | 2,36 | 2,20 | 1,72 | 2,40 | 1,91 | 1,74 | 1,92 | 1,83 | 1,54 | 1,96 | 2,02 | 2,02 | 1,53 | 2,00 | 1,80 | 2,44 | 1,10 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_129179 | LinJ.34.3300 | peroxisome biosynthesis protein-like protein | 1 | 2,13 | 1,99 | 2,02 | 1,45 | 2,22 | 1,90 | 1,72 | 2,23 | 1,99 | 2,09 | 1,78 | 2,06 | 1,96 | 2,36 | 1,65 | 1,66 | 1,99 | 1,81 | 2,06 | 1,72 | 1,66 | 1,88 | 2,28 | 1,85 | 1,54 | 1,67 | 1,10 | 0,031 | 0,028 |
| OG5_184123 | LinJ.36.0740 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,98 | 2,08 | 2,31 | 2,09 | 1,80 | 1,95 | 1,79 | 1,69 | 1,96 | 1,93 | 2,24 | 2,08 | 1,63 | 1,89 | 1,80 | 1,88 | 1,94 | 1,68 | 1,61 | 2,43 | 1,32 | 1,65 | 1,95 | 1,70 | 1,58 | 1,79 | 1,10 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_151799 | LinJ.32.4080 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,05 | 2,69 | 2,00 | 2,01 | 2,01 | 2,01 | 1,92 | 2,11 | 3,23 | 2,09 | 2,14 | 1,97 | 1,80 | 2,29 | 1,90 | 1,92 | 1,95 | 2,12 | 1,96 | 1,99 | 2,01 | 1,93 | 1,88 | 2,02 | 1,99 | 1,89 | 1,10 | 0,025 | 0,022 |
| OG5_153744 | LinJ.36.0930 | DEAH-box RNA helicase, putative | 1 | 2,41 | 2,10 | 1,85 | 1,87 | 2,62 | 1,96 | 2,18 | 1,96 | 2,20 | 2,34 | 1,87 | 2,25 | 1,80 | 2,00 | 2,01 | 1,96 | 1,82 | 1,80 | 2,28 | 1,86 | 1,77 | 1,81 | 2,06 | 1,89 | 1,71 | 1,79 | 1,11 | 0,022 | 0,019 |
| OG5_128747 | LinJ.36.3040 | ATP-binding cassette protein subfamily G, member 6, putative (ABCG6) | 1 | 2,13 | 2,26 | 2,62 | 2,43 | 2,37 | 2,38 | 1,98 | 2,16 | 2,54 | 2,35 | 2,31 | 2,83 | 2,09 | 2,57 | 2,66 | 2,47 | 2,02 | 1,90 | 2,07 | 2,31 | 2,24 | 2,21 | 1,89 | 2,28 | 1,77 | 1,68 | 1,11 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_139047 | LinJ.21.0900 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,13 | 2,05 | 3,14 | 1,95 | 2,21 | 2,13 | 2,93 | 2,27 | 2,25 | 1,65 | 2,14 | 2,02 | 1,72 | 2,30 | 2,15 | 1,94 | 2,02 | 1,71 | 2,06 | 1,97 | 1,94 | 2,04 | 1,91 | 1,92 | 2,00 | 2,11 | 1,11 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_128127 | LinJ.21.0880 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,45 | 2,36 | 2,76 | 2,15 | 1,95 | 2,35 | 3,08 | 2,17 | 1,83 | 2,04 | 2,33 | 2,21 | 2,03 | 1,73 | 1,96 | 1,93 | 1,87 | 1,90 | 1,81 | 2,13 | 2,02 | 2,13 | 2,28 | 1,97 | 2,11 | 2,05 | 1,12 | 0,042 | 0,039 |
| OG5_151378 | LinJ.36.5020 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,41 | 2,19 | 2,03 | 1,92 | 1,75 | 2,09 | 1,96 | 1,87 | 2,35 | 2,02 | 2,40 | 2,32 | 2,22 | 2,44 | 2,11 | 2,03 | 1,75 | 1,90 | 2,02 | 2,36 | 2,17 | 1,79 | 1,69 | 1,78 | 1,83 | 1,56 | 1,12 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_129632 | LinJ.36.5180 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,23 | 2,17 | 1,95 | 2,24 | 2,16 | 1,83 | 1,85 | 1,92 | 1,89 | 1,96 | 2,13 | 2,02 | 2,01 | 1,89 | 2,12 | 1,63 | 1,56 | 1,88 | 2,02 | 2,04 | 2,09 | 1,81 | 1,54 | 1,88 | 1,38 | 1,71 | 1,12 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_148444 | LinJ.16.1260 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,98 | 2,43 | 2,18 | 2,77 | 1,73 | 1,90 | 2,09 | 1,80 | 2,02 | 2,20 | 2,57 | 2,10 | 1,95 | 2,28 | 1,84 | 1,93 | 1,75 | 2,22 | 1,77 | 1,86 | 2,18 | 1,90 | 1,79 | 1,92 | 1,81 | 2,00 | 1,12 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_126701 | LinJ.13.0390 | RNA helicase, putative | 1 | 2,46 | 2,71 | 2,02 | 3,09 | 2,34 | 1,92 | 2,29 | 2,28 | 2,77 | 2,25 | 2,67 | 2,25 | 3,68 | 2,08 | 2,46 | 2,13 | 1,88 | 2,22 | 2,00 | 2,11 | 1,80 | 2,20 | 2,25 | 3,24 | 2,18 | 2,19 | 1,12 | 0,046 | 0,047 |
| OG5_171427 | LinJ.01.0840 | potassium channel subunit-like protein | 1 | 2,17 | 1,91 | 1,61 | 2,69 | 2,01 | 1,84 | 1,57 | 1,98 | 2,05 | 1,91 | 2,11 | 1,95 | 1,82 | 1,84 | 1,66 | 1,76 | 1,70 | 1,78 | 1,70 | 1,66 | 1,81 | 1,85 | 1,62 | 1,85 | 1,73 | 1,90 | 1,12 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_128477 | LinJ.27.0770 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,82 | 1,89 | 1,82 | 2,17 | 2,12 | 1,90 | 1,57 | 2,29 | 2,29 | 2,31 | 1,78 | 2,26 | 2,19 | 2,12 | 1,84 | 1,72 | 1,73 | 1,87 | 1,79 | 2,01 | 1,87 | 1,50 | 1,63 | 1,79 | 2,08 | 1,97 | 1,12 | 0,015 | 0,015 |
| OG5_151652 | LinJ.24.1540 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,03 | 2,51 | 1,93 | 2,47 | 2,27 | 2,33 | 2,28 | 1,52 | 2,73 | 2,35 | 2,31 | 2,11 | 1,77 | 2,28 | 2,52 | 2,21 | 2,00 | 1,56 | 1,76 | 1,93 | 1,86 | 2,20 | 1,55 | 2,21 | 1,70 | 2,08 | 1,12 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_183453 | LinJ.18.1290 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,10 | 2,13 | 2,27 | 3,74 | 2,38 | 1,99 | 2,65 | 2,10 | 1,94 | 2,44 | 2,13 | 2,21 | 1,96 | 2,57 | 1,91 | 2,14 | 1,81 | 1,55 | 2,21 | 2,16 | 1,91 | 1,86 | 2,11 | 3,32 | 2,05 | 1,83 | 1,12 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_184127 | LinJ.36.0840 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,98 | 2,23 | 2,31 | 2,38 | 2,39 | 2,51 | 2,42 | 1,96 | 2,26 | 2,06 | 2,31 | 1,81 | 2,14 | 2,37 | 1,65 | 1,85 | 2,04 | 1,47 | 2,10 | 2,06 | 2,78 | 1,51 | 1,80 | 2,03 | 2,36 | 2,00 | 1,13 | 0,023 | 0,023 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | | | |
|----------------|--|--|----------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|----------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|
| | | | | MA-01 | MA-02 | MA-03 | MA-04 | MA-05 | MG-12 | MG-14 | MG-19 | PI-04 | PI-05 | PI-07 | PI-08 | PI-09 | PI-10 | MA-07 | MG-11 | MG-13 | MG-15 | MG-16 | MG-17 | | | | MG-18 | PI-01 | PI-02 | PI-03 | PI-11 | PI-12 |
| | | | | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | A | A | A | A | A | A |
| OG5_166715 | LinJ.34.4250 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,08 | 1,85 | 1,97 | 1,43 | 1,72 | 2,23 | 2,19 | 1,97 | 2,04 | 2,92 | 2,15 | 1,86 | 2,01 | 1,58 | 1,39 | 2,13 | 1,95 | 1,98 | 1,62 | 1,75 | 1,43 | 1,79 | 1,74 | 1,86 | 1,77 | 1,86 | 1,13 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_146716 | LinJ.29.2550 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,09 | 2,29 | 1,98 | 2,69 | 2,14 | 1,89 | 1,41 | 1,96 | 2,39 | 2,20 | 2,29 | 2,33 | 1,77 | 2,40 | 1,85 | 1,50 | 2,09 | 2,07 | 1,72 | 1,79 | 2,06 | 1,57 | 1,76 | 2,05 | 2,23 | 1,97 | 1,13 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_146086 | LinJ.35.3160 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,45 | 2,74 | 2,82 | 2,11 | 2,63 | 1,67 | 1,97 | 1,96 | 2,35 | 2,38 | 2,48 | 2,62 | 2,32 | 2,56 | 1,99 | 1,95 | 1,72 | 1,48 | 1,91 | 2,07 | 2,08 | 3,40 | 1,71 | 2,21 | 2,27 | 2,26 | 1,13 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_145934 | LinJ.34.1780 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,33 | 1,91 | 1,95 | 2,18 | 1,83 | 2,17 | 1,84 | 2,51 | 2,12 | 2,13 | 1,84 | 1,63 | 1,89 | 1,84 | 1,72 | 1,53 | 1,87 | 2,16 | 1,72 | 1,73 | 1,93 | 1,94 | 1,69 | 1,71 | 1,78 | 1,54 | 1,13 | 0,011 | 0,011 |
| OG5_126674 | LinJ.04.0010 | calcium-translocating P-type ATPase | 1 | 2,21 | 1,76 | 1,96 | 2,06 | 2,02 | 1,91 | 3,01 | 2,15 | 1,74 | 2,02 | 1,80 | 2,35 | 1,81 | 1,99 | 1,78 | 1,69 | 1,76 | 1,84 | 2,00 | 1,73 | 1,98 | 2,06 | 1,41 | 1,82 | 1,79 | 1,82 | 1,14 | 0,024 | 0,021 |
| OG5_128399 | LinJ.24.0330 | ethanolamine phosphotransferase, putative | 1 | 1,92 | 2,17 | 2,04 | 2,12 | 2,20 | 1,95 | 1,87 | 2,32 | 2,00 | 1,22 | 2,34 | 2,64 | 2,16 | 1,95 | 1,86 | 1,56 | 1,94 | 2,19 | 1,79 | 1,96 | 1,27 | 1,46 | 2,03 | 2,30 | 1,76 | 1,66 | 1,14 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_152403 | LinJ.32.1270 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,80 | 2,12 | 1,82 | 2,05 | 2,24 | 1,42 | 2,08 | 2,52 | 2,40 | 2,33 | 2,07 | 2,06 | 2,05 | 1,93 | 2,01 | 1,98 | 1,87 | 1,24 | 1,49 | 1,65 | 2,09 | 1,94 | 1,52 | 2,06 | 1,88 | 2,00 | 1,14 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_131078 | LinJ.21.0590 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,33 | 1,97 | 3,13 | 2,06 | 2,19 | 2,25 | 3,14 | 2,10 | 2,01 | 2,23 | 1,94 | 2,21 | 1,97 | 2,09 | 1,84 | 2,14 | 2,20 | 2,18 | 2,14 | 1,76 | 1,90 | 2,24 | 1,96 | 1,74 | 1,91 | 1,80 | 1,14 | 0,023 | 0,024 |
| OG5_126744 | LinJ.30.2470 LinJ.30.2480 LinJ.30.2530 LinJ.30.2540 | heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative | 4 | 7,42 | 11,30 | 8,26 | 7,16 | 8,38 | 7,44 | 6,80 | 7,61 | 6,57 | 7,79 | 7,57 | 8,25 | 7,55 | 6,95 | 5,91 | 7,84 | 6,66 | 6,16 | 6,84 | 7,39 | 7,55 | 6,08 | 6,97 | 6,54 | 6,59 | 7,47 | 1,14 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_151859 | LinJ.36.1830 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,93 | 1,85 | 1,84 | 2,34 | 2,01 | 1,95 | 2,09 | 1,29 | 2,29 | 2,62 | 2,08 | 1,93 | 1,88 | 1,54 | 1,60 | 1,84 | 1,69 | 1,57 | 1,32 | 1,92 | 1,68 | 1,86 | 1,86 | 1,60 | 1,91 | 1,94 | 1,14 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_148094 | LinJ.21.1780 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,85 | 1,91 | 2,93 | 1,93 | 2,18 | 1,81 | 3,19 | 1,98 | 2,23 | 2,15 | 1,55 | 1,89 | 2,11 | 2,05 | 1,64 | 1,93 | 1,91 | 1,83 | 2,12 | 1,74 | 1,96 | 2,04 | 1,76 | 1,82 | 1,80 | 1,78 | 1,14 | 0,027 | 0,025 |
| OG5_148246 | LinJ.04.0990 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,10 | 1,86 | 1,84 | 2,24 | 2,03 | 1,90 | 3,13 | 2,27 | 2,09 | 2,15 | 2,20 | 2,22 | 2,32 | 2,13 | 1,62 | 2,08 | 1,99 | 1,98 | 1,73 | 2,09 | 1,51 | 2,07 | 1,57 | 2,34 | 1,76 | 2,08 | 1,14 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_127434 | LinJ.29.2650 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,78 | 1,86 | 1,76 | 2,10 | 2,32 | 1,65 | 2,69 | 1,94 | 1,83 | 2,01 | 1,75 | 2,28 | 1,89 | 2,36 | 1,56 | 1,71 | 2,37 | 1,78 | 1,70 | 1,69 | 1,55 | 1,52 | 1,79 | 1,28 | 1,75 | 2,42 | 1,15 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_128521 | LinJ.21.0690 LinJ.21.0680 | DNA polymerase eta, putative | 2 | 4,68 | 4,56 | 7,27 | 4,57 | 4,37 | 4,18 | 6,19 | 4,27 | 4,14 | 4,10 | 4,23 | 4,49 | 4,10 | 3,84 | 4,18 | 3,71 | 4,68 | 3,63 | 4,31 | 4,28 | 3,12 | 3,74 | 3,57 | 4,06 | 5,09 | 4,09 | 1,15 | 0,042 | 0,039 |
| OG5_146404 | LinJ.36.0860 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,23 | 2,87 | 2,88 | 2,00 | 1,73 | 2,25 | 1,79 | 2,28 | 2,43 | 2,42 | 1,89 | 2,38 | 2,52 | 1,94 | 1,37 | 2,35 | 1,89 | 1,95 | 2,07 | 1,69 | 2,20 | 2,20 | 2,29 | 1,72 | 2,03 | 1,77 | 1,15 | 0,042 | 0,039 |
| OG5_172083 | LinJ.32.2660 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,98 | 2,73 | 1,98 | 1,82 | 2,09 | 2,12 | 1,61 | 2,09 | 3,22 | 2,19 | 2,67 | 2,32 | 2,51 | 1,92 | 1,97 | 1,77 | 2,10 | 1,90 | 2,04 | 1,70 | 1,53 | 1,48 | 2,47 | 2,43 | 1,92 | 1,82 | 1,16 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_148230 | LinJ.01.0410 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,43 | 2,42 | 1,58 | 3,03 | 2,37 | 1,94 | 1,94 | 2,00 | 1,89 | 2,49 | 2,16 | 2,22 | 1,87 | 2,15 | 1,76 | 2,28 | 1,65 | 1,62 | 2,15 | 2,12 | 1,65 | 2,24 | 1,82 | 1,41 | 1,74 | 2,12 | 1,16 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_183987 | LinJ.32.2740 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,60 | 2,80 | 2,58 | 2,20 | 2,95 | 1,87 | 1,26 | 2,05 | 2,80 | 1,76 | 2,70 | 2,63 | 2,54 | 2,27 | 1,71 | 2,10 | 2,01 | 2,10 | 2,22 | 1,61 | 2,59 | 1,48 | 1,75 | 2,46 | 1,72 | 2,62 | 1,16 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_183977 | LinJ.32.2190 | ABC transporter-like protein | 1 | 1,94 | 3,03 | 1,51 | 2,03 | 2,15 | 2,32 | 2,34 | 2,26 | 2,55 | 2,42 | 2,29 | 2,21 | 2,88 | 2,39 | 2,14 | 1,80 | 2,00 | 2,01 | 1,99 | 1,94 | 2,15 | 1,35 | 2,00 | 2,13 | 2,56 | 1,76 | 1,16 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_128215 | LinJ.17.1390 | translation initiation factor, putative | 1 | 2,26 | 1,16 | 2,23 | 2,21 | 1,90 | 1,85 | 2,31 | 1,52 | 2,05 | 1,93 | 2,10 | 1,92 | 1,86 | 2,06 | 1,18 | 1,78 | 1,55 | 1,87 | 2,00 | 1,45 | 1,77 | 2,33 | 1,51 | 1,31 | 1,54 | 1,88 | 1,16 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_183387 | LinJ.15.0880 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,83 | 2,84 | 1,76 | 2,24 | 2,19 | 1,93 | 2,45 | 1,68 | 2,48 | 2,23 | 2,13 | 1,76 | 2,09 | 2,66 | 1,50 | 1,72 | 1,61 | 1,88 | 1,89 | 1,94 | 1,67 | 1,61 | 2,12 | 2,59 | 2,32 | 1,47 | 1,16 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_142223 | LinJ.17.0970 | META domain containing protein, putative (META2) | 1 | 2,14 | 1,82 | 2,04 | 1,99 | 1,82 | 1,31 | 1,87 | 2,38 | 2,52 | 1,48 | 1,97 | 2,27 | 2,14 | 1,90 | 2,10 | 1,95 | 1,21 | 1,67 | 1,40 | 1,81 | 1,67 | 2,04 | 1,89 | 1,84 | 1,05 | 1,77 | 1,16 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_128169 | LinJ.36.1920 | DEAD box RNA helicase, putative | 1 | 2,39 | 2,39 | 1,68 | 2,31 | 2,45 | 2,97 | 2,32 | 1,79 | 2,38 | 1,74 | 2,42 | 3,24 | 2,21 | 2,23 | 1,96 | 2,21 | 1,93 | 1,66 | 2,20 | 2,04 | 1,71 | 2,06 | 1,71 | 2,74 | 1,17 | 2,55 | 1,16 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_150656 | LinJ.33.2690 | Unc104-like kinesin, putative | 1 | 3,13 | 2,83 | 3,18 | 1,84 | 3,00 | 2,11 | 2,22 | 1,90 | 3,22 | 2,10 | 3,37 | 2,00 | 2,17 | 2,24 | 2,04 | 1,93 | 1,66 | 1,80 | 1,93 | 3,11 | 1,98 | 2,83 | 1,98 | 2,63 | 1,99 | 2,04 | 1,17 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_131396 | LinJ.14.0880 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,14 | 2,87 | 2,27 | 2,55 | 1,87 | 2,18 | 2,79 | 1,72 | 2,79 | 2,31 | 2,53 | 1,67 | 2,15 | 1,68 | 1,73 | 1,99 | 2,04 | 1,54 | 1,55 | 1,81 | 2,36 | 3,16 | 1,45 | 2,08 | 1,81 | 1,61 | 1,17 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_148074 | LinJ.14.0110 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,40 | 3,45 | 2,08 | 2,91 | 2,38 | 2,80 | 1,81 | 2,52 | 3,54 | 2,22 | 1,64 | 2,34 | 1,86 | 2,32 | 1,65 | 2,09 | 2,25 | 2,21 | 2,23 | 1,81 | 1,78 | 3,39 | 2,05 | 1,91 | 1,95 | 1,79 | 1,17 | 0,041 | 0,040 |
| OG5_151512 | LinJ.16.1600 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,09 | 1,92 | 2,02 | 2,54 | 2,42 | 1,86 | 2,31 | 2,42 | 1,89 | 2,60 | 2,24 | 2,01 | 2,08 | 1,72 | 1,49 | 2,13 | 1,91 | 1,76 | 2,04 | 1,66 | 1,40 | 2,05 | 1,88 | 1,78 | 1,80 | 2,18 | 1,17 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_183955 | LinJ.32.0850 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,52 | 3,36 | 1,47 | 2,18 | 1,94 | 2,12 | 2,12 | 2,08 | 3,43 | 2,39 | 2,23 | 1,45 | 2,62 | 2,25 | 2,00 | 1,39 | 1,72 | 1,89 | 2,21 | 1,96 | 2,09 | 2,56 | 2,05 | 1,82 | 1,86 | 1,97 | 1,17 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_184001 | LinJ.32.3710 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,10 | 3,18 | 3,40 | 2,57 | 2,61 | 2,52 | 2,41 | 3,16 | 3,01 | 2,24 | 1,20 | 1,30 | 2,73 | 2,46 | 2,00 | 2,68 | 2,15 | 1,59 | 2,12 | 2,03 | 2,61 | 1,99 | 2,42 | 2,10 | 2,06 | 1,75 | 1,17 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_132621 | LinJ.30.2160 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,44 | 3,25 | 1,60 | 2,11 | 1,73 | 1,95 | 2,00 | 2,13 | 2,51 | 2,52 | 2,09 | 2,30 | 1,62 | 2,29 | 1,51 | 1,48 | 2,13 | 2,00 | 2,23 | 1,93 | 1,92 | 2,03 | 1,41 | 1,94 | 1,93 | 1,84 | 1,17 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_127035 | LinJ.15.0440 | cytoplasmic l-asparaginase i-like protein | 1 | 2,14 | 2,04 | 1,79 | 2,17 | 2,93 | 2,64 | 2,14 | 1,85 | 2,78 | 1,85 | 2,13 | 2,20 | 2,41 | 1,91 | 2,31 | 1,77 | 2,65 | 1,67 | 2,48 | 2,05 | 1,82 | 1,64 | 1,90 | 1,73 | 1,64 | 0,96 | 1,17 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_151360 | LinJ.13.0420 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,75 | 3,13 | 2,11 | 3,31 | 2,36 | 2,10 | 2,45 | 1,75 | 2,86 | 2,31 | 3,11 | 2,67 | 3,47 | 2,16 | 2,08 | 1,99 | 1,90 | 2,15 | 2,27 | 2,13 | 2,10 | 1,90 | 2,51 | 3,03 | 1,98 | 1,89 | 1,17 | 0,046 | 0,047 |
| OG5_127896 | LinJ.33.2930 | GTP-binding protein, putative, GTP-binding elongation factor tu family protein, putative | 1 | 3,72 | 2,88 | 2,81 | 2,21 | 2,73 | 2,05 | 1,98 | 2,13 | 2,96 | 2,10 | 3,11 | 2,07 | 1,89 | 2,41 | 2,10 | 2,00 | 1,87 | 1,91 | 1,49 | 2,63 | 1,78 | 2,69 | 1,93 | 3,23 | 1,74 | 2,20 | 1,17 | 0,041 | 0,040 |
| OG5_147063 | LinJ.28.2500 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,79 | 2,55 | 2,05 | 2,10 | 2,28 | 2,49 | 2,48 | 2,14 | 2,18 | 2,36 | 1,57 | 2,67 | 2,15 | 1,55 | 1,68 | 1,97 | 1,57 | 1,24 | 1,78 | 1,90 | 1,55 | 1,95 | 2,13 | 1,90 | 2,18 | 2,29 | 1,18 | 0,022 | 0,019 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | | | |
|----------------|------------------------------|--|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|---------|-------------|---------|---------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | | | | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_184157 | LinJ.36.4130 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,57 | 1,79 | 1,76 | 1,83 | 2,39 | 2,22 | 1,63 | 2,57 | 2,09 | 2,41 | 2,23 | 2,09 | 2,15 | 2,46 | 1,55 | 2,09 | 1,58 | 1,88 | 2,30 | 2,05 | 1,54 | 1,89 | 1,97 | 1,73 | 1,56 | 1,88 | 1,18 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_146117 | LinJ.36.5560 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,34 | 1,81 | 2,16 | 2,02 | 2,10 | 2,02 | 1,91 | 2,37 | 2,38 | 2,10 | 1,82 | 1,78 | 2,39 | 2,25 | 1,68 | 2,04 | 1,54 | 2,09 | 1,67 | 1,76 | 1,79 | 1,66 | 1,82 | 2,22 | 1,41 | 1,80 | 1,18 | 0,003 | 0,002 |
| OG5_148529 | LinJ.34.1430 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,23 | 2,33 | 1,55 | 2,33 | 2,34 | 2,61 | 2,51 | 1,88 | 2,44 | 2,71 | 2,93 | 2,38 | 1,96 | 2,23 | 1,97 | 1,84 | 1,78 | 2,11 | 1,59 | 1,70 | 2,01 | 2,20 | 2,59 | 2,23 | 1,76 | 1,86 | 1,18 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_127071 | LinJ.32.0710 | OSM3-like kinesin, putative | 1 | 1,85 | 2,16 | 1,59 | 2,11 | 1,71 | 1,48 | 1,94 | 1,67 | 3,00 | 1,81 | 1,92 | 1,82 | 2,35 | 2,09 | 2,04 | 1,83 | 1,54 | 1,95 | 1,79 | 1,52 | 1,26 | 1,39 | 2,04 | 1,27 | 1,56 | 1,81 | 1,18 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_130867 | LinJ.15.0560 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,57 | 2,29 | 2,08 | 2,27 | 1,96 | 2,24 | 2,03 | 2,86 | 2,86 | 3,49 | 2,63 | 2,39 | 2,70 | 2,80 | 2,28 | 2,03 | 1,90 | 2,08 | 2,53 | 2,15 | 1,50 | 2,00 | 1,39 | 2,79 | 3,00 | 1,92 | 1,18 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_148719 | LinJ.26.0560 | spliced leader RNA PSE-promoter transcription factor, putative | 1 | 1,84 | 3,04 | 2,28 | 3,42 | 2,29 | 2,05 | 2,20 | 1,83 | 2,88 | 1,75 | 1,91 | 3,00 | 2,44 | 2,51 | 1,66 | 1,85 | 1,65 | 2,16 | 2,34 | 1,73 | 1,88 | 1,85 | 2,88 | 2,96 | 1,58 | 1,79 | 1,18 | 0,045 | 0,042 |
| OG5_151281 | LinJ.32.0990 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,46 | 3,22 | 1,73 | 2,46 | 2,00 | 2,21 | 2,40 | 2,31 | 2,89 | 2,02 | 2,12 | 1,85 | 1,92 | 1,26 | 2,08 | 1,53 | 2,04 | 1,63 | 2,07 | 1,78 | 1,97 | 1,78 | 1,81 | 1,85 | 2,24 | 1,64 | 1,18 | 0,033 | 0,030 |
| OG5_183327 | LinJ.13.0060 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,50 | 2,10 | 2,06 | 3,39 | 1,89 | 1,68 | 2,13 | 2,04 | 2,61 | 2,01 | 3,00 | 2,30 | 3,47 | 1,72 | 1,81 | 1,83 | 1,47 | 2,35 | 2,18 | 1,84 | 1,88 | 2,00 | 1,65 | 3,34 | 1,83 | 1,73 | 1,18 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_139387 | LinJ.30.0990 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,30 | 3,31 | 2,24 | 1,85 | 2,39 | 2,15 | 2,54 | 2,10 | 2,42 | 2,64 | 2,00 | 2,48 | 3,01 | 2,84 | 2,09 | 2,05 | 2,38 | 1,90 | 2,17 | 1,73 | 1,97 | 1,76 | 1,78 | 2,01 | 2,74 | 2,34 | 1,18 | 0,011 | 0,011 |
| OG5_153007 | LinJ.29.1420 | serine/threonine-protein kinase, putative,protein kinase, putative | 1 | 0,95 | 2,04 | 2,40 | 1,81 | 2,49 | 2,31 | 2,11 | 2,60 | 2,14 | 2,06 | 2,09 | 1,93 | 2,16 | 1,51 | 0,92 | 1,74 | 2,09 | 1,80 | 1,33 | 2,57 | 1,85 | 1,61 | 1,44 | 1,46 | 1,86 | 2,09 | 1,18 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_135897 | LinJ.33.2970 LinJ.33.3000 | D-alanyl-glycyl endopeptidase-like protein,cysteine peptidase, Clan CA, family C51, putative | 2 | 5,83 | 6,74 | 5,59 | 4,09 | 5,73 | 3,64 | 4,24 | 4,71 | 5,69 | 4,57 | 5,05 | 3,23 | 4,12 | 5,31 | 4,06 | 4,06 | 4,13 | 3,16 | 3,58 | 6,48 | 3,46 | 6,49 | 3,54 | 5,28 | 2,32 | 3,17 | 1,18 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_151492 | LinJ.13.1480 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,90 | 3,26 | 1,72 | 3,04 | 2,24 | 2,11 | 2,02 | 2,25 | 3,39 | 1,81 | 2,84 | 2,03 | 2,69 | 2,11 | 1,76 | 2,24 | 1,94 | 1,94 | 1,97 | 1,97 | 1,99 | 1,75 | 2,03 | 3,00 | 1,78 | 1,86 | 1,18 | 0,042 | 0,040 |
| OG5_183138 | LinJ.04.0150 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,69 | 1,72 | 2,63 | 1,87 | 2,07 | 2,02 | 2,72 | 2,50 | 2,12 | 2,23 | 2,37 | 2,00 | 2,75 | 3,09 | 1,60 | 2,14 | 2,25 | 1,63 | 1,80 | 1,96 | 1,69 | 2,33 | 1,66 | 1,70 | 2,37 | 2,61 | 1,18 | 0,023 | 0,024 |
| OG5_146653 | LinJ.23.0910 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,87 | 3,41 | 3,66 | 2,97 | 2,92 | 1,65 | 2,14 | 2,10 | 3,08 | 2,13 | 2,94 | 2,21 | 3,12 | 2,38 | 1,80 | 2,81 | 1,95 | 1,80 | 1,73 | 2,78 | 2,10 | 2,21 | 2,56 | 2,82 | 1,81 | 2,80 | 1,19 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_148728 | LinJ.26.0900 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,28 | 3,09 | 2,38 | 3,43 | 1,94 | 1,93 | 1,96 | 2,12 | 2,99 | 1,90 | 2,25 | 2,96 | 2,75 | 2,61 | 1,56 | 1,73 | 1,93 | 1,96 | 1,84 | 1,68 | 1,86 | 1,93 | 3,52 | 3,02 | 1,74 | 2,16 | 1,19 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_128997 | LinJ.32.0380 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,93 | 3,15 | 2,19 | 2,04 | 2,21 | 1,85 | 1,83 | 2,04 | 2,77 | 1,77 | 2,34 | 1,99 | 2,17 | 2,23 | 1,77 | 2,17 | 2,00 | 1,92 | 2,03 | 2,08 | 1,37 | 1,70 | 2,00 | 2,14 | 1,17 | 1,65 | 1,19 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_127231 | LinJ.21.0960 | methionine aminopeptidase 2, putative | 1 | 1,34 | 2,14 | 2,44 | 2,37 | 1,73 | 1,96 | 2,91 | 2,19 | 2,38 | 1,66 | 2,14 | 1,72 | 2,12 | 2,45 | 1,43 | 2,04 | 2,05 | 1,52 | 2,05 | 1,40 | 2,91 | 1,33 | 1,20 | 1,43 | 1,94 | 2,02 | 1,19 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_151708 | LinJ.27.0450 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,92 | 2,11 | 2,05 | 1,54 | 1,73 | 2,04 | 1,42 | 2,58 | 1,98 | 2,75 | 2,28 | 2,78 | 1,97 | 2,00 | 1,46 | 1,64 | 1,95 | 2,75 | 1,96 | 1,73 | 1,48 | 1,37 | 1,66 | 1,79 | 1,47 | 1,73 | 1,19 | 0,011 | 0,011 |
| OG5_126891 | LinJ.30.2180 | RING finger protein, putative | 1 | 2,09 | 2,64 | 1,88 | 2,58 | 2,15 | 1,86 | 2,12 | 2,71 | 1,72 | 2,36 | 2,62 | 2,36 | 1,93 | 1,71 | 2,32 | 1,69 | 1,72 | 1,64 | 1,66 | 1,66 | 1,85 | 1,62 | 2,04 | 1,92 | 1,99 | 2,03 | 1,19 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_184077 | LinJ.35.0940 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,27 | 3,49 | 2,97 | 2,33 | 2,50 | 2,48 | 2,37 | 2,81 | 3,58 | 2,92 | 3,39 | 2,96 | 2,10 | 1,96 | 2,06 | 2,54 | 2,26 | 1,96 | 2,00 | 2,26 | 2,60 | 3,12 | 2,13 | 2,04 | 2,43 | 2,05 | 1,19 | 0,023 | 0,024 |
| OG5_149050 | LinJ.36.0550 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,09 | 2,80 | 2,43 | 2,14 | 2,01 | 2,53 | 2,32 | 2,30 | 1,90 | 2,34 | 1,49 | 1,59 | 2,03 | 1,61 | 1,10 | 1,75 | 1,32 | 1,91 | 1,52 | 1,78 | 1,49 | 2,16 | 1,55 | 3,09 | 1,61 | 1,99 | 1,19 | 0,031 | 0,028 |
| OG5_181871 | LinJ.30.1850 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,26 | 3,25 | 2,97 | 2,55 | 2,44 | 2,45 | 1,83 | 2,88 | 2,41 | 2,66 | 1,53 | 2,18 | 2,28 | 1,60 | 1,96 | 1,92 | 2,21 | 2,44 | 1,47 | 1,79 | 2,53 | 1,74 | 1,83 | 1,43 | 2,16 | 2,43 | 1,19 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_130284 | LinJ.15.1070 | glutamate dehydrogenase (GDH) | 1 | 2,55 | 2,30 | 2,30 | 2,53 | 1,97 | 2,07 | 2,24 | 2,06 | 1,81 | 2,65 | 2,15 | 2,22 | 1,92 | 2,37 | 2,05 | 1,94 | 1,90 | 1,81 | 1,66 | 1,66 | 1,47 | 1,76 | 2,12 | 1,85 | 2,08 | 2,02 | 1,20 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_147999 | LinJ.13.1470 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,84 | 3,03 | 2,69 | 2,69 | 2,28 | 2,24 | 2,30 | 1,69 | 3,32 | 2,17 | 2,48 | 2,45 | 2,93 | 2,28 | 2,36 | 1,88 | 2,07 | 2,04 | 2,02 | 2,06 | 1,79 | 1,19 | 2,30 | 3,58 | 1,37 | 2,01 | 1,20 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_157921 | LinJ.14.0490 LinJ.14.0500 | hypothetical protein, unknown function | 2 | 6,22 | 5,22 | 3,40 | 5,80 | 4,95 | 4,05 | 4,17 | 4,63 | 4,47 | 3,13 | 4,22 | 5,98 | 4,04 | 3,43 | 4,17 | 5,06 | 3,75 | 3,09 | 3,41 | 3,80 | 3,12 | 4,05 | 4,26 | 3,31 | 3,62 | 4,02 | 1,20 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_148072 | LinJ.13.0210 | class 3 lipase, putative | 1 | 2,91 | 2,92 | 2,12 | 3,02 | 1,94 | 2,44 | 2,50 | 2,64 | 2,83 | 1,46 | 2,81 | 2,11 | 2,99 | 2,29 | 2,09 | 1,93 | 2,00 | 1,72 | 2,03 | 2,42 | 2,01 | 2,26 | 1,91 | 2,97 | 1,86 | 1,87 | 1,20 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_163862 | LinJ.35.3010 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,16 | 2,47 | 2,24 | 1,96 | 2,19 | 1,29 | 1,71 | 2,57 | 2,60 | 2,92 | 2,50 | 3,64 | 2,11 | 2,32 | 1,94 | 1,51 | 1,88 | 1,94 | 1,87 | 1,89 | 2,10 | 2,94 | 2,15 | 2,01 | 1,66 | 1,51 | 1,20 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_151516 | LinJ.17.0900 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,51 | 2,27 | 2,11 | 2,19 | 2,35 | 1,52 | 2,15 | 1,95 | 2,34 | 1,97 | 2,97 | 2,11 | 2,33 | 1,88 | 1,83 | 1,81 | 1,14 | 1,26 | 1,32 | 1,80 | 1,79 | 2,09 | 2,53 | 2,40 | 1,98 | 1,97 | 1,20 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_140622 | LinJ.35.5080 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,01 | 2,79 | 3,05 | 2,14 | 2,15 | 1,91 | 1,98 | 2,89 | 3,16 | 3,04 | 3,04 | 2,79 | 1,87 | 2,15 | 2,01 | 2,11 | 2,00 | 2,08 | 2,01 | 1,79 | 1,81 | 3,08 | 2,01 | 2,16 | 1,87 | 2,09 | 1,20 | 0,048 | 0,045 |
| OG5_131289 | LinJ.13.0440 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,91 | 3,02 | 2,01 | 3,00 | 2,08 | 2,26 | 2,90 | 2,32 | 2,82 | 2,14 | 2,66 | 1,84 | 4,10 | 1,91 | 2,45 | 1,83 | 1,84 | 2,47 | 1,80 | 1,49 | 2,28 | 1,64 | 2,43 | 3,53 | 1,54 | 1,68 | 1,20 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_126938 | LinJ.07.0550 LinJ.07.0560 | 60S ribosomal protein L7a, putative | 2 | 3,42 | 3,88 | 3,27 | 3,90 | 3,21 | 3,95 | 3,41 | 4,97 | 4,43 | 1,80 | 4,02 | 5,33 | 4,55 | 4,19 | 2,90 | 3,81 | 3,03 | 2,41 | 3,45 | 2,62 | 3,25 | 3,37 | 3,09 | 3,91 | 4,36 | 2,54 | 1,20 | 0,017 | 0,018 |
| OG5_148056 | LinJ.35.2500 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,74 | 3,05 | 2,82 | 2,18 | 1,96 | 1,72 | 2,10 | 2,99 | 3,12 | 3,14 | 3,14 | 2,68 | 2,47 | 2,27 | 2,05 | 2,20 | 1,92 | 1,93 | 1,94 | 2,36 | 1,82 | 2,71 | 1,94 | 2,23 | 2,32 | 1,78 | 1,20 | 0,048 | 0,045 |
| OG5_144160 | LinJ.26.2550 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,02 | 3,50 | 2,76 | 2,22 | 1,91 | 1,98 | 2,21 | 2,89 | 2,34 | 1,74 | 1,95 | 2,86 | 2,96 | 1,77 | 2,42 | 1,84 | 1,76 | 1,54 | 1,55 | 2,40 | 1,83 | 1,02 | 3,85 | 1,72 | 2,29 | 1,39 | 1,20 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_127429 | LinJ.33.1790 | DNA polymerase delta catalytic subunit, putative | 1 | 2,92 | 3,01 | 2,75 | 2,11 | 3,68 | 2,14 | 2,18 | 1,94 | 3,08 | 2,41 | 3,12 | 2,54 | 2,26 | 2,42 | 2,00 | 1,66 | 1,79 | 2,02 | 2,02 | 3,02 | 2,07 | 2,43 | 2,31 | 2,89 | 1,69 | 2,15 | 1,20 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_126828 | LinJ.36.6160 | choline/ethanolamine phosphotransferase (CEPT), putative | 1 | 2,22 | 2,92 | 2,19 | 2,83 | 1,68 | 2,44 | 2,62 | 1,90 | 1,44 | 2,24 | 1,84 | 2,24 | 3,05 | 2,09 | 1,57 | 1,85 | 2,04 | 1,74 | 1,79 | 2,12 | 2,26 | 2,22 | 1,60 | 2,18 | 2,05 | 1,17 | 1,20 | 0,033 | 0,030 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | |
|----------------|--|---|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | | | | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_143881 | LinJ.13.0770 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,49 | 2,44 | 2,47 | 3,05 | 2,01 | 1,90 | 2,01 | 1,76 | 3,14 | 2,23 | 3,44 | 2,66 | 2,36 | 1,84 | 1,91 | 1,70 | 1,57 | 1,40 | 1,96 | 2,49 | 2,32 | 2,28 | 1,69 | 3,30 | 1,49 | 1,94 | 1,20 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_183331 | LinJ.13.0590 | kinesin, putative | 1 | 2,00 | 3,09 | 2,24 | 3,09 | 2,19 | 2,24 | 2,34 | 2,22 | 3,35 | 2,11 | 3,48 | 1,94 | 2,90 | 2,13 | 1,82 | 1,94 | 2,47 | 2,00 | 1,89 | 1,77 | 2,28 | 2,24 | 1,88 | 2,93 | 2,01 | 1,91 | 1,20 | 0,025 | 0,023 |
| OG5_158597 | LinJ.34.3110 | cytochrome p450-like protein | 1 | 2,00 | 2,37 | 2,29 | 2,08 | 2,20 | 2,81 | 2,09 | 1,52 | 2,51 | 2,52 | 1,64 | 2,54 | 1,79 | 2,30 | 1,49 | 2,42 | 1,49 | 1,83 | 2,11 | 1,59 | 1,90 | 2,21 | 1,24 | 1,93 | 2,02 | 1,59 | 1,20 | 0,019 | 0,017 |
| OG5_141540 | LinJ.13.0930 LinJ.13.0940 | subtilisin-like serine peptidase,serine peptidase, clan SB, family S8-like protein | 2 | 4,40 | 6,19 | 3,59 | 4,93 | 3,31 | 4,11 | 5,27 | 4,71 | 6,64 | 3,87 | 6,02 | 3,81 | 6,22 | 3,98 | 4,45 | 4,79 | 3,47 | 3,28 | 2,95 | 3,79 | 3,01 | 4,60 | 3,46 | 6,18 | 4,02 | 3,59 | 1,21 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_136877 | LinJ.21.1640 | palmitoyl acyltransferase 3, putative,zinc finger domain-like protein | 1 | 2,01 | 1,99 | 2,47 | 1,85 | 1,98 | 1,67 | 2,58 | 2,81 | 2,22 | 2,24 | 2,19 | 2,01 | 2,36 | 2,37 | 1,73 | 1,80 | 1,64 | 1,82 | 1,59 | 1,52 | 2,04 | 1,30 | 2,52 | 1,97 | 1,61 | 2,25 | 1,21 | 0,008 | 0,006 |
| OG5_148411 | LinJ.14.1300 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,10 | 2,56 | 2,31 | 2,80 | 2,28 | 2,42 | 1,66 | 2,06 | 3,01 | 2,37 | 2,17 | 2,31 | 2,38 | 2,14 | 1,67 | 2,22 | 1,66 | 2,08 | 1,67 | 1,62 | 1,73 | 2,67 | 1,92 | 1,92 | 1,80 | 2,13 | 1,21 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_145063 | LinJ.21.0190 | protein kinase, putative,serine/threonine protein kinase, putative | 1 | 2,07 | 2,29 | 3,02 | 1,89 | 1,76 | 2,18 | 2,74 | 2,21 | 2,29 | 1,99 | 2,13 | 2,50 | 2,21 | 2,34 | 1,64 | 1,89 | 2,00 | 1,90 | 1,72 | 1,97 | 1,99 | 2,18 | 1,91 | 1,57 | 1,79 | 1,84 | 1,21 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_151823 | LinJ.35.2670 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,41 | 2,41 | 3,51 | 2,79 | 2,09 | 2,22 | 1,72 | 3,06 | 2,77 | 3,31 | 2,61 | 3,15 | 2,38 | 1,55 | 2,06 | 2,16 | 2,21 | 1,97 | 1,83 | 2,02 | 1,76 | 2,90 | 2,77 | 1,81 | 1,78 | 2,20 | 1,21 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_184083 | LinJ.35.1560 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,20 | 2,76 | 3,32 | 2,27 | 2,30 | 2,44 | 2,11 | 2,91 | 2,89 | 3,58 | 2,50 | 3,37 | 2,29 | 2,24 | 2,09 | 1,94 | 2,10 | 2,11 | 1,74 | 2,16 | 2,06 | 3,34 | 2,26 | 1,92 | 2,01 | 2,58 | 1,21 | 0,002 | 0,002 |
| OG5_173079 | LinJ.35.0830 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,01 | 3,12 | 3,48 | 2,50 | 2,31 | 2,35 | 2,36 | 2,84 | 3,04 | 2,93 | 3,51 | 3,28 | 2,12 | 2,16 | 2,20 | 1,99 | 2,12 | 2,38 | 1,98 | 2,16 | 1,95 | 3,63 | 2,12 | 2,40 | 1,89 | 2,07 | 1,21 | 0,015 | 0,012 |
| OG5_171037 | LinJ.30.3070 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,94 | 3,09 | 2,31 | 1,71 | 2,21 | 1,96 | 2,03 | 1,79 | 1,68 | 2,10 | 3,01 | 3,35 | 2,16 | 2,02 | 1,62 | 1,56 | 2,29 | 1,35 | 1,90 | 1,86 | 2,57 | 1,90 | 1,30 | 1,19 | 2,73 | 1,91 | 1,21 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_148000 | LinJ.01.0070 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,66 | 2,05 | 2,64 | 2,34 | 1,71 | 1,72 | 2,67 | 1,85 | 2,03 | 2,01 | 2,00 | 2,33 | 1,97 | 2,48 | 1,62 | 1,50 | 1,51 | 1,69 | 1,84 | 1,72 | 1,80 | 2,34 | 1,39 | 2,05 | 1,74 | 2,31 | 1,21 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_164020 | LinJ.35.0930 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,03 | 3,54 | 3,13 | 2,36 | 1,98 | 2,33 | 1,94 | 2,98 | 3,09 | 3,58 | 3,25 | 3,35 | 2,11 | 2,34 | 2,18 | 2,33 | 2,09 | 1,96 | 1,82 | 2,26 | 2,33 | 3,72 | 2,00 | 1,86 | 2,06 | 2,20 | 1,22 | 0,045 | 0,042 |
| OG5_183124 | LinJ.03.0170 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,17 | 2,31 | 2,18 | 1,91 | 1,90 | 2,39 | 2,10 | 4,19 | 2,58 | 2,49 | 2,30 | 2,02 | 2,04 | 1,77 | 1,86 | 2,03 | 1,76 | 1,16 | 2,22 | 1,71 | 2,03 | 2,61 | 2,08 | 1,78 | 1,62 | 1,95 | 1,22 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_154559 | LinJ.34.0430 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,26 | 1,80 | 2,41 | 3,13 | 2,02 | 1,85 | 2,84 | 1,97 | 2,24 | 1,62 | 2,11 | 2,30 | 1,93 | 2,91 | 2,25 | 1,58 | 1,96 | 1,96 | 1,94 | 1,57 | 1,72 | 1,44 | 2,31 | 1,54 | 1,23 | 2,58 | 1,22 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_137410 | LinJ.17.0840 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,45 | 1,93 | 2,14 | 2,35 | 2,20 | 1,74 | 1,99 | 2,22 | 2,36 | 1,33 | 3,06 | 2,18 | 2,49 | 2,17 | 0,99 | 1,85 | 2,30 | 1,51 | 1,68 | 2,05 | 1,77 | 1,34 | 2,50 | 2,25 | 1,81 | 1,52 | 1,22 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_130748 | LinJ.14.0320 | amino acid permease, putative (AAT21) | 1 | 2,45 | 3,96 | 2,42 | 3,12 | 2,66 | 2,00 | 2,42 | 2,21 | 3,36 | 2,29 | 2,38 | 1,95 | 2,04 | 2,26 | 1,60 | 2,53 | 2,01 | 1,96 | 1,54 | 1,53 | 2,33 | 3,04 | 2,00 | 1,82 | 2,27 | 2,37 | 1,22 | 0,035 | 0,032 |
| OG5_183969 | LinJ.32.1840 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,28 | 3,56 | 2,44 | 2,76 | 1,85 | 1,98 | 2,03 | 2,72 | 2,41 | 2,75 | 2,43 | 2,12 | 2,32 | 1,78 | 1,68 | 1,74 | 1,90 | 1,47 | 1,97 | 1,88 | 2,27 | 1,93 | 2,17 | 1,78 | 1,93 | 2,82 | 1,22 | 0,008 | 0,007 |
| OG5_147717 | LinJ.21.1480 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,32 | 1,76 | 3,39 | 2,09 | 2,66 | 2,17 | 3,07 | 1,88 | 2,44 | 1,74 | 2,19 | 2,13 | 2,13 | 2,45 | 1,96 | 1,93 | 1,98 | 1,66 | 1,81 | 1,93 | 1,75 | 1,81 | 2,31 | 2,09 | 1,78 | 1,76 | 1,22 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_140225 | LinJ.35.2870 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,89 | 2,42 | 2,85 | 1,98 | 2,17 | 2,23 | 1,50 | 3,37 | 3,17 | 2,90 | 2,67 | 3,09 | 2,20 | 1,74 | 2,00 | 2,01 | 1,69 | 1,94 | 1,74 | 2,35 | 2,06 | 2,37 | 1,94 | 1,89 | 1,96 | 2,01 | 1,22 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_126840 | LinJ.35.1150 LinJ.35.1160 LinJ.35.1140 LinJ.35.1170 | oligosaccharyl transferase-like protein, oligosaccharyl transferase subunit, putative | 4 | 10,22 | 15,79 | 16,38 | 10,63 | 10,46 | 11,66 | 10,71 | 14,75 | 15,78 | 16,54 | 14,20 | 17,22 | 10,97 | 9,85 | 11,20 | 9,05 | 10,13 | 11,11 | 9,98 | 11,26 | 10,24 | 15,61 | 9,98 | 11,06 | 10,22 | 9,96 | 1,22 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_128462 | LinJ.35.2830 LinJ.35.2860 | transporter-like protein, hypothetical protein, conserved | 2 | 3,74 | 6,10 | 5,00 | 3,95 | 3,05 | 3,60 | 4,12 | 5,10 | 5,96 | 6,39 | 5,78 | 4,89 | 4,54 | 4,62 | 3,56 | 3,80 | 4,27 | 3,43 | 3,89 | 4,23 | 3,67 | 5,41 | 3,60 | 4,00 | 3,17 | 3,78 | 1,22 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_148977 | LinJ.35.0730 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,55 | 2,80 | 2,71 | 2,42 | 2,09 | 2,71 | 1,98 | 3,48 | 2,67 | 3,52 | 2,71 | 4,15 | 1,57 | 2,19 | 1,62 | 1,83 | 2,41 | 1,94 | 1,80 | 1,90 | 2,37 | 3,96 | 1,51 | 2,11 | 1,99 | 2,12 | 1,23 | 0,042 | 0,039 |
| OG5_157992 | LinJ.32.2610 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,50 | 3,65 | 2,26 | 2,48 | 2,57 | 1,96 | 2,36 | 2,29 | 3,22 | 1,51 | 3,10 | 2,19 | 2,95 | 2,54 | 2,30 | 2,17 | 2,19 | 2,13 | 2,42 | 1,95 | 1,73 | 2,16 | 1,81 | 2,35 | 2,03 | 1,65 | 1,23 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_127813 | LinJ.32.1290 | ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1, putative | 1 | 2,28 | 2,99 | 2,37 | 1,41 | 1,88 | 2,07 | 2,87 | 2,69 | 2,45 | 2,08 | 2,76 | 1,98 | 0,94 | 1,83 | 1,98 | 2,03 | 1,49 | 2,37 | 1,59 | 1,87 | 1,07 | 2,05 | 1,54 | 1,28 | 1,90 | 2,21 | 1,23 | 0,051 | 0,048 |
| OG5_127615 | LinJ.30.2260 | zinc-finger protein, conserved | 1 | 2,57 | 2,62 | 2,66 | 1,65 | 2,17 | 1,94 | 2,82 | 2,80 | 1,74 | 2,13 | 0,77 | 1,97 | 3,65 | 2,95 | 1,52 | 1,89 | 1,93 | 1,55 | 1,52 | 2,26 | 1,83 | 2,14 | 2,13 | 1,33 | 2,21 | 2,33 | 1,23 | 0,046 | 0,047 |
| OG5_146355 | LinJ.35.2530 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,26 | 3,60 | 3,49 | 2,05 | 2,14 | 2,09 | 2,18 | 2,94 | 3,56 | 3,37 | 3,09 | 2,79 | 2,03 | 2,23 | 1,98 | 1,99 | 2,19 | 1,89 | 1,99 | 2,29 | 2,24 | 3,29 | 2,03 | 2,25 | 2,15 | 2,07 | 1,23 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_127773 | LinJ.35.1730 | ubiquitin hydrolase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative | 1 | 2,37 | 3,58 | 3,28 | 2,21 | 2,15 | 2,22 | 2,00 | 3,63 | 2,71 | 3,21 | 2,54 | 3,11 | 1,99 | 1,70 | 1,79 | 1,92 | 1,79 | 1,98 | 2,17 | 2,30 | 2,18 | 3,41 | 1,64 | 1,91 | 2,30 | 2,17 | 1,23 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_127643 | LinJ.35.2380 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,25 | 3,08 | 2,98 | 2,09 | 2,33 | 2,01 | 1,99 | 2,57 | 3,05 | 2,71 | 2,71 | 3,02 | 1,87 | 2,50 | 1,97 | 2,15 | 1,84 | 2,26 | 1,77 | 2,02 | 1,48 | 3,38 | 1,88 | 1,91 | 1,89 | 1,92 | 1,23 | 0,005 | 0,005 |
| OG5_173546 | LinJ.14.0180 | carboxypeptidase, putative,metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32 | 1 | 1,94 | 3,50 | 2,45 | 2,41 | 2,68 | 2,51 | 2,53 | 2,54 | 3,48 | 2,03 | 2,30 | 2,26 | 3,20 | 2,71 | 2,97 | 2,17 | 1,34 | 1,72 | 2,32 | 1,88 | 2,51 | 2,76 | 1,48 | 2,00 | 1,72 | 2,53 | 1,23 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_146092 | LinJ.35.4420 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,01 | 3,15 | 3,20 | 1,93 | 2,05 | 1,76 | 1,88 | 3,13 | 3,00 | 3,00 | 3,33 | 2,52 | 2,21 | 2,31 | 1,74 | 2,32 | 2,07 | 1,59 | 2,05 | 1,72 | 1,95 | 3,50 | 1,35 | 2,51 | 1,91 | 1,95 | 1,23 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_184102 | LinJ.35.3220 | protein kinase, putative | 1 | 2,03 | 2,87 | 3,24 | 1,79 | 2,24 | 1,94 | 1,99 | 2,88 | 3,31 | 3,38 | 2,90 | 2,81 | 2,07 | 1,91 | 1,81 | 1,99 | 1,85 | 2,08 | 2,19 | 2,08 | 1,84 | 2,80 | 1,94 | 2,04 | 2,13 | 1,76 | 1,24 | 0,048 | 0,045 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | | | |
|----------------|--|---|----------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------|----------------------|----------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | | | | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_128001 | LinJ.35.1660 | mismatch repair protein PMS1, putative, mismatch repair protein | 1 | 2,41 | 4,03 | 3,47 | 2,05 | 2,28 | 2,82 | 2,29 | 2,86 | 2,91 | 2,07 | 3,05 | 2,69 | 2,56 | 2,31 | 2,51 | 2,38 | 1,97 | 2,15 | 2,16 | 2,04 | 2,09 | 3,40 | 2,06 | 2,15 | 1,78 | 1,53 | 1,24 | 0,006 | 0,006 |
| OG5_183338 | LinJ.13.1230 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,73 | 3,15 | 1,87 | 3,21 | 1,93 | 2,23 | 2,16 | 1,50 | 2,76 | 2,05 | 3,38 | 1,87 | 3,15 | 1,86 | 1,73 | 1,84 | 2,60 | 1,95 | 1,88 | 1,13 | 1,90 | 1,79 | 1,76 | 2,51 | 1,74 | 2,65 | 1,24 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_184091 | LinJ.35.2300 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,46 | 3,41 | 2,99 | 1,93 | 2,11 | 2,06 | 2,24 | 3,12 | 2,86 | 3,01 | 3,54 | 3,01 | 2,07 | 2,34 | 2,16 | 1,77 | 2,15 | 2,06 | 2,14 | 2,17 | 2,00 | 3,13 | 1,90 | 2,13 | 2,12 | 2,04 | 1,24 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_153409 | LinJ.32.2720 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,07 | 3,02 | 2,99 | 2,06 | 2,47 | 2,07 | 2,29 | 2,21 | 3,58 | 1,58 | 2,65 | 2,23 | 2,15 | 2,29 | 1,79 | 1,82 | 1,45 | 1,55 | 2,09 | 1,80 | 1,95 | 2,45 | 2,77 | 1,38 | 2,34 | 1,91 | 1,24 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_151757 | LinJ.29.2290 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,83 | 1,56 | 2,04 | 2,06 | 1,37 | 2,09 | 2,33 | 2,96 | 1,93 | 2,43 | 1,59 | 2,54 | 2,47 | 1,26 | 1,52 | 1,12 | 1,95 | 1,50 | 1,18 | 1,87 | 2,08 | 2,76 | 1,74 | 1,25 | 1,71 | 1,72 | 1,24 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_173154 | LinJ.05.0900 | surface antigen-like protein | 1 | 3,18 | 2,70 | 3,04 | 2,94 | 2,27 | 0,56 | 2,67 | 2,01 | 2,37 | 2,91 | 4,07 | 1,39 | 2,98 | 3,02 | 2,44 | 1,96 | 2,58 | 1,90 | 1,99 | 2,36 | 1,36 | 1,75 | 1,01 | 2,56 | 1,63 | 3,40 | 1,24 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_127890 | LinJ.35.3920 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,15 | 3,78 | 2,99 | 1,63 | 2,02 | 1,87 | 2,00 | 2,54 | 2,56 | 2,24 | 3,72 | 2,38 | 2,38 | 1,89 | 1,65 | 1,87 | 1,86 | 2,30 | 2,22 | 2,10 | 1,50 | 3,05 | 1,79 | 1,82 | 1,92 | 1,50 | 1,24 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_151267 | LinJ.34.2860 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,44 | 1,79 | 2,18 | 2,38 | 2,90 | 2,57 | 2,73 | 2,52 | 2,69 | 2,27 | 2,60 | 2,46 | 1,38 | 1,49 | 2,49 | 1,87 | 2,20 | 0,70 | 2,16 | 2,42 | 1,87 | 1,34 | 2,15 | 1,66 | 1,52 | 1,65 | 1,24 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_139237 | LinJ.33.1810 | protein kinase, putative | 1 | 2,90 | 3,33 | 2,66 | 2,11 | 3,03 | 2,02 | 2,02 | 2,74 | 2,89 | 2,24 | 3,36 | 2,50 | 1,82 | 2,60 | 2,41 | 1,67 | 2,05 | 1,73 | 1,70 | 2,83 | 1,27 | 3,04 | 2,05 | 2,94 | 1,95 | 1,40 | 1,24 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_148975 | LinJ.35.0380 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,76 | 4,09 | 2,91 | 2,19 | 2,42 | 2,10 | 2,03 | 2,01 | 2,91 | 2,87 | 3,05 | 3,88 | 1,73 | 2,23 | 1,96 | 2,10 | 2,31 | 2,31 | 2,02 | 1,92 | 2,68 | 3,41 | 1,44 | 2,03 | 1,83 | 1,64 | 1,24 | 0,035 | 0,032 |
| OG5_126901 | LinJ.35.1720 | casein kinase II, putative | 1 | 2,34 | 2,43 | 3,14 | 2,14 | 1,46 | 1,71 | 1,46 | 2,60 | 2,80 | 1,85 | 2,95 | 3,33 | 2,29 | 2,95 | 1,63 | 1,12 | 2,12 | 1,82 | 2,10 | 2,38 | 1,75 | 4,01 | 2,38 | 1,08 | 1,44 | 1,22 | 1,25 | 0,041 | 0,040 |
| OG5_183406 | LinJ.16.0820 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,04 | 2,23 | 2,86 | 3,61 | 2,67 | 1,77 | 2,11 | 2,01 | 2,87 | 2,47 | 2,27 | 3,09 | 2,54 | 1,57 | 1,80 | 1,94 | 1,67 | 1,71 | 2,33 | 1,46 | 2,24 | 2,48 | 2,31 | 1,93 | 1,90 | 1,68 | 1,25 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_154645 | LinJ.32.0620 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,50 | 2,46 | 1,77 | 2,38 | 2,55 | 2,37 | 1,66 | 1,47 | 2,28 | 2,69 | 2,62 | 2,12 | 1,68 | 2,83 | 2,13 | 1,74 | 1,64 | 1,93 | 2,37 | 1,47 | 1,70 | 2,12 | 0,97 | 1,88 | 1,29 | 2,36 | 1,25 | 0,017 | 0,018 |
| OG5_133346 | LinJ.35.4620 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,41 | 3,77 | 3,26 | 2,19 | 1,71 | 2,20 | 2,29 | 2,88 | 2,95 | 3,01 | 3,22 | 2,71 | 1,83 | 1,90 | 1,80 | 2,32 | 1,96 | 2,00 | 1,91 | 1,77 | 1,94 | 3,51 | 1,92 | 1,83 | 1,79 | 2,21 | 1,25 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_148208 | LinJ.32.3690 | DEAD/DEAH box helicase, putative | 1 | 2,51 | 2,95 | 2,67 | 2,41 | 2,06 | 2,32 | 2,16 | 1,93 | 3,39 | 1,97 | 2,25 | 2,22 | 2,11 | 2,14 | 1,24 | 2,02 | 1,73 | 1,75 | 2,61 | 2,18 | 1,86 | 2,00 | 1,69 | 1,92 | 1,97 | 1,76 | 1,25 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_184069 | LinJ.35.0570 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,85 | 3,58 | 3,44 | 2,13 | 2,21 | 2,12 | 2,14 | 2,55 | 3,20 | 3,25 | 3,32 | 2,90 | 1,83 | 2,15 | 2,09 | 1,62 | 2,13 | 1,81 | 1,99 | 2,00 | 2,15 | 3,00 | 2,16 | 1,99 | 2,05 | 2,16 | 1,25 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_128620 | LinJ.35.0850 LinJ.35.1200 LinJ.35.1190 | NADH-dependent fumarate reductase-like protein, NADH-dependent fumarate reductase, putative | 3 | 5,56 | 8,83 | 10,85 | 5,79 | 6,28 | 6,63 | 7,12 | 8,16 | 9,76 | 10,82 | 8,38 | 10,33 | 7,10 | 6,49 | 6,82 | 5,84 | 6,11 | 6,52 | 5,67 | 6,26 | 6,26 | 9,30 | 5,67 | 6,66 | 5,92 | 5,88 | 1,25 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_183349 | LinJ.14.0630 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,47 | 3,24 | 1,66 | 2,79 | 2,25 | 2,06 | 2,34 | 1,73 | 3,42 | 2,03 | 2,48 | 2,03 | 1,39 | 2,22 | 2,42 | 1,80 | 2,11 | 1,40 | 1,76 | 1,70 | 1,56 | 1,98 | 1,63 | 1,79 | 2,62 | 1,26 | 1,25 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_143953 | LinJ.35.1330 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,14 | 3,47 | 3,52 | 2,12 | 2,13 | 1,95 | 2,44 | 3,10 | 2,74 | 3,37 | 3,46 | 3,17 | 2,27 | 2,02 | 2,01 | 1,59 | 1,94 | 2,32 | 2,12 | 2,53 | 2,20 | 3,09 | 2,25 | 1,91 | 1,94 | 2,11 | 1,25 | 0,015 | 0,012 |
| OG5_183432 | LinJ.30.1830 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,85 | 2,71 | 2,04 | 1,72 | 1,68 | 2,22 | 2,52 | 2,18 | 1,87 | 1,97 | 2,20 | 1,93 | 2,79 | 2,40 | 1,94 | 1,30 | 1,72 | 1,84 | 1,68 | 1,94 | 1,75 | 1,61 | 2,05 | 1,55 | 2,02 | 1,87 | 1,25 | 0,004 | 0,003 |
| OG5_127438 | LinJ.21.1820 | RNA helicase, putative | 1 | 1,66 | 1,52 | 2,91 | 1,68 | 2,26 | 2,22 | 2,56 | 3,09 | 1,97 | 2,35 | 1,55 | 2,15 | 2,35 | 2,12 | 1,96 | 1,60 | 1,61 | 1,66 | 1,57 | 2,12 | 2,17 | 2,34 | 0,89 | 1,78 | 1,75 | 1,34 | 1,25 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_146532 | LinJ.35.2370 | protein kinase, putative | 1 | 1,94 | 3,10 | 3,31 | 2,23 | 1,95 | 1,78 | 1,89 | 2,96 | 2,45 | 3,40 | 2,94 | 2,75 | 2,12 | 2,35 | 1,93 | 2,42 | 1,70 | 1,74 | 2,07 | 1,76 | 1,47 | 3,27 | 1,90 | 2,29 | 1,61 | 1,86 | 1,25 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_127578 | LinJ.35.4000 | PRP8 protein homologue, putative, U5 snRNA-associated splicing factor | 1 | 2,04 | 2,92 | 3,08 | 1,77 | 1,73 | 2,19 | 2,05 | 3,11 | 3,42 | 3,21 | 3,16 | 3,17 | 2,23 | 1,92 | 2,07 | 1,75 | 2,10 | 1,70 | 1,74 | 1,81 | 2,11 | 3,03 | 2,00 | 2,20 | 1,86 | 2,24 | 1,25 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_149004 | LinJ.35.2820 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,88 | 2,97 | 2,83 | 1,74 | 2,19 | 2,19 | 2,25 | 3,23 | 3,53 | 3,12 | 2,71 | 3,10 | 1,80 | 2,26 | 2,15 | 1,57 | 2,27 | 2,28 | 1,64 | 1,82 | 1,82 | 2,90 | 2,05 | 1,75 | 2,01 | 2,20 | 1,25 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_146081 | LinJ.35.1290 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,94 | 2,87 | 2,24 | 1,90 | 2,12 | 2,50 | 2,73 | 2,87 | 2,42 | 1,99 | 3,87 | 3,46 | 1,07 | 2,28 | 0,93 | 1,53 | 2,62 | 2,24 | 1,42 | 1,68 | 1,34 | 3,69 | 2,27 | 1,85 | 2,24 | 1,60 | 1,26 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_137457 | LinJ.35.1510 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,09 | 3,51 | 2,84 | 2,25 | 2,72 | 2,21 | 2,33 | 2,50 | 3,00 | 3,96 | 4,16 | 2,78 | 2,48 | 1,86 | 2,51 | 1,42 | 1,64 | 2,79 | 2,03 | 1,83 | 1,85 | 3,53 | 2,27 | 2,28 | 2,10 | 2,15 | 1,26 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_128776 | LinJ.36.6030 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,41 | 2,34 | 2,41 | 2,36 | 1,80 | 1,97 | 2,11 | 2,54 | 2,49 | 2,10 | 2,10 | 3,40 | 1,66 | 2,34 | 1,39 | 1,75 | 1,83 | 2,15 | 1,35 | 1,58 | 2,29 | 1,87 | 2,31 | 1,74 | 1,53 | 2,06 | 1,26 | 0,004 | 0,002 |
| OG5_145033 | LinJ.35.2810 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,99 | 2,84 | 2,78 | 1,99 | 2,64 | 2,85 | 2,17 | 3,15 | 2,53 | 3,41 | 3,19 | 2,50 | 1,77 | 2,24 | 1,90 | 1,68 | 2,06 | 1,75 | 1,44 | 1,69 | 2,51 | 3,34 | 1,87 | 2,41 | 1,57 | 2,36 | 1,26 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_126856 | LinJ.35.4860 | AMP deaminase, putative | 1 | 2,02 | 2,71 | 2,89 | 1,88 | 2,01 | 1,79 | 2,08 | 2,97 | 3,31 | 3,02 | 2,39 | 2,76 | 2,04 | 1,90 | 1,78 | 1,92 | 1,93 | 1,69 | 1,95 | 2,04 | 2,09 | 2,72 | 1,71 | 1,77 | 1,64 | 1,79 | 1,26 | 0,005 | 0,005 |
| OG5_150015 | LinJ.24.0010 | pyruvate dehydrogenase (lipoamide) kinase, putative | 1 | 1,92 | 2,50 | 1,74 | 2,21 | 2,15 | 1,32 | 1,78 | 2,30 | 2,18 | 2,82 | 2,09 | 1,57 | 2,56 | 1,91 | 2,57 | 1,79 | 1,83 | 1,09 | 2,20 | 1,50 | 2,17 | 1,45 | 1,41 | 1,12 | 1,31 | 1,36 | 1,26 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_148993 | LinJ.35.2320 | ATP-dependent RNA helicase-like protein | 1 | 2,12 | 2,83 | 3,29 | 1,95 | 1,82 | 2,28 | 1,75 | 3,06 | 2,96 | 3,94 | 3,06 | 3,05 | 2,36 | 1,78 | 2,09 | 2,06 | 1,82 | 2,21 | 1,76 | 1,74 | 2,00 | 3,05 | 2,12 | 2,04 | 1,95 | 1,88 | 1,26 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_149909 | LinJ.35.3640 | DNA repair protein RAD2, putative | 1 | 2,01 | 2,67 | 3,16 | 1,99 | 1,72 | 1,86 | 2,26 | 3,36 | 3,44 | 3,08 | 2,96 | 2,77 | 2,10 | 1,71 | 2,36 | 1,49 | 2,03 | 1,41 | 1,68 | 2,13 | 1,82 | 2,95 | 2,20 | 1,69 | 1,89 | 2,23 | 1,26 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_127343 | LinJ.32.1060 | chaperonin containing t-complex protein, putative | 1 | 2,24 | 2,63 | 1,95 | 2,01 | 2,06 | 2,20 | 2,18 | 1,93 | 2,49 | 2,09 | 1,54 | 2,53 | 2,00 | 2,24 | 1,58 | 2,16 | 1,62 | 1,52 | 1,89 | 2,06 | 1,36 | 1,82 | 1,37 | 1,09 | 1,58 | 2,42 | 1,26 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_149007 | LinJ.35.2970 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,04 | 2,80 | 3,07 | 2,08 | 1,78 | 2,29 | 1,94 | 2,84 | 3,08 | 3,26 | 2,93 | 2,95 | 2,01 | 2,41 | 1,94 | 1,93 | 1,90 | 1,47 | 1,84 | 1,82 | 2,39 | 3,05 | 1,72 | 1,84 | 2,02 | 2,19 | 1,26 | 0,008 | 0,006 |
| OG5_149013 | LinJ.35.3420 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,24 | 3,09 | 3,32 | 2,11 | 1,77 | 2,13 | 2,36 | 3,00 | 3,16 | 2,43 | 2,53 | 3,11 | 2,03 | 2,11 | 2,11 | 2,15 | 1,90 | 1,77 | 2,06 | 1,71 | 1,63 | 2,80 | 2,31 | 1,53 | 1,99 | 2,12 | 1,26 | 0,004 | 0,004 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | | | |
|------------------------|------------------------------|--|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|---------|-------------|---------|---------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | | | | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_184101 | LinJ.35.3170 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,23 | 2,86 | 2,91 | 1,96 | 1,85 | 2,23 | 1,71 | 2,53 | 2,77 | 2,92 | 2,90 | 3,11 | 2,35 | 1,84 | 1,69 | 2,36 | 1,90 | 2,00 | 1,84 | 1,90 | 1,72 | 2,35 | 1,74 | 2,03 | 1,82 | 1,83 | 1,26 | 0,009 | 0,007 |
| OG5_236284 | LinJ.31.0860 | lipase | 1 | 3,15 | 5,03 | 5,20 | 3,92 | 5,42 | 3,50 | 4,51 | 4,93 | 5,58 | 5,40 | 5,77 | 5,85 | 4,83 | 5,40 | 3,58 | 4,37 | 3,99 | 3,57 | 5,53 | 3,12 | 3,65 | 3,71 | 3,65 | 4,31 | 3,65 | 3,39 | 1,26 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_127804 | LinJ.35.0370 | ATP-dependent DEAD-box RNA helicase, putative | 1 | 2,42 | 2,16 | 2,79 | 2,22 | 2,06 | 2,51 | 2,70 | 2,57 | 2,11 | 2,45 | 3,55 | 2,15 | 1,74 | 2,76 | 1,95 | 2,34 | 2,19 | 2,16 | 1,58 | 1,56 | 1,44 | 3,08 | 1,96 | 0,83 | 1,92 | 2,17 | 1,26 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_128035 | LinJ.10.1030 | guanine nucleotide exchange factor subunit GCD7, translation initiation factor 2b, delta subunit, putative, eIF-2B GDP-GTP exchange factor, putative | 1 | 2,60 | 2,35 | 2,57 | 2,01 | 3,05 | 2,03 | 2,02 | 2,09 | 1,46 | 2,47 | 2,31 | 2,18 | 2,87 | 2,43 | 2,37 | 1,42 | 1,69 | 2,23 | 1,93 | 1,64 | 1,40 | 1,53 | 2,41 | 2,15 | 1,73 | 1,39 | 1,27 | 0,006 | 0,006 |
| OG5_148978 | LinJ.35.0860 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,22 | 3,23 | 3,24 | 2,53 | 1,00 | 2,68 | 2,15 | 2,11 | 4,36 | 3,32 | 3,82 | 2,73 | 2,01 | 3,45 | 2,74 | 2,49 | 1,96 | 1,78 | 2,15 | 2,03 | 1,83 | 2,27 | 2,08 | 2,51 | 2,66 | 1,70 | 1,27 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_149996 | LinJ.13.0230 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,29 | 3,30 | 2,34 | 2,97 | 3,78 | 2,74 | 1,93 | 1,43 | 3,53 | 1,91 | 3,12 | 2,55 | 3,96 | 2,44 | 1,91 | 2,08 | 2,67 | 1,45 | 2,91 | 2,48 | 1,74 | 1,71 | 1,97 | 3,43 | 2,09 | 1,38 | 1,27 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_148991 | LinJ.35.1990 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,41 | 3,44 | 2,62 | 2,20 | 1,75 | 2,03 | 1,94 | 3,00 | 2,95 | 3,80 | 3,64 | 3,57 | 2,27 | 2,13 | 1,95 | 2,04 | 2,06 | 2,02 | 1,83 | 2,03 | 2,06 | 3,40 | 1,80 | 1,94 | 2,06 | 2,21 | 1,27 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_148941 | LinJ.33.1340 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,90 | 2,81 | 3,63 | 1,49 | 3,00 | 1,38 | 2,29 | 0,49 | 2,61 | 2,74 | 3,95 | 2,49 | 2,29 | 2,96 | 2,15 | 2,40 | 2,15 | 1,49 | 1,32 | 1,91 | 1,96 | 1,68 | 1,59 | 3,25 | 2,03 | 2,32 | 1,27 | 0,048 | 0,045 |
| OG5_183730 | LinJ.27.0270 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,45 | 1,71 | 2,69 | 1,74 | 3,01 | 2,13 | 1,44 | 1,37 | 1,62 | 1,36 | 2,16 | 2,65 | 2,27 | 1,49 | 1,22 | 1,25 | 1,76 | 2,00 | 1,25 | 1,34 | 1,60 | 2,04 | 1,32 | 1,37 | 1,55 | 2,15 | 1,28 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_183623 | LinJ.23.1520 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,31 | 3,46 | 2,74 | 3,11 | 2,26 | 2,38 | 2,36 | 2,55 | 5,04 | 2,25 | 2,90 | 3,53 | 2,75 | 2,44 | 1,36 | 2,55 | 1,51 | 1,59 | 2,05 | 2,14 | 2,68 | 2,91 | 2,83 | 3,71 | 1,48 | 2,11 | 1,28 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_linf(LinJ.15.1300a | LinJ.15.1300a | hypothetical protein, conserved | 1 | 4,89 | 3,07 | 2,97 | 2,00 | 1,45 | 3,53 | 3,32 | 5,20 | 3,59 | 2,17 | 4,71 | 3,27 | 3,70 | 3,38 | 2,62 | 1,82 | 2,17 | 2,34 | 2,88 | 3,14 | 1,75 | 2,71 | 3,46 | 2,77 | 3,27 | 2,83 | 1,28 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_184107 | LinJ.35.3480 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,99 | 2,66 | 3,46 | 1,81 | 1,77 | 1,94 | 2,46 | 3,27 | 3,19 | 2,04 | 2,28 | 3,67 | 2,19 | 1,90 | 1,56 | 2,04 | 1,99 | 1,66 | 1,52 | 2,47 | 1,75 | 2,87 | 1,96 | 1,59 | 2,07 | 1,76 | 1,28 | 0,024 | 0,021 |
| OG5_126705 | LinJ.32.0970 | vacuolar proton-ATPase-like protein, putative | 1 | 1,80 | 3,15 | 1,96 | 1,56 | 1,69 | 2,26 | 1,66 | 2,01 | 2,92 | 2,10 | 2,57 | 2,01 | 1,55 | 2,03 | 1,57 | 1,41 | 1,83 | 1,82 | 1,50 | 1,86 | 1,62 | 1,30 | 1,44 | 1,81 | 2,20 | 1,29 | 1,28 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_147589 | LinJ.35.0200 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,96 | 3,23 | 2,96 | 2,20 | 1,97 | 2,13 | 2,13 | 3,24 | 3,07 | 3,02 | 3,34 | 3,01 | 1,92 | 2,01 | 1,93 | 1,71 | 1,72 | 2,40 | 2,30 | 1,86 | 1,89 | 2,70 | 1,90 | 2,02 | 1,95 | 1,88 | 1,28 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_143691 | LinJ.35.1010 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,94 | 3,96 | 3,11 | 2,21 | 2,09 | 2,81 | 2,53 | 2,95 | 3,23 | 2,94 | 3,17 | 3,57 | 1,81 | 2,31 | 1,76 | 2,26 | 2,12 | 1,99 | 2,13 | 2,41 | 1,65 | 3,20 | 2,27 | 1,65 | 2,16 | 2,27 | 1,28 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_148984 | LinJ.35.1550 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,75 | 2,63 | 3,33 | 2,80 | 1,73 | 2,58 | 2,20 | 3,24 | 3,11 | 2,23 | 4,33 | 2,58 | 2,44 | 2,43 | 1,92 | 2,31 | 2,15 | 1,69 | 2,45 | 2,31 | 1,97 | 2,91 | 1,84 | 1,80 | 2,13 | 2,25 | 1,28 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_129228 | LinJ.35.4730 | small nuclear RNA gene activation protein (SNAP) 50, putative | 1 | 2,28 | 3,40 | 3,30 | 1,43 | 2,34 | 2,82 | 2,89 | 2,57 | 2,46 | 2,65 | 2,71 | 2,25 | 2,75 | 2,12 | 1,29 | 2,11 | 2,57 | 2,14 | 2,36 | 1,48 | 2,40 | 2,21 | 1,77 | 1,93 | 1,44 | 2,35 | 1,28 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_148385 | LinJ.13.1610 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,86 | 2,79 | 1,88 | 2,97 | 2,01 | 2,10 | 2,13 | 2,24 | 2,87 | 2,13 | 3,55 | 1,92 | 3,21 | 1,99 | 1,50 | 1,83 | 2,02 | 1,63 | 1,92 | 1,62 | 2,10 | 1,26 | 2,00 | 2,83 | 1,96 | 1,84 | 1,28 | 0,006 | 0,005 |
| OG5_126795 | LinJ.35.4200 LinJ.35.5360 | poly(A)-binding protein 2, poly(a) binding protein, putative (PABP2), polyadenylate-binding protein 1 (PABP1) | 2 | 3,92 | 5,22 | 5,26 | 3,70 | 3,29 | 3,42 | 4,18 | 6,60 | 5,89 | 5,57 | 5,62 | 6,26 | 3,58 | 3,93 | 3,70 | 3,38 | 2,84 | 3,47 | 3,51 | 3,25 | 3,92 | 6,01 | 3,76 | 3,90 | 3,77 | 2,92 | 1,28 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_152719 | LinJ.32.2260 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,24 | 2,16 | 2,06 | 2,24 | 1,59 | 2,03 | 2,83 | 2,31 | 2,64 | 2,40 | 1,85 | 2,07 | 2,30 | 2,48 | 1,43 | 1,17 | 1,38 | 1,92 | 2,49 | 2,29 | 2,12 | 1,12 | 1,66 | 2,28 | 0,93 | 2,06 | 1,28 | 0,024 | 0,021 |
| OG5_130341 | LinJ.14.1580 | glutathione-S-transferase/glutaredoxin, putative | 1 | 4,48 | 2,71 | 2,12 | 2,54 | 2,22 | 0,83 | 2,70 | 3,55 | 3,27 | 3,06 | 3,56 | 3,01 | 1,94 | 2,42 | 2,48 | 1,99 | 1,73 | 1,54 | 1,52 | 1,97 | 1,59 | 3,69 | 2,00 | 1,90 | 3,31 | 1,92 | 1,29 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_127223 | LinJ.24.2350 | notchless homolog, putative | 1 | 2,44 | 1,81 | 2,07 | 1,90 | 1,83 | 1,74 | 2,31 | 2,21 | 2,69 | 1,91 | 2,51 | 1,36 | 1,58 | 2,36 | 1,48 | 1,57 | 1,28 | 2,11 | 1,36 | 1,99 | 1,68 | 1,74 | 0,60 | 1,78 | 1,55 | 2,01 | 1,29 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_183657 | LinJ.24.0480 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,03 | 2,65 | 1,64 | 2,22 | 2,57 | 1,73 | 1,50 | 2,31 | 1,74 | 1,45 | 1,57 | 2,32 | 1,77 | 1,89 | 1,38 | 1,16 | 1,19 | 1,39 | 1,73 | 1,23 | 1,57 | 1,97 | 1,96 | 1,47 | 1,91 | 1,94 | 1,29 | 0,027 | 0,024 |
| OG5_128567 | LinJ.35.4080 | ATP-dependent RNA helicase, putative | 1 | 2,11 | 2,31 | 2,96 | 1,93 | 1,97 | 2,45 | 1,93 | 3,00 | 2,88 | 2,69 | 3,42 | 2,59 | 1,91 | 2,86 | 1,94 | 1,60 | 2,00 | 2,19 | 2,27 | 1,93 | 1,51 | 3,02 | 1,47 | 1,90 | 1,72 | 1,68 | 1,29 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_182908 | LinJ.35.4630 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,38 | 2,80 | 4,02 | 2,03 | 2,17 | 1,93 | 2,39 | 2,71 | 3,32 | 3,56 | 2,83 | 4,00 | 1,70 | 2,31 | 2,47 | 2,45 | 1,53 | 1,98 | 2,02 | 1,84 | 2,49 | 2,47 | 1,51 | 2,17 | 2,23 | 2,09 | 1,29 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_126685 | LinJ.35.0030 | pyruvate kinase | 1 | 2,92 | 3,97 | 4,57 | 2,68 | 2,93 | 3,29 | 3,14 | 3,77 | 4,78 | 4,70 | 3,85 | 4,21 | 2,98 | 3,62 | 2,67 | 3,01 | 3,18 | 2,02 | 2,14 | 2,92 | 2,71 | 4,84 | 2,84 | 1,85 | 3,42 | 2,40 | 1,30 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_128178 | LinJ.32.2950 | RNA-binding protein, putative | 1 | 2,36 | 3,89 | 2,80 | 2,47 | 3,85 | 1,78 | 1,78 | 2,55 | 3,50 | 2,46 | 2,30 | 2,50 | 2,09 | 2,48 | 1,73 | 1,98 | 1,71 | 2,58 | 2,19 | 2,81 | 1,50 | 2,29 | 1,80 | 2,50 | 1,49 | 1,77 | 1,30 | 0,022 | 0,019 |
| OG5_183369 | LinJ.14.1360 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,45 | 3,34 | 2,29 | 2,80 | 2,06 | 1,85 | 1,94 | 1,39 | 2,71 | 1,78 | 2,16 | 2,75 | 1,99 | 1,67 | 2,06 | 1,39 | 2,05 | 1,36 | 1,99 | 1,20 | 1,54 | 3,02 | 1,07 | 1,84 | 1,38 | 1,70 | 1,30 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_143885 | LinJ.35.4770 | MCAK-like kinesin, putative | 1 | 1,84 | 2,96 | 3,11 | 1,95 | 2,46 | 2,04 | 2,35 | 2,68 | 3,49 | 4,08 | 3,91 | 3,01 | 2,05 | 0,92 | 1,72 | 1,97 | 2,35 | 1,76 | 1,98 | 2,21 | 2,03 | 3,54 | 1,22 | 1,64 | 1,89 | 2,02 | 1,30 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_128250 | LinJ.35.1960 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,83 | 3,30 | 4,42 | 2,55 | 2,47 | 2,21 | 2,09 | 2,71 | 2,46 | 3,50 | 3,13 | 3,30 | 1,83 | 1,76 | 2,20 | 1,62 | 1,76 | 1,82 | 2,28 | 1,85 | 1,43 | 2,08 | 2,37 | 2,62 | 2,72 | 1,36 | 1,30 | 0,037 | 0,035 |
| OG5_130022 | LinJ.35.4400 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,76 | 2,81 | 3,63 | 1,65 | 2,43 | 2,54 | 2,05 | 3,18 | 3,12 | 2,64 | 3,17 | 3,33 | 1,92 | 2,65 | 1,84 | 1,69 | 1,51 | 1,58 | 2,42 | 2,19 | 1,49 | 3,59 | 1,81 | 2,11 | 1,99 | 2,04 | 1,30 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_151775 | LinJ.30.2500 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,69 | 3,26 | 1,66 | 2,11 | 2,09 | 2,42 | 1,91 | 2,64 | 2,18 | 2,00 | 1,50 | 1,51 | 2,43 | 2,01 | 2,11 | 1,45 | 1,25 | 1,55 | 1,92 | 2,08 | 1,09 | 1,19 | 2,17 | 1,18 | 1,68 | 2,31 | 1,30 | 0,023 | 0,023 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | |
|----------------|------------------------------|--|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|----------------------|----------------------|---------|-------------|---------|---------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | MG-18 A | PI-01 A | | | | PI-02 A | PI-03 A | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_128561 | LinJ.35.3500 | DNA-repair protein, putative | 1 | 2,00 | 3,49 | 3,02 | 2,64 | 2,29 | 2,11 | 1,88 | 3,97 | 3,52 | 2,80 | 2,82 | 2,89 | 2,27 | 1,59 | 2,13 | 1,44 | 2,40 | 2,22 | 2,36 | 1,76 | 1,67 | 2,55 | 1,86 | 1,88 | 2,25 | 1,98 | 1,30 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_148995 | LinJ.35.2360 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,71 | 2,35 | 3,41 | 3,21 | 2,44 | 0,94 | 2,17 | 2,68 | 3,38 | 0,92 | 2,44 | 3,18 | 1,91 | 3,00 | 1,16 | 2,29 | 2,40 | 1,73 | 1,89 | 2,40 | 2,21 | 2,35 | 1,27 | 0,74 | 1,75 | 1,97 | 1,30 | 0,041 | 0,040 |
| OG5_145782 | LinJ.35.1930 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,73 | 3,34 | 3,40 | 2,11 | 2,21 | 2,43 | 1,82 | 3,04 | 3,81 | 2,85 | 2,94 | 3,57 | 1,82 | 2,14 | 1,93 | 1,60 | 2,00 | 2,07 | 2,29 | 2,24 | 2,20 | 3,03 | 1,69 | 2,20 | 1,87 | 1,35 | 1,30 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_166768 | LinJ.35.0260 | GTP-ase activating protein, putative | 1 | 2,00 | 3,19 | 2,39 | 1,57 | 2,03 | 1,63 | 2,33 | 2,76 | 2,56 | 2,99 | 3,83 | 3,22 | 1,01 | 2,15 | 2,15 | 1,23 | 1,72 | 1,56 | 1,69 | 1,97 | 1,69 | 2,40 | 1,71 | 2,26 | 2,33 | 1,38 | 1,31 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_127741 | LinJ.26.0630 | protein disulfide isomerase, putative | 1 | 2,08 | 2,32 | 2,76 | 2,27 | 1,32 | 1,91 | 1,97 | 2,28 | 3,84 | 3,07 | 2,35 | 3,21 | 2,58 | 2,95 | 2,12 | 1,91 | 1,79 | 1,31 | 1,45 | 1,90 | 0,94 | 1,55 | 3,30 | 3,33 | 1,32 | 1,98 | 1,31 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_166729 | LinJ.24.2360 | zinc-finger multi-pass transmembrane protein | 1 | 1,94 | 2,06 | 2,44 | 3,09 | 2,76 | 2,05 | 1,17 | 1,56 | 2,46 | 2,00 | 2,11 | 1,69 | 3,08 | 2,84 | 1,64 | 0,59 | 1,53 | 1,45 | 2,71 | 1,25 | 2,68 | 2,04 | 1,00 | 1,86 | 1,84 | 1,84 | 1,31 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_144776 | LinJ.35.3040 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,52 | 3,05 | 2,77 | 1,70 | 0,31 | 2,29 | 1,97 | 3,07 | 3,65 | 3,10 | 2,85 | 4,21 | 2,90 | 1,84 | 2,04 | 1,63 | 2,70 | 1,84 | 1,86 | 1,66 | 1,36 | 2,10 | 2,15 | 1,47 | 2,43 | 1,75 | 1,31 | 0,036 | 0,035 |
| OG5_126956 | LinJ.13.0260 | N-acetyltransferase subunit ARD1, putative | 1 | 2,57 | 3,54 | 1,46 | 2,91 | 1,87 | 0,97 | 3,83 | 3,08 | 3,79 | 2,57 | 3,94 | 3,18 | 4,58 | 2,73 | 2,19 | 1,60 | 2,30 | 2,68 | 0,91 | 3,88 | 2,52 | 2,40 | 2,37 | 3,06 | 2,12 | 0,71 | 1,31 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_127178 | LinJ.35.3650 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,77 | 3,11 | 2,45 | 2,64 | 1,25 | 2,14 | 2,45 | 3,83 | 2,20 | 3,10 | 3,33 | 3,28 | 1,97 | 2,31 | 2,68 | 1,82 | 1,53 | 1,35 | 1,57 | 1,44 | 2,43 | 3,07 | 2,68 | 1,63 | 2,13 | 1,69 | 1,31 | 0,022 | 0,019 |
| OG5_145746 | LinJ.35.1820 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,31 | 3,00 | 3,20 | 1,52 | 1,99 | 1,81 | 1,67 | 2,82 | 2,56 | 3,35 | 3,94 | 3,20 | 1,95 | 2,29 | 1,79 | 1,22 | 1,60 | 1,87 | 1,67 | 1,60 | 1,93 | 3,24 | 2,15 | 1,70 | 2,25 | 2,14 | 1,32 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_145899 | LinJ.13.0890 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,64 | 2,66 | 2,16 | 3,90 | 2,07 | 2,31 | 3,03 | 2,59 | 2,93 | 2,64 | 3,43 | 2,17 | 3,21 | 1,98 | 2,15 | 1,50 | 1,86 | 1,78 | 1,79 | 1,77 | 1,67 | 1,99 | 1,13 | 3,75 | 1,70 | 2,80 | 1,32 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_151750 | LinJ.29.0040 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,81 | 2,71 | 2,16 | 2,72 | 1,21 | 1,80 | 2,23 | 2,49 | 2,23 | 1,56 | 2,14 | 2,52 | 0,56 | 1,38 | 2,31 | 1,23 | 1,31 | 1,80 | 1,29 | 1,79 | 0,94 | 1,34 | 0,61 | 1,40 | 1,83 | 2,01 | 1,32 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_134521 | LinJ.35.4450 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,84 | 3,57 | 2,75 | 1,36 | 2,21 | 1,36 | 1,60 | 4,13 | 2,72 | 2,68 | 2,80 | 2,86 | 1,73 | 2,63 | 1,49 | 1,42 | 1,75 | 1,60 | 1,60 | 2,19 | 2,10 | 2,16 | 2,13 | 2,16 | 1,51 | 2,09 | 1,32 | 0,045 | 0,042 |
| OG5_129945 | LinJ.35.4740 | katanin, putative | 1 | 1,77 | 1,79 | 2,51 | 2,19 | 2,05 | 2,32 | 2,04 | 2,86 | 3,36 | 2,84 | 3,44 | 3,79 | 2,31 | 1,86 | 2,05 | 1,88 | 2,10 | 2,31 | 1,91 | 1,98 | 2,02 | 1,87 | 1,76 | 1,43 | 1,32 | 2,11 | 1,32 | 0,016 | 0,013 |
| OG5_184094 | LinJ.35.2480 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,62 | 4,62 | 2,75 | 2,08 | 1,91 | 1,82 | 1,99 | 3,38 | 2,11 | 2,78 | 2,73 | 3,70 | 1,40 | 2,07 | 1,87 | 1,72 | 1,20 | 1,47 | 2,08 | 2,72 | 2,32 | 2,50 | 2,04 | 1,59 | 1,31 | 1,79 | 1,33 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_183352 | LinJ.14.0680 | fatty acid elongase, putative | 1 | 2,71 | 3,53 | 2,55 | 3,01 | 3,07 | 2,02 | 2,42 | 1,12 | 2,43 | 1,57 | 2,59 | 2,14 | 2,87 | 2,30 | 1,49 | 0,97 | 1,92 | 2,86 | 1,46 | 0,86 | 1,66 | 2,55 | 2,40 | 1,61 | 2,08 | 2,27 | 1,33 | 0,015 | 0,015 |
| OG5_184080 | LinJ.35.1370 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,93 | 3,85 | 3,31 | 1,77 | 1,82 | 1,75 | 2,55 | 2,83 | 3,88 | 3,05 | 2,69 | 3,47 | 1,96 | 2,22 | 1,38 | 2,05 | 1,61 | 2,43 | 2,19 | 1,69 | 2,03 | 3,72 | 1,89 | 1,00 | 1,80 | 2,10 | 1,33 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_127779 | LinJ.34.0370 | eukaryotic translation initiation factor 5, putative | 1 | 1,11 | 3,00 | 1,93 | 2,35 | 2,68 | 2,01 | 2,30 | 1,82 | 1,96 | 2,28 | 2,48 | 2,00 | 1,39 | 1,64 | 1,71 | 1,49 | 2,59 | 1,55 | 1,69 | 1,25 | 0,82 | 2,11 | 0,86 | 1,45 | 1,20 | 1,93 | 1,33 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_148174 | LinJ.35.2600 | cytochrome P450 reductase, putative | 1 | 1,85 | 2,95 | 3,81 | 1,93 | 2,02 | 2,04 | 1,93 | 3,85 | 3,08 | 2,99 | 3,04 | 2,86 | 1,97 | 2,35 | 1,97 | 1,70 | 2,17 | 1,84 | 2,21 | 1,65 | 2,08 | 2,53 | 2,20 | 2,15 | 1,31 | 1,79 | 1,33 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_128727 | LinJ.35.3610 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,85 | 3,24 | 3,03 | 2,17 | 1,85 | 2,21 | 2,87 | 3,71 | 3,26 | 4,31 | 3,19 | 2,63 | 1,97 | 1,73 | 1,29 | 2,56 | 2,07 | 1,96 | 2,45 | 2,72 | 1,89 | 1,96 | 1,03 | 2,48 | 1,70 | 2,34 | 1,33 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_148753 | LinJ.26.2470 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,64 | 2,26 | 1,61 | 2,73 | 2,25 | 1,33 | 2,10 | 3,30 | 2,95 | 1,56 | 1,46 | 2,69 | 3,47 | 2,37 | 1,26 | 1,75 | 2,49 | 2,00 | 1,19 | 0,86 | 2,02 | 1,39 | 4,78 | 2,28 | 0,85 | 0,77 | 1,34 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_150054 | LinJ.35.5380 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,37 | 3,95 | 2,15 | 1,85 | 1,67 | 2,48 | 2,28 | 2,54 | 3,42 | 2,97 | 2,94 | 3,02 | 1,67 | 2,43 | 1,78 | 2,36 | 1,48 | 1,39 | 2,18 | 1,35 | 1,26 | 3,58 | 1,62 | 1,66 | 2,17 | 1,47 | 1,34 | 0,015 | 0,015 |
| OG5_130150 | LinJ.33.2350 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,27 | 3,63 | 3,56 | 2,18 | 2,67 | 2,78 | 2,48 | 2,48 | 2,90 | 2,16 | 3,67 | 2,22 | 2,21 | 2,52 | 2,06 | 1,60 | 1,90 | 1,66 | 2,50 | 3,04 | 1,81 | 2,20 | 1,76 | 2,26 | 2,16 | 1,85 | 1,34 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_151850 | LinJ.35.5050 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,20 | 4,52 | 1,88 | 1,55 | 2,98 | 1,35 | 1,71 | 2,71 | 3,92 | 2,85 | 2,63 | 2,03 | 2,74 | 2,01 | 1,55 | 1,34 | 1,78 | 1,55 | 1,43 | 1,89 | 1,96 | 3,89 | 1,13 | 1,62 | 2,08 | 1,52 | 1,34 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_126852 | LinJ.35.0400 LinJ.35.0410 | 40S ribosomal protein S3A, putative | 2 | 4,03 | 9,91 | 7,59 | 5,52 | 4,17 | 5,25 | 3,73 | 6,88 | 4,96 | 4,72 | 5,09 | 6,68 | 3,98 | 3,87 | 2,97 | 3,52 | 4,65 | 3,75 | 3,87 | 3,82 | 3,75 | 8,69 | 3,63 | 3,40 | 3,01 | 3,68 | 1,34 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_183415 | LinJ.16.1540 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,96 | 3,73 | 1,88 | 4,39 | 2,73 | 2,36 | 2,29 | 2,70 | 2,46 | 1,54 | 1,67 | 2,59 | 2,14 | 1,94 | 2,67 | 2,14 | 1,31 | 1,10 | 1,43 | 1,50 | 1,40 | 1,35 | 2,36 | 2,11 | 2,52 | 2,05 | 1,34 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_152953 | LinJ.35.2160 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 3,09 | 3,91 | 4,92 | 2,70 | 2,31 | 0,76 | 2,43 | 2,87 | 3,99 | 5,01 | 2,07 | 3,88 | 2,27 | 2,52 | 2,42 | 0,94 | 2,01 | 1,47 | 2,23 | 2,20 | 2,89 | 4,82 | 1,07 | 1,81 | 3,20 | 2,16 | 1,35 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_149039 | LinJ.35.5310 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,80 | 3,67 | 1,71 | 2,18 | 2,10 | 1,20 | 1,23 | 2,80 | 1,76 | 2,55 | 3,11 | 3,18 | 2,42 | 1,78 | 1,06 | 1,13 | 1,60 | 1,78 | 1,70 | 1,67 | 1,58 | 2,99 | 1,75 | 2,03 | 1,79 | 0,96 | 1,35 | 0,018 | 0,015 |
| OG5_127556 | LinJ.35.0640 | beta-fructofuranosidase-like protein | 1 | 1,71 | 3,21 | 2,50 | 1,68 | 2,34 | 2,08 | 1,28 | 3,69 | 2,82 | 3,54 | 3,65 | 3,17 | 1,66 | 1,89 | 1,76 | 1,54 | 2,00 | 1,22 | 1,17 | 2,61 | 1,01 | 3,35 | 1,54 | 2,32 | 2,43 | 1,49 | 1,35 | 0,042 | 0,039 |
| OG5_126846 | LinJ.36.5320 | protein kinase ck2 regulatory subunit, putative | 1 | 3,39 | 2,54 | 2,56 | 2,12 | 2,71 | 1,89 | 1,41 | 2,29 | 1,33 | 2,39 | 1,43 | 2,35 | 1,97 | 1,85 | 2,14 | 1,40 | 3,60 | 1,17 | 1,03 | 0,77 | 1,37 | 0,74 | 2,97 | 1,59 | 1,52 | 0,91 | 1,35 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_149068 | LinJ.36.1360 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,69 | 3,14 | 3,55 | 2,59 | 2,67 | 0,89 | 3,17 | 0,63 | 2,92 | 2,20 | 2,16 | 3,68 | 2,78 | 2,63 | 1,46 | 2,12 | 1,66 | 2,13 | 1,02 | 2,23 | 2,02 | 1,20 | 2,03 | 1,67 | 1,24 | 3,87 | 1,35 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_126621 | LinJ.35.2190 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,40 | 3,30 | 3,21 | 2,22 | 1,22 | 1,58 | 1,89 | 2,48 | 2,61 | 3,14 | 2,95 | 3,61 | 2,55 | 2,17 | 1,96 | 1,50 | 2,09 | 2,07 | 1,63 | 2,08 | 1,74 | 3,32 | 1,84 | 0,93 | 1,12 | 2,08 | 1,35 | 0,011 | 0,011 |
| OG5_151824 | LinJ.35.2680 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,31 | 2,65 | 3,65 | 2,67 | 2,32 | 1,91 | 2,98 | 3,40 | 3,01 | 3,34 | 2,99 | 3,73 | 2,14 | 2,17 | 1,64 | 1,93 | 2,21 | 1,40 | 2,19 | 2,49 | 2,60 | 2,71 | 2,34 | 1,69 | 2,14 | 1,48 | 1,36 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_128977 | LinJ.35.1270 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,25 | 2,80 | 3,58 | 2,31 | 2,50 | 2,47 | 3,37 | 5,29 | 4,08 | 4,00 | 4,51 | 2,59 | 1,74 | 2,67 | 1,75 | 2,42 | 2,29 | 1,17 | 2,50 | 1,67 | 3,23 | 3,29 | 4,22 | 1,76 | 1,55 | 2,08 | 1,36 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_127078 | LinJ.29.0980 | hypothetical protein, conserved | 1 | 4,43 | 2,36 | 0,65 | 1,89 | 2,79 | 2,06 | 1,84 | 2,65 | 3,03 | 0,00 | 2,26 | 1,86 | 2,96 | 3,07 | 1,96 | 0,64 | 1,74 | 2,25 | 1,74 | 2,67 | 0,55 | 2,01 | 1,42 | 2,42 | 1,03 | 1,71 | 1,36 | 0,046 | 0,046 |
| OG5_127563 | LinJ.13.1180 | XPA-interacting protein, putative | 1 | 3,35 | 3,74 | 2,06 | 2,23 | 2,22 | 2,06 | 2,15 | 1,67 | 3,00 | 2,04 | 2,73 | 1,57 | 1,88 | 2,83 | 1,74 | 2,88 | 1,49 | 0,91 | 2,15 | 1,52 | 1,49 | 1,45 | 1,23 | 3,26 | 1,29 | 1,77 | 1,36 | 0,009 | 0,008 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d |
|----------------|--------------|---|----------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------|------------------|----------------------|----------------------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | PI-11 A | PI-12 A | | | | | |
| OG5_128010 | LinJ.16.0300 | proteasome 26S non-ATPase subunit 9, putative | 1 | 2,23 | 3,08 | 1,41 | 2,32 | 2,18 | 1,04 | 1,55 | 3,13 | 1,19 | 2,25 | 3,16 | 1,37 | 1,35 | 2,10 | 1,84 | 1,98 | 1,04 | 0,95 | 2,12 | 0,90 | 2,07 | 1,96 | 0,64 | 0,88 | 2,53 | 0,96 | 1,36 | 0,031 | 0,031 | | |
| OG5_161464 | LinJ.33.1950 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,68 | 2,07 | 2,61 | 1,70 | 2,18 | 2,12 | 2,81 | 0,59 | 3,72 | 3,21 | 2,98 | 2,09 | 2,15 | 2,63 | 0,78 | 1,85 | 2,07 | 1,82 | 1,92 | 2,24 | 1,79 | 2,10 | 1,28 | 2,95 | 0,56 | 1,74 | 1,36 | 0,013 | 0,013 | | |
| OG5_131030 | LinJ.35.2060 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,95 | 3,23 | 2,69 | 2,20 | 2,15 | 2,13 | 2,48 | 3,40 | 3,88 | 3,06 | 3,91 | 3,32 | 2,31 | 1,58 | 1,67 | 1,92 | 2,01 | 2,17 | 2,21 | 1,49 | 2,10 | 2,63 | 2,15 | 2,05 | 1,77 | 1,92 | 1,36 | 0,005 | 0,004 | | |
| OG5_135786 | LinJ.35.2310 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,64 | 3,76 | 3,52 | 2,01 | 2,75 | 2,35 | 1,98 | 3,27 | 3,01 | 2,57 | 2,00 | 4,01 | 2,81 | 1,73 | 2,00 | 2,15 | 2,06 | 1,20 | 1,83 | 1,91 | 1,52 | 2,90 | 2,27 | 2,23 | 1,97 | 1,51 | 1,36 | 0,020 | 0,020 | | |
| OG5_166738 | LinJ.26.1940 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,86 | 3,63 | 2,31 | 2,25 | 2,61 | 2,83 | 1,66 | 2,12 | 4,09 | 3,00 | 1,57 | 3,36 | 1,64 | 2,41 | 1,34 | 1,64 | 2,42 | 2,25 | 1,25 | 2,15 | 0,80 | 2,78 | 2,86 | 1,92 | 1,58 | 1,24 | 1,36 | 0,045 | 0,042 | | |
| OG5_127017 | LinJ.33.0410 | serine peptidase, putative, serine peptidase, Clan SC, Family S9D | 1 | 2,77 | 3,04 | 3,27 | 1,69 | 2,73 | 2,39 | 1,90 | 2,09 | 2,88 | 2,20 | 3,80 | 2,07 | 2,48 | 2,18 | 1,56 | 2,02 | 1,27 | 2,16 | 1,78 | 2,23 | 2,34 | 2,55 | 1,08 | 2,06 | 2,04 | 1,21 | 1,36 | 0,005 | 0,005 | | |
| OG5_144833 | LinJ.33.1460 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,87 | 2,87 | 3,72 | 1,33 | 3,63 | 2,34 | 2,20 | 2,21 | 2,51 | 2,42 | 2,63 | 1,51 | 3,04 | 2,55 | 1,67 | 1,70 | 2,16 | 1,86 | 1,35 | 1,77 | 1,47 | 2,75 | 1,48 | 3,12 | 1,73 | 1,44 | 1,36 | 0,015 | 0,015 | | |
| OG5_148979 | LinJ.35.0880 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,03 | 4,17 | 3,23 | 3,93 | 3,01 | 1,63 | 2,71 | 3,62 | 3,41 | 4,24 | 3,54 | 3,81 | 2,86 | 1,35 | 1,10 | 2,40 | 2,43 | 2,02 | 3,49 | 2,93 | 2,26 | 1,97 | 2,15 | 2,31 | 1,72 | 2,61 | 1,36 | 0,015 | 0,015 | | |
| OG5_158001 | LinJ.33.2780 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,07 | 2,95 | 3,56 | 1,49 | 3,44 | 1,88 | 2,25 | 2,99 | 4,96 | 2,07 | 2,11 | 1,83 | 2,66 | 1,91 | 1,56 | 1,09 | 2,01 | 1,54 | 2,17 | 2,85 | 1,35 | 1,85 | 1,91 | 3,08 | 1,41 | 1,90 | 1,37 | 0,027 | 0,027 | | |
| OG5_146363 | LinJ.35.3310 | Peroxin 19 | 1 | 1,92 | 2,90 | 3,16 | 2,06 | 3,02 | 2,73 | 1,13 | 4,68 | 3,01 | 3,21 | 4,14 | 3,50 | 2,07 | 1,56 | 2,00 | 4,62 | 1,53 | 2,08 | 1,54 | 1,82 | 1,64 | 3,00 | 1,24 | 1,62 | 2,60 | 0,86 | 1,37 | 0,031 | 0,031 | | |
| OG5_128306 | LinJ.33.0140 | trans-splicing factor, putative | 1 | 2,72 | 2,49 | 2,67 | 2,73 | 3,21 | 1,80 | 1,26 | 2,15 | 2,82 | 2,14 | 3,98 | 2,85 | 1,51 | 1,59 | 2,04 | 1,05 | 1,56 | 0,99 | 1,37 | 2,13 | 1,86 | 2,40 | 2,68 | 2,59 | 1,62 | 0,96 | 1,37 | 0,020 | 0,020 | | |
| OG5_148334 | LinJ.10.0100 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,03 | 2,09 | 2,31 | 1,39 | 1,91 | 1,70 | 1,73 | 2,32 | 1,81 | 1,27 | 2,17 | 1,79 | 3,32 | 1,79 | 1,12 | 2,11 | 1,25 | 2,00 | 2,11 | 1,19 | 1,00 | 0,93 | 0,88 | 1,32 | 1,78 | 1,61 | 1,37 | 0,011 | 0,011 | | |
| OG5_144603 | LinJ.13.0490 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,80 | 4,98 | 1,04 | 2,86 | 2,90 | 2,38 | 1,66 | 2,23 | 2,53 | 2,46 | 3,88 | 2,31 | 3,35 | 1,99 | 1,57 | 1,33 | 1,46 | 1,30 | 1,63 | 2,58 | 1,80 | 2,51 | 1,27 | 3,16 | 2,23 | 1,19 | 1,37 | 0,046 | 0,046 | | |
| OG5_141726 | LinJ.35.2570 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,28 | 2,66 | 3,91 | 1,33 | 2,43 | 2,15 | 2,54 | 4,55 | 2,77 | 3,22 | 1,80 | 4,11 | 2,00 | 1,35 | 2,02 | 1,94 | 1,82 | 1,64 | 1,96 | 1,93 | 1,55 | 2,91 | 1,27 | 2,74 | 2,22 | 1,19 | 1,37 | 0,041 | 0,041 | | |
| OG5_159956 | LinJ.36.2030 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,97 | 2,00 | 2,77 | 2,81 | 2,18 | 3,36 | 2,45 | 2,04 | 2,55 | 1,67 | 1,75 | 1,08 | 1,60 | 2,99 | 1,71 | 1,98 | 1,84 | 1,66 | 0,66 | 1,02 | 1,30 | 2,18 | 1,58 | 1,66 | 1,22 | 2,04 | 1,37 | 0,033 | 0,030 | | |
| OG5_149011 | LinJ.35.3200 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,05 | 2,23 | 3,54 | 1,54 | 2,24 | 2,23 | 1,45 | 2,90 | 4,22 | 3,06 | 2,89 | 2,19 | 3,05 | 1,73 | 2,62 | 1,61 | 1,83 | 1,95 | 1,68 | 1,58 | 1,45 | 2,73 | 1,77 | 1,56 | 1,19 | 2,05 | 1,38 | 0,017 | 0,014 | | |
| OG5_139192 | LinJ.35.0790 | rRNA dimethyltransferase, putative | 1 | 1,99 | 3,39 | 3,69 | 2,59 | 1,88 | 2,46 | 2,06 | 3,96 | 3,85 | 4,03 | 2,85 | 2,76 | 1,97 | 2,86 | 1,87 | 2,51 | 2,21 | 2,14 | 1,55 | 1,95 | 2,09 | 2,54 | 2,62 | 1,31 | 2,21 | 2,08 | 1,38 | 0,015 | 0,015 | | |
| OG5_154621 | LinJ.29.1300 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,20 | 2,23 | 1,53 | 2,43 | 1,39 | 2,10 | 1,41 | 2,34 | 2,20 | 3,27 | 1,60 | 1,47 | 2,16 | 1,62 | 1,56 | 1,75 | 1,15 | 1,36 | 1,05 | 1,52 | 1,21 | 1,17 | 1,75 | 1,16 | 2,00 | 2,28 | 1,38 | 0,011 | 0,011 | | |
| OG5_179752 | LinJ.34.1510 | d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein | 1 | 1,74 | 3,04 | 2,56 | 4,76 | 2,84 | 4,14 | 5,28 | 5,27 | 4,01 | 5,22 | 5,78 | 3,46 | 4,60 | 3,08 | 3,73 | 2,45 | 1,14 | 3,52 | 4,38 | 2,65 | 2,11 | 3,13 | 4,36 | 3,17 | 1,27 | 2,65 | 1,38 | 0,041 | 0,041 | | |
| OG5_183757 | LinJ.28.0230 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 1,96 | 1,53 | 1,89 | 1,45 | 2,34 | 1,56 | 1,57 | 2,31 | 2,94 | 2,30 | 1,48 | 1,95 | 3,19 | 2,18 | 1,76 | 1,31 | 1,98 | 1,61 | 1,57 | 1,25 | 1,48 | 2,24 | 0,91 | 1,57 | 0,54 | 1,45 | 1,39 | 0,018 | 0,015 | | |
| OG5_132180 | LinJ.35.2560 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,54 | 2,77 | 3,14 | 1,95 | 2,78 | 2,93 | 2,40 | 3,46 | 2,79 | 2,86 | 3,85 | 2,71 | 2,24 | 2,97 | 1,47 | 2,29 | 2,32 | 2,43 | 2,40 | 1,32 | 1,82 | 3,27 | 2,17 | 0,86 | 1,42 | 1,88 | 1,39 | 0,004 | 0,005 | | |
| OG5_157985 | LinJ.32.1230 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,50 | 2,94 | 2,80 | 1,36 | 1,24 | 2,31 | 2,25 | 2,47 | 3,51 | 2,13 | 1,90 | 2,01 | 1,55 | 1,57 | 1,56 | 0,75 | 2,09 | 2,06 | 1,17 | 1,46 | 1,94 | 0,71 | 2,29 | 1,46 | 2,06 | 1,23 | 1,39 | 0,019 | 0,017 | | |
| OG5_128359 | LinJ.35.4780 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,46 | 2,52 | 3,34 | 1,80 | 1,82 | 1,78 | 1,65 | 2,88 | 3,04 | 3,45 | 3,42 | 3,20 | 2,09 | 2,02 | 1,75 | 1,72 | 2,02 | 1,63 | 1,52 | 1,79 | 1,95 | 2,15 | 1,61 | 1,99 | 1,60 | 2,06 | 1,39 | 0,004 | 0,003 | | |
| OG5_126792 | LinJ.33.1730 | cyclophilin 4, putative (CYP4) | 1 | 3,24 | 3,24 | 4,16 | 1,83 | 2,04 | 3,15 | 3,24 | 1,37 | 3,22 | 1,64 | 2,01 | 3,61 | 2,89 | 2,79 | 1,71 | 1,72 | 1,14 | 1,73 | 1,57 | 3,59 | 0,56 | 3,10 | 2,10 | 2,44 | 1,56 | 2,35 | 1,40 | 0,031 | 0,031 | | |
| OG5_149024 | LinJ.35.4410 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,38 | 4,48 | 2,92 | 2,23 | 2,43 | 2,31 | 1,60 | 2,15 | 3,43 | 3,46 | 3,41 | 4,57 | 2,27 | 2,36 | 2,43 | 1,66 | 1,44 | 2,25 | 1,36 | 1,59 | 2,05 | 2,91 | 2,00 | 2,41 | 1,97 | 1,69 | 1,41 | 0,020 | 0,020 | | |
| OG5_148994 | LinJ.35.2350 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,88 | 2,99 | 2,55 | 2,24 | 2,52 | 2,26 | 1,68 | 3,66 | 4,07 | 2,53 | 2,53 | 4,94 | 2,79 | 1,74 | 1,28 | 1,91 | 1,91 | 2,08 | 2,08 | 1,69 | 2,14 | 2,26 | 2,62 | 2,19 | 2,38 | 0,83 | 1,41 | 0,015 | 0,015 | | |
| OG5_147236 | LinJ.04.1090 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,88 | 1,32 | 1,13 | 0,72 | 0,63 | 1,11 | 0,72 | 0,58 | 0,96 | 1,12 | 0,85 | 0,66 | 0,87 | 0,71 | 0,65 | 0,35 | 0,62 | 0,86 | 0,70 | 0,64 | 0,73 | 0,33 | 0,49 | 0,41 | 0,78 | 0,88 | 1,41 | 0,013 | 0,010 | | |
| OG5_175320 | LinJ.27.1270 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,02 | 2,67 | 1,57 | 1,38 | 2,46 | 2,87 | 1,57 | 2,41 | 2,73 | 2,95 | 2,85 | 2,61 | 2,96 | 2,54 | 1,84 | 1,76 | 2,04 | 1,09 | 1,82 | 1,46 | 1,36 | 2,22 | 1,20 | 1,51 | 1,69 | 2,32 | 1,42 | 0,002 | 0,002 | | |
| OG5_149015 | LinJ.35.3540 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,87 | 3,17 | 3,03 | 1,43 | 2,35 | 2,00 | 1,81 | 3,42 | 2,59 | 3,86 | 3,57 | 3,14 | 2,11 | 2,00 | 1,57 | 1,44 | 1,32 | 1,26 | 2,02 | 2,31 | 1,50 | 3,22 | 1,50 | 1,95 | 1,75 | 1,97 | 1,43 | 0,008 | 0,008 | | |
| OG5_134814 | LinJ.35.1470 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,15 | 3,08 | 3,34 | 3,27 | 2,76 | 0,88 | 1,59 | 2,11 | 3,51 | 1,63 | 2,37 | 4,87 | 1,43 | 1,75 | 1,60 | 2,68 | 1,34 | 0,61 | 1,46 | 2,09 | 1,10 | 3,98 | 1,72 | 1,21 | 1,81 | 1,21 | 1,43 | 0,041 | 0,041 | | |
| OG5_135180 | LinJ.35.5130 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,97 | 3,60 | 3,18 | 1,73 | 2,31 | 1,89 | 2,69 | 2,69 | 4,06 | 2,97 | 3,62 | 3,50 | 2,34 | 3,14 | 1,86 | 1,06 | 2,85 | 1,05 | 1,24 | 1,68 | 1,10 | 4,02 | 2,73 | 1,22 | 1,57 | 2,79 | 1,43 | 0,036 | 0,036 | | |
| OG5_142633 | LinJ.31.2350 | ADP-ribosylation factor, putative | 1 | 5,72 | 6,56 | 0,00 | 7,89 | 6,07 | 4,42 | 5,78 | 3,32 | 2,18 | 4,31 | 6,02 | 6,90 | 4,80 | 3,58 | 5,12 | 2,90 | 4,82 | 2,20 | 3,72 | 3,23 | 3,49 | 4,09 | 1,47 | 0,00 | 6,01 | 3,32 | 1,43 | 0,040 | 0,036 | | |
| OG5_148966 | LinJ.33.3280 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,91 | 3,32 | 2,86 | 1,92 | 3,06 | 1,47 | 3,27 | 1,34 | 3,29 | 1,90 | 2,02 | 1,37 | 1,04 | 1,74 | 1,02 | 2,85 | 1,48 | 1,74 | 2,02 | 2,05 | 1,55 | 1,79 | 0,83 | 0,82 | 1,65 | 1,01 | 1,44 | 0,046 | 0,046 | | |
| OG5_146876 | LinJ.35.1690 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,65 | 2,78 | 4,64 | 2,30 | 2,21 | 2,42 | 1,21 | 4,02 | 4,64 | 3,35 | 3,74 | 3,59 | 1,57 | 2,15 | 1,78 | 1,59 | 2,84 | 2,65 | 1,76 | 1,45 | 1,91 | 1,90 | 2,13 | 2,31 | 1,50 | 2,16 | 1,44 | 0,042 | 0,040 | | |
| OG5_151705 | LinJ.27.0350 | MP44, putative | 1 | 2,49 | 1,88 | 1,42 | 1,84 | 2,17 | 1,50 | 0,99 | 2,10 | 2,23 | 2,45 | 1,69 | 1,30 | 1,25 | 2,15 | 0,70 | 1,08 | 1,53 | 1,41 | 1,81 | 1,15 | 0,96 | 1,71 | 0,34 | 1,68 | 1,74 | 0,97 | 1,45 | 0,008 | 0,008 | | |
| OG5_128421 | LinJ.35.4660 | phosphatidylserine decarboxylase, putative | 1 | 2,17 | 4,25 | 2,40 | 1,98 | 1,76 | 1,28 | 3,47 | 4,56 | 2,64 | 3,91 | 2,12 | 2,88 | 2,00 | 1,73 | 2,31 | 1,25 | 1,83 | 1,88 | 2,00 | 1,73 | 2,22 | 1,69 | 1,13 | 1,82 | 2,01 | 2,03 | 1,46 | 0,027 | 0,027 | | |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | | | | |
|----------------|------------------------------|--|----------------|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------------|----------------------|----------------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | | | | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | PI-11 A | PI-12 A |
| OG5_126906 | LinJ.11.0040 | ATP-binding cassette protein subfamily H, member 1, putative (ABCH1) | 1 | 2,79 | 2,42 | 2,11 | 3,04 | 2,40 | 2,83 | 2,95 | 2,68 | 3,23 | 3,06 | 3,27 | 1,72 | 1,42 | 2,28 | 1,64 | 1,53 | 1,40 | 2,06 | 2,02 | 2,00 | 1,74 | 1,83 | 0,70 | 2,89 | 1,88 | 1,64 | 1,46 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_149000 | LinJ.35.2660 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,91 | 1,98 | 3,43 | 2,25 | 3,07 | 2,58 | 1,77 | 3,30 | 4,32 | 3,67 | 2,27 | 2,27 | 1,62 | 1,60 | 1,33 | 2,15 | 2,42 | 1,46 | 2,16 | 1,51 | 2,16 | 1,76 | 2,22 | 1,98 | 2,11 | 1,46 | 0,006 | 0,006 | |
| OG5_126834 | LinJ.35.4950 | RAD51/dmc1 protein (DMC1) | 1 | 2,77 | 2,96 | 2,34 | 1,85 | 2,76 | 2,68 | 1,18 | 2,39 | 4,08 | 4,50 | 4,93 | 2,89 | 1,37 | 2,66 | 2,62 | 1,52 | 2,95 | 1,23 | 1,84 | 2,00 | 2,62 | 1,66 | 2,07 | 0,74 | 1,86 | 2,04 | 1,46 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_170014 | LinJ.35.0990 | aldose 1-epimerase, putative | 1 | 1,46 | 2,79 | 2,19 | 2,66 | 1,38 | 2,57 | 2,19 | 3,57 | 2,57 | 4,54 | 5,19 | 4,53 | 1,50 | 2,53 | 1,77 | 3,27 | 1,34 | 1,73 | 1,92 | 1,47 | 2,16 | 2,82 | 1,56 | 1,93 | 1,35 | 1,99 | 1,46 | 0,036 | 0,036 |
| OG5_151830 | LinJ.35.3790 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,85 | 3,63 | 2,83 | 2,61 | 2,79 | 1,84 | 1,95 | 3,33 | 2,67 | 2,82 | 4,20 | 4,43 | 2,03 | 3,26 | 1,32 | 1,19 | 1,80 | 1,84 | 2,41 | 1,87 | 1,66 | 3,56 | 1,78 | 1,80 | 1,72 | 2,66 | 1,46 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_149014 | LinJ.35.3460 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,10 | 2,94 | 3,11 | 2,66 | 2,62 | 1,54 | 2,29 | 3,56 | 4,11 | 3,40 | 3,66 | 2,50 | 1,54 | 2,23 | 2,38 | 1,87 | 1,79 | 1,51 | 2,16 | 1,69 | 1,66 | 2,51 | 1,43 | 1,20 | 2,14 | 2,11 | 1,46 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_127616 | LinJ.18.0890 | rab7 GTP binding protein, putative (RAB7) | 1 | 1,78 | 3,17 | 2,05 | 3,58 | 2,48 | 1,74 | 0,85 | 3,67 | 3,72 | 2,44 | 1,81 | 3,51 | 4,14 | 2,72 | 1,68 | 1,10 | 0,54 | 3,44 | 1,87 | 2,19 | 2,95 | 1,82 | 1,24 | 2,12 | 0,88 | 2,24 | 1,46 | 0,041 | 0,041 |
| OG5_126907 | LinJ.35.3340 LinJ.35.3330 | 60S ribosomal subunit protein L31, putative | 2 | 5,45 | 4,31 | 2,75 | 7,51 | 3,88 | 4,37 | 3,68 | 3,16 | 3,61 | 9,62 | 11,65 | 5,83 | 5,71 | 3,63 | 1,84 | 2,02 | 6,49 | 3,36 | 3,45 | 4,97 | 1,62 | 6,44 | 3,23 | 2,82 | 2,72 | 4,79 | 1,47 | 0,046 | 0,047 |
| OG5_128689 | LinJ.30.1130 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,51 | 3,30 | 4,06 | 1,10 | 3,42 | 1,98 | 2,48 | 1,24 | 1,56 | 3,38 | 3,66 | 3,47 | 2,50 | 3,24 | 1,14 | 2,40 | 0,92 | 1,73 | 2,28 | 2,03 | 1,69 | 1,14 | 2,10 | 1,31 | 2,36 | 2,31 | 1,48 | 0,031 | 0,031 |
| OG5_144877 | LinJ.10.1230 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,43 | 2,18 | 2,05 | 2,24 | 3,30 | 1,74 | 1,55 | 2,56 | 2,48 | 3,57 | 3,89 | 2,99 | 1,91 | 2,73 | 2,46 | 1,60 | 1,90 | 0,96 | 1,16 | 1,92 | 1,48 | 2,48 | 2,19 | 1,91 | 1,57 | 1,04 | 1,48 | 0,004 | 0,004 |
| OG5_129047 | LinJ.27.0210 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,36 | 2,00 | 0,82 | 3,30 | 1,96 | 0,62 | 2,30 | 1,56 | 1,63 | 2,65 | 2,43 | 3,77 | 3,49 | 1,93 | 1,59 | 2,87 | 0,94 | 1,29 | 1,27 | 1,32 | 1,63 | 0,66 | 1,44 | 1,84 | 1,35 | 0,98 | 1,49 | 0,023 | 0,023 |
| OG5_144859 | LinJ.33.1890 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,50 | 1,75 | 3,38 | 2,23 | 4,40 | 3,75 | 1,75 | 2,67 | 3,46 | 2,07 | 0,43 | 1,79 | 2,49 | 0,99 | 1,06 | 0,93 | 2,09 | 1,32 | 1,45 | 0,97 | 3,03 | 2,13 | 1,63 | 1,67 | 1,40 | 2,26 | 1,49 | 0,033 | 0,030 |
| OG5_128075 | LinJ.35.1240 | short chain dehydrogenase, putative | 1 | 2,58 | 3,74 | 4,06 | 1,95 | 2,31 | 2,65 | 2,52 | 3,28 | 2,93 | 1,31 | 2,34 | 4,32 | 2,56 | 1,07 | 1,11 | 1,45 | 1,70 | 1,65 | 1,28 | 1,76 | 1,50 | 2,25 | 2,02 | 2,11 | 3,61 | 1,08 | 1,50 | 0,008 | 0,008 |
| OG5_138554 | LinJ.35.1570 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,33 | 2,41 | 1,87 | 2,02 | 1,65 | 1,82 | 0,99 | 2,25 | 1,58 | 2,29 | 1,41 | 3,14 | 1,83 | 1,05 | 1,57 | 0,80 | 1,20 | 1,08 | 0,71 | 1,29 | 1,41 | 2,02 | 1,35 | 1,24 | 1,08 | 0,82 | 1,51 | 0,004 | 0,005 |
| OG5_154668 | LinJ.32.1720 | chromosomal passenger protein, putative (CPC2) | 1 | 0,00 | 2,17 | 1,17 | 2,53 | 1,99 | 3,11 | 2,48 | 1,89 | 3,26 | 1,46 | 2,42 | 3,32 | 2,23 | 2,65 | 2,94 | 0,55 | 2,14 | 1,55 | 1,53 | 1,94 | 0,49 | 1,31 | 1,24 | 1,59 | 0,91 | 1,18 | 1,52 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_148549 | LinJ.34.3650 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,96 | 2,30 | 2,93 | 1,09 | 2,22 | 2,25 | 0,53 | 3,24 | 1,23 | 3,52 | 2,82 | 4,00 | 1,85 | 1,78 | 1,10 | 1,64 | 0,70 | 2,69 | 2,40 | 1,44 | 1,55 | 1,16 | 1,16 | 2,22 | 0,88 | 1,54 | 1,52 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_145924 | LinJ.17.1440 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,18 | 1,69 | 3,55 | 1,66 | 2,30 | 3,22 | 2,83 | 3,21 | 3,67 | 3,25 | 3,38 | 1,39 | 2,18 | 1,83 | 1,29 | 2,47 | 0,84 | 1,18 | 0,60 | 1,41 | 3,00 | 3,38 | 0,48 | 1,57 | 2,43 | 2,44 | 1,52 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_150045 | LinJ.34.1750 | pyroglutamyl-peptidase I (PGP), putative | 1 | 1,24 | 3,05 | 0,93 | 2,10 | 2,16 | 1,88 | 1,59 | 1,99 | 2,10 | 2,00 | 4,18 | 3,75 | 2,24 | 1,54 | 1,64 | 1,36 | 0,30 | 1,14 | 1,42 | 1,45 | 1,05 | 2,46 | 1,31 | 2,12 | 1,50 | 1,56 | 1,52 | 0,022 | 0,019 |
| OG5_130243 | LinJ.31.2320 LinJ.31.2400 | 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative | 2 | 7,83 | 8,85 | 5,60 | 3,19 | 7,11 | 4,24 | 8,21 | 3,01 | 7,16 | 9,30 | 6,96 | 3,84 | 7,38 | 8,51 | 3,77 | 2,65 | 3,32 | 3,47 | 4,41 | 3,95 | 5,40 | 4,48 | 2,96 | 4,87 | 2,80 | 9,10 | 1,53 | 0,017 | 0,017 |
| OG5_128074 | LinJ.35.3370 | transport protein particle (TRAPP) subunit, putative | 1 | 2,55 | 2,14 | 2,32 | 1,53 | 0,00 | 3,57 | 2,11 | 4,76 | 4,73 | 2,46 | 3,25 | 3,95 | 1,93 | 1,30 | 2,08 | 0,00 | 0,70 | 0,49 | 1,94 | 2,42 | 1,71 | 4,07 | 1,52 | 1,43 | 2,03 | 1,87 | 1,55 | 0,040 | 0,036 |
| OG5_148031 | LinJ.04.0250 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,31 | 1,42 | 2,11 | 2,97 | 2,54 | 2,58 | 2,92 | 1,04 | 2,14 | 4,47 | 1,07 | 3,04 | 2,24 | 3,09 | 0,70 | 0,89 | 1,74 | 1,16 | 2,45 | 1,81 | 1,55 | 1,02 | 1,23 | 1,95 | 2,16 | 2,11 | 1,55 | 0,006 | 0,006 |
| OG5_127834 | LinJ.06.0140 | proteasome beta 6 subunit, putative, 20S proteasome beta 6 subunit, putative | 1 | 3,35 | 2,59 | 1,94 | 4,49 | 2,38 | 2,40 | 1,71 | 1,61 | 4,43 | 1,59 | 2,13 | 2,03 | 2,60 | 3,05 | 2,06 | 2,21 | 1,53 | 1,65 | 2,35 | 0,62 | 3,40 | 2,26 | 0,42 | 2,02 | 0,94 | 0,54 | 1,55 | 0,027 | 0,027 |
| OG5_148375 | LinJ.13.0400 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,64 | 4,49 | 2,05 | 3,99 | 1,45 | 2,01 | 4,45 | 2,62 | 4,06 | 4,32 | 2,51 | 2,02 | 3,07 | 2,23 | 1,43 | 0,76 | 2,69 | 1,37 | 1,60 | 1,52 | 2,29 | 1,54 | 1,04 | 2,54 | 2,74 | 3,26 | 1,58 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_148611 | LinJ.21.1980 | mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative | 1 | 1,53 | 2,75 | 3,44 | 2,63 | 2,67 | 2,01 | 3,33 | 2,22 | 2,47 | 1,85 | 1,58 | 1,28 | 2,21 | 1,91 | 3,05 | 1,16 | 1,48 | 0,98 | 2,29 | 1,76 | 0,82 | 0,91 | 1,46 | 0,90 | 0,75 | 1,65 | 1,59 | 0,003 | 0,003 |
| OG5_157934 | LinJ.23.0140 | cyclophilin 3, putative (CyP3) | 1 | 3,52 | 4,09 | 3,46 | 3,75 | 3,73 | 0,00 | 2,14 | 2,43 | 5,81 | 4,15 | 3,27 | 4,63 | 1,98 | 5,43 | 2,69 | 1,10 | 3,24 | 1,50 | 0,71 | 4,46 | 2,49 | 2,34 | 1,13 | 2,99 | 0,67 | 2,63 | 1,60 | 0,020 | 0,020 |
| OG5_126801 | LinJ.13.1420 | pyroline-5-carboxylate reductase (P5CR) | 1 | 2,93 | 3,54 | 1,62 | 3,44 | 1,98 | 1,74 | 1,18 | 3,11 | 3,26 | 2,10 | 3,65 | 2,94 | 2,47 | 2,02 | 1,35 | 1,74 | 0,84 | 0,55 | 1,26 | 1,65 | 1,80 | 1,73 | 2,72 | 1,39 | 2,60 | 0,66 | 1,69 | 0,003 | 0,002 |
| OG5_149124 | LinJ.36.5930 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,42 | 0,87 | 2,97 | 2,46 | 2,07 | 2,28 | 3,20 | 1,95 | 2,80 | 3,19 | 0,52 | 1,00 | 2,41 | 0,00 | 0,36 | 0,91 | 1,82 | 1,73 | 1,59 | 1,19 | 0,84 | 1,11 | 0,00 | 0,85 | 1,90 | 2,00 | 1,69 | 0,018 | 0,015 |
| OG5_184208 | LinJ.35.5210 | hypothetical protein, unknown function | 1 | 2,43 | 2,49 | 4,06 | 2,58 | 2,19 | 1,92 | 2,12 | 3,67 | 3,02 | 2,93 | 3,59 | 5,49 | 1,87 | 2,43 | 1,17 | 1,19 | 2,25 | 2,33 | 1,93 | 1,06 | 2,53 | 1,89 | 1,70 | 1,15 | 0,94 | 2,08 | 1,73 | 0,001 | 0,001 |
| OG5_148308 | LinJ.08.1110 | MIX protein, putative (MIX) | 1 | 3,44 | 1,77 | 2,56 | 3,65 | 2,47 | 2,03 | 3,29 | 2,12 | 3,00 | 4,49 | 4,72 | 5,10 | 2,72 | 1,54 | 1,29 | 1,98 | 1,66 | 0,75 | 1,27 | 0,72 | 0,75 | 5,29 | 0,00 | 3,68 | 2,63 | 0,60 | 1,78 | 0,009 | 0,009 |
| OG5_144679 | LinJ.27.0990 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,92 | 1,15 | 1,88 | 1,35 | 1,64 | 0,50 | 1,83 | 1,99 | 2,54 | 2,63 | 2,50 | 1,36 | 4,24 | 1,19 | 0,45 | 0,59 | 0,29 | 0,00 | 1,25 | 1,01 | 2,63 | 2,39 | 0,64 | 0,57 | 0,97 | 1,62 | 1,84 | 0,013 | 0,013 |
| OG5_149096 | LinJ.36.3920 | hypothetical protein, conserved | 1 | 1,55 | 2,70 | 3,04 | 3,00 | 2,43 | 1,23 | 4,06 | 2,29 | 2,26 | 3,99 | 2,71 | 0,00 | 1,27 | 5,13 | 2,19 | 0,00 | 1,27 | 2,35 | 0,00 | 0,00 | 2,50 | 2,09 | 1,49 | 0,00 | 3,21 | 0,00 | 2,02 | 0,023 | 0,021 |
| OG5_148906 | LinJ.33.0080 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,71 | 4,77 | 1,70 | 3,01 | 0,00 | 1,29 | 1,80 | 2,54 | 6,37 | 2,50 | 1,54 | 2,41 | 0,00 | 2,61 | 1,15 | 1,60 | 1,39 | 0,00 | 1,07 | 0,00 | 0,00 | 1,23 | 4,15 | 1,72 | 1,12 | 0,91 | 2,05 | 0,016 | 0,015 |
| OG5_127916 | LinJ.17.0330 | histone H2A, putative | 1 | 0,00 | 1,46 | 4,63 | 3,16 | 1,28 | 2,42 | 0,00 | 1,19 | 1,16 | 4,59 | 1,39 | 1,45 | 2,54 | 2,82 | 1,08 | 0,00 | 1,97 | 1,19 | 2,02 | 0,00 | 1,26 | 0,00 | 0,00 | 1,52 | 1,09 | 0,87 | 2,19 | 0,032 | 0,029 |

| Grupo Ortólogo | Gene ID | Produto Gênico | R ^a | Dose gênica no grupo CURA | | | | | | | | | | | | Dose gênica no grupo RECIDIVA | | | | | | | | | | | | C/R ^b | p-valor ^c | Perm. p ^d | | | |
|----------------|--|--|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------|----------------------|----------------------|-------------|---------|-------|
| | | | | MA-01 A | MA-02 A | MA-03 A | MA-04 A | MA-05 A | MG-12 A | MG-14 A | MG-19 A | PI-04 A | PI-05 A | PI-07 A | PI-08 A | PI-09 A | PI-10 A | MA-07 A | MG-11 A | MG-13 A | MG-15 A | MG-16 A | MG-17 A | MG-18 A | PI-01 A | PI-02 A | PI-03 A | | | | PI-11 A | PI-12 A | |
| OG5_133169 | LinJ.34.3390 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,83 | 1,61 | 0,00 | 4,79 | 1,45 | 3,00 | 2,34 | 2,70 | 2,66 | 1,79 | 3,08 | 1,72 | 1,46 | 3,03 | 2,57 | 0,00 | 0,00 | 2,73 | 1,14 | 1,38 | 0,00 | 0,00 | 1,78 | 1,78 | 1,25 | 0,00 | 2,27 | 0,007 | 0,005 | |
| OG5_128012 | LinJ.29.1240 LinJ.29.1250 | tryparedoxin (TXN1), tryparedoxin (TXN2) | 2 | 0,00 | 7,18 | 0,00 | 2,57 | 3,20 | 3,79 | 2,43 | 3,80 | 10,39 | 12,11 | 8,56 | 4,13 | 9,44 | 3,20 | 0,00 | 4,33 | 1,49 | 0,00 | 2,50 | 14,69 | 0,00 | 2,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 2,36 | 0,019 | 0,018 | |
| OG5_126659 | LinJ.06.0590 LinJ.06.0600 | 60S ribosomal protein L23a, putative | 2 | 9,28 | 4,18 | 0,00 | 5,20 | 3,53 | 7,06 | 3,24 | 6,68 | 3,30 | 4,16 | 10,23 | 3,22 | 6,28 | 3,11 | 3,12 | 5,02 | 1,74 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,08 | 0,00 | 4,72 | 2,87 | 4,33 | 2,39 | 0,007 | 0,005 | |
| OG5_151895 | LinJ.36.6990 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,87 | 4,84 | 8,22 | 0,00 | 2,15 | 0,00 | 5,22 | 4,04 | 5,83 | 7,03 | 2,22 | 7,23 | 0,00 | 2,18 | 3,83 | 0,00 | 0,00 | 5,99 | 0,00 | 0,00 | 2,22 | 1,80 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,27 | 2,45 | 0,041 | 0,039 | |
| OG5_127723 | LinJ.21.1990 | calcineurin B subunit, putative | 1 | 1,63 | 3,10 | 3,84 | 0,00 | 0,00 | 1,35 | 2,62 | 0,00 | 1,27 | 5,09 | 4,48 | 0,00 | 5,47 | 5,74 | 2,34 | 0,00 | 0,70 | 0,00 | 1,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,61 | 2,30 | 0,92 | 3,31 | 0,036 | 0,034 | |
| OG5_146076 | LinJ.35.0910 | hypothetical protein, conserved | 1 | 2,04 | 4,43 | 2,39 | 0,00 | 3,24 | 0,00 | 0,00 | 4,06 | 5,08 | 2,42 | 6,34 | 2,20 | 3,41 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,96 | 0,00 | 0,00 | 2,92 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,41 | 3,68 | 3,40 | 0,025 | 0,022 | |
| OG5_149005 | LinJ.35.2910 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,00 | 0,00 | 4,20 | 4,96 | 2,72 | 3,13 | 0,00 | 3,42 | 2,85 | 4,10 | 0,00 | 3,73 | 5,62 | 3,00 | 0,00 | 0,00 | 1,56 | 0,00 | 2,46 | 2,47 | 2,88 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,45 | 0,007 | 0,006 | |
| OG5_148988 | LinJ.35.1750 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,00 | 5,65 | 0,00 | 3,63 | 3,99 | 0,00 | 2,78 | 0,00 | 8,28 | 6,08 | 4,84 | 5,32 | 12,03 | 4,31 | 0,00 | 0,00 | 2,19 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 6,57 | 0,00 | 2,80 | 4,22 | 0,014 | 0,013 | |
| OG5_183509 | LinJ.34.1990 | hypothetical protein, conserved | 1 | 3,35 | 2,77 | 0,00 | 2,00 | 2,45 | 5,08 | 0,00 | 4,57 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,73 | 5,00 | 2,20 | 0,00 | 1,22 | 0,00 | 1,92 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,81 | 0,032 | 0,031 | |
| OG5_128471 | LinJ.28.1610 LinJ.28.1620 LinJ.28.1630 | hypothetical protein, conserved | 3 | 0,00 | 13,89 | 29,46 | 0,00 | 12,98 | 6,32 | 9,72 | 0,00 | 7,42 | 0,00 | 4,91 | 9,58 | 6,29 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,08 | 0,00 | 5,24 | 4,21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,11 | 4,88 | 0,019 | 0,018 | | |
| OG5_154507 | LinJ.03.0130 | hypothetical protein, conserved | 1 | 7,13 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,31 | 3,62 | 0,00 | 8,13 | 5,84 | 0,00 | 5,23 | 0,00 | 4,70 | 0,00 | 0,00 | 2,28 | 0,00 | 3,86 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,44 | 0,042 | 0,038 |
| OG5_127080 | LinJ.29.2970 | 40S ribosomal protein S19-like protein | 1 | 10,75 | 2,36 | 0,00 | 1,73 | 0,00 | 0,00 | 1,67 | 4,02 | 0,00 | 2,29 | 0,00 | 2,25 | 1,99 | 4,32 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,81 | 0,00 | 0,00 | 1,83 | 0,00 | 7,38 | 0,011 | 0,009 | |
| OG5_128720 | LinJ.31.2370 LinJ.31.2380 | 3'-nucleotidase/nuclease, putative, 3'-nucleotidase/nuclease precursor, putative | 2 | 7,80 | 6,88 | 8,02 | 0,00 | 6,26 | 0,00 | 6,16 | 0,00 | 8,27 | 5,32 | 6,77 | 5,13 | 8,89 | 5,80 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 8,62 | 7,49 | 0,003 | 0,002 | |
| OG5_183927 | LinJ.31.2390 | helicase-like protein | 1 | 4,23 | 3,77 | 4,09 | 0,00 | 3,88 | 0,00 | 4,39 | 0,00 | 3,92 | 2,43 | 4,54 | 3,10 | 4,10 | 3,14 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,94 | 9,05 | 0,001 | 0,001 | |
| OG5_127739 | LinJ.04.0680 | ubiquitin-conjugating enzyme e2, putative | 1 | 0,00 | 3,71 | 8,06 | 5,59 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,83 | 6,38 | 3,62 | 0,00 | 0,00 | 2,81 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 9,52 | 0,038 | 0,034 | |
| OG5_129176 | LinJ.35.2960 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,00 | 12,51 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 8,76 | 0,00 | 21,56 | 0,00 | 13,70 | 0,00 | 11,47 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | --- | 0,027 | 0,042 | |
| OG5_157938 | LinJ.23.1390 | hypothetical protein, conserved | 1 | 0,00 | 0,00 | 15,22 | 0,00 | 8,61 | 7,84 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 10,06 | 0,00 | 0,00 | 10,02 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | --- | 0,027 | 0,043 | |

^a R, número de cópias de gene, por grupo ortólogo, no genoma de referência de *L. (L.) Infantum* (JPCM5) haplóide.

^b C, grupo cura; R, grupo recidiva. Razão entre as médias de CNV de genes do grupo cura e do grupo recidiva.

^c p-valor obtido após análise estatística pelo test de Mann-Whitney.

^d Perm. p, p-valor obtido após análise de permutação.

OBS1.: Os valores de número de cópias de genes informados na tabela se referem a dose gênica (número de cópias de genes na célula haploide x ploida do referido cromossomo).

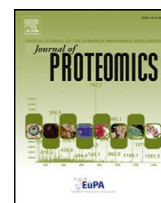
OBS2.: A análise para mensurar o número de cópias de genes foi realizada por grupo ortólogo por cromossomo.

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO

JOURNAL OF PROTEOMICS 108 (2014) 198–208

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes



Juliana B.T. Carnielli^{a,b}, Héliida M. de Andrade^c, Simone F. Pires^c,
Alexander D. Chapeaurouge^d, Jonas Perales^d, Renata Monti-Rocha^a, Sílvia F.G. Carvalho^e,
Leonardo P. Ribeiro^b, Reynaldo Dietze^a, Suely G. Figueiredo^b, Elenice M. Lemos^{a,*}

^aLaboratório de Leishmanioses, Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^bLaboratório de Química de Proteínas, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^cLaboratório de Leishmanioses, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^dLaboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^eHospital Universitário Clemente de Faria, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2014

Accepted 17 May 2014

Available online 27 May 2014

Keywords:

L. infantum chagasi

Miltefosine resistance

Proteome

2D-DIGE

MS/MS

ABSTRACT

The mechanism of miltefosine-resistance in *Leishmania* spp. has been partially determined in experimental resistant lines; however, studies using clinical isolates with different miltefosine susceptibilities are still needed. In our study, we used a proteomic 2D-DIGE/MS approach to study different protein abundances in miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates from visceral leishmaniasis patients with different miltefosine treatment outcomes. The high-resolution proteome obtained from these isolates showed 823 matched spots and 46 spots exhibited different abundances between the isolates. Out of these differentially expressed spots, 26 (56.5%) showed greater and 20 (43.5%) showed lower expression of the resistant isolate compared to the sensitive isolate. MALDI/TOF-TOF mass spectrometry allowed the identification of 32 spots with unique protein identification correspondent to 22 non-redundant proteins. Most of the proteins up-regulated in the proteome miltefosine-resistant isolates were associated with redox homeostasis, stress response, protection to apoptosis, and drug translocation. These differentially expressed proteins are likely involved in miltefosine natural resistance and suggest that the miltefosine-resistance mechanism in *Leishmania* is multifactorial.

Biological significance

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious disease with a challenging treatment plan requiring the prolonged and painful applications of poorly tolerated toxic drugs. Therefore, the

Abbreviations: VL, Visceral leishmaniasis; R, Miltefosine-resistant isolate; S, Miltefosine-sensitive isolate; 2D-DIGE, Two Dimensional Difference Gel Electrophoresis.

* Corresponding author. Tel.: +55 27 3335 7208; fax: +55 27 3335 7206.

E-mail address: lemosem@ndi.ufes.br (E.M. Lemos).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.010>

1874-3919/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

identification of miltefosine, an effective and safe oral drug, was considered a significant advancement in leishmaniasis therapy. However, different sensitivities to miltefosine in *Leishmania* have been observed in clinically relevant species, and the biological mechanism by which clinical isolates of *Leishmania* acquire drug resistance is poorly understood. Our work aims to elucidate the mechanism of natural resistance to miltefosine in *Leishmania* by studying the isolates from VL patients who displayed different miltefosine treatment outcomes.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

American visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania infantum chagasi*, is a major health problem in many parts of Brazil. The disease is characterised clinically by fever, gradual weight loss, splenomegaly, hypergammaglobulinemia, and pancytopenia and is usually fatal without specific treatment [1].

One of the most significant advances in leishmaniasis therapy was the identification of an effective and safe oral drug, miltefosine (hexadecylphosphocholine), a phospholipid analogue. Miltefosine was originally developed as an anticancer drug and is the first oral drug approved for visceral leishmaniasis (VL) in India [2,3].

While miltefosine was able to produce a clinical cure in approximately 90% of VL caused by *L. donovani* [4,5], a clinical trial showed that the cure rate in Brazil, where VL is caused by *L. infantum chagasi*, was much lower. This study revealed that the cure rate was only 43% with a regimen of 2.5 mg/kg daily for 28 days and 67% with an extended treatment of 42 days with the same dose. Pre-treatment isolates obtained from cured patients and relapsed patients, were susceptible and resistant *in vitro*, respectively, suggesting that therapeutic failure may be due to intrinsic parasitic resistance to miltefosine (Dietze, R., unpublished data).

Miltefosine resistance mechanisms in *Leishmania* spp. have been associated with a decrease in intracellular drug accumulation due to the defective inward translocation of miltefosine [6–9] and the over-expression of ABC transporters, which are responsible for drug efflux [10]. Studies have shown that alterations in fatty acid and sterol biosynthesis result in a change in the lipid composition of membranes in miltefosine-resistant *L. donovani*, which could alter membrane fluidity and permeability and affect the drug–membrane interaction [11]. In addition, low susceptibility to drug-mediated programmed cell death has been observed in miltefosine-resistant *Leishmania* [12,13].

However, considering that the mechanism of miltefosine resistance in *Leishmania* spp. has been partially understood in experimental resistant lines, studies using clinical isolates with different miltefosine susceptibility are still needed. Taking into account the fact that proteins are ultimately responsible for cell phenotypes, in the present study we performed a comparative proteomics screen between miltefosine-sensitive and -resistant Brazilian *L. infantum chagasi* clinical isolates from VL patients with different miltefosine treatment outcomes. Using this approach, we identified differentially expressed proteins that may link molecular components to pathways involved in natural miltefosine resistance in *Leishmania*.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Written consent was obtained from patients or from their parents or guardians for children. Ethical clearance was obtained from the institutional review board of the Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (CEP-066/2007), Brazil. The animal experiments were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (CEP-009/2010), Brazil, and all efforts were made to minimise suffering.

2.2. Patients and parasites

We studied a pair of *L. infantum chagasi* isolates, one from a cured patient (MHOM/BR/05/MG14) and the other from a patient who relapsed after miltefosine treatment (MHOM/BR/05/MG11). These isolates were obtained from bone marrow aspirates taken before treatment of VL patients, participants in a clinical trial (Minas Gerais state, Brazil) to evaluate the efficacy and toxicity of miltefosine. The patients were treated with 2.5 mg/kg/day of miltefosine for 28 days and were followed for a minimum of six months after treatment was terminated. Patients were considered cured if no signs and symptoms of the disease were present at the time of examination. Relapse was defined as a patient who was considered cured, but upon follow-up, showed reappearance of clinical signs and positive parasitology. The clinical isolates selected for this study were identified as *L. infantum chagasi* based on a PCR-RFLP assay [14].

2.3. Parasite culture

Promastigotes were grown in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum pH 7.5, 25 °C. The cultures were initiated by inoculating parasites into culture medium to a final concentration of 10⁶ parasites/mL. Cell number was determined microscopically using a Neubauer chamber. Three independently growing cultures of each isolate (S and R) were obtained and were further pooled.

2.4. Susceptibility of intracellular amastigotes to miltefosine

Late log stage promastigotes were used to infect primary peritoneal macrophages isolated from a Swiss mouse at a ratio of 7 promastigotes to 1 macrophage. The cells were plated in RPMI 1640 medium plus 10% heat-inactivated foetal calf serum in 16-well Lab-Tek™ tissue culture chamber slides (Scientific Laboratory Supplies, Wilford, UK) [15] and maintained overnight

at 37 °C in a 5% CO₂/95% air mixture. Extracellular parasites were removed by washing, and fresh medium containing miltefosine was added at a final concentration ranging from 0.55 to 15 μM. Higher concentrations were not tested due to toxicity to infected macrophages. Each concentration was tested in triplicate. After 72 h of incubation at 37 °C in a 5% CO₂/95% air mixture, the cultures were methanol-fixed and Giemsa-stained and 100 macrophages/well were microscopically evaluated. Drug activity was determined from the percentage of infected cells in drug-treated cultures relative to non-treated cultures. The mean effective concentration (EC₅₀) values were calculated by nonlinear regression analysis using Prism version 5.0b software. The results are expressed as the means and standard deviation of three independent experiments.

2.5. Protein extract

The protein extracts were obtained simultaneously for all samples. Promastigotes were obtained in the late log phase in LIT medium. Cells were harvested by centrifugation at 1000 g for 10 min at 4 °C, washed three times in RPMI 1640 medium, and resuspended in two-dimensional lysis buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris base and a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich)) in a proportion of 250 μL of lysis buffer for every 10⁹ parasites. Lysis was allowed to proceed for 2 h by gently vortexing at room temperature, followed by passing the homogenate through a 26-gauge needle 10 times. Then, the samples were centrifuged at 20,000 g for 30 min to remove insoluble material. Protein concentration was determined using the 2D Quant Kit (GE Healthcare). Protein extracts were aliquoted into single-use sample and stored at –80 °C until analysis.

2.6. Two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE)

Previously three representative Coomassie 2D gels from three independent biological replicates of each isolate (S and R) were analysed and the profiles obtained were highly reproducible regarding protein spot total number, relative positions and intensities (data not shown). Considering these data, in our DIGE analyse was used a pool of three biological replicate of each isolate (S and R). A total of 3 2D-DIGE were performed, thus three different images of each pool of isolates were obtained.

The pH of the protein extracts was checked and adjusted to 8.5 with 50 mM NaOH, if necessary. Each fifty-microgram sample was labelled with 400 pmol of N-hydroxysuccinimidyl-ester derivate of cyanine dyes Cy2, Cy3, and Cy5 according to the manufacturer's instructions for minimal labelling dyes (GE Healthcare). Briefly, samples from miltefosine-sensitive and -resistant isolates were labelled with Cy3 or Cy5. To minimise the potential confounding effects of differences in fluorescence intensity, Cy3 and Cy5, labelling was alternated between sensitive and resistant pool extracts in a 'balanced' design. An internal standard, which comprised a mixture of equal amounts of both isolates, was labelled with Cy2. Labelling was performed for 30 min on ice in the dark. The reactions were then quenched by the addition of 1 μL of lysine (10 mM) for 10 min on ice in the dark. Labelled samples were combined, in such a way that each mixture comprised protein samples from miltefosine-sensitive

and -resistant isolates and an aliquot of the internal standard. Then, the total volume was adjusted to 350 μL with Destreak rehydration solution (GE Healthcare) supplemented with 0.2% ampholytes 4–7 (Bio-Rad).

Samples were applied to the immobilised pH gradient (IPG) strips, 18 cm pH 4–7 (GE Healthcare), by in-gel sample rehydration, and passive rehydration was performed for 20 h in the dark. After rehydration, isoelectric focusing was performed on an IPGphor II (GE Healthcare) at a temperature of 20 °C and a maximum current of 50 mA/strip. The focusing parameters were as follows: step 1—300 V constant for 5 h; step 2—gradient from 300 to 10,000 V over 2 h; step 3—10,000 V until complete 60,000 Vh; and step 4—500 V constant for 5 h. After isoelectric focusing, each strip was incubated for 15 min in equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, trace of bromophenol blue) containing 10 mg/mL dithiothreitol, followed by a second incubation in equilibration buffer containing 25 mg/mL iodoacetamide for 15 min. IPG strips were sealed to 12% acrylamide gels using 0.5% agarose in standard Tris-Glycine-SDS electrophoresis buffer. The second dimension SDS-PAGE was carried out on the Ettan DaltSix system at 16 mA/gel for 30 min and then at 40 mA/gel until the dye front reached the bottom of the gel at 15 °C.

Two-dimensional gels cast between two low-fluorescence glass plates were scanned with the Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare) at a resolution of 100 μm, and photomultiplier (PTM) values were adjusted to optimise sensitivity and prevent oversaturation. The excitation/emission wavelengths for Cy2, Cy3, and Cy5 were 488/520, 532/580, and 633/670, respectively. Following fluorescence scanning, DIGE gels were also stained with colloidal Coomassie CBB G-250, following procedures described elsewhere [16], to allow the visual detection of differential abundances of spots.

2.7. 2D image analysis

Analysis of 2D-DIGE was done using DeCyder 2D software, version 7.0 (GEHealthcare) according to the manufacturer's recommendations. The t-test with false discovery rate correction was used for the statistical analysis of the data, and $\alpha < 0.05$ was adopted as the level of significance. Protein spots that showed differential abundance in sensitive and resistant *L. infantum chagasi* clinical isolates were selected for mass spectrometry identification.

2.8. Protein identification

Spots with differential expression were excised, and gel fragments were washed twice with 50% acetonitrile in 25 mM ammonium bicarbonate, followed by pure acetonitrile. The gel fragments were dried and then rehydrated with 10 μL of protease solution (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, at 20 ng/μL in 50 mM ammonium bicarbonate) for 30 min on ice. Then, 20 μL of 50 mM ammonium bicarbonate was added, and digestion was performed at 37 °C for 16 h. Peptide extraction was performed twice for 30 min with 30 μL of 50% acetonitrile/5% formic acid. Trypsin digests were then concentrated in a SpeedVac (Eppendorf) to about 10 μL and desalted using Zip-Tip (C18 resin; P10, Millipore). Peptide elution from the column was performed in 50% acetonitrile/

0.1% trifluoroacetic acid [17]. A gel fragment with no protein and a gel fragment from the molecular weight standard bovine albumin were used as negative and positive controls, respectively.

The tryptic peptides were analysed with a MALDI-TOF-TOF AB Sciex 5800 (AB Sciex, Foster City, CA) mass spectrometer. MS and MSMS spectra were acquired in reflector mode to ensure optimal mass accuracy and peak resolution. Usually up to 15 of the most intense ion signals with signal to noise ratios above 2 were selected as precursors for MS/MS acquisition. During this data dependent analysis, an exclusion list with common trypsin autolysis masses and keratine masses was applied. External calibration in MS mode was performed using a mixture of five peptides: des-Arg1-Bradykinin ($m/z = 904.468$), angiotensin I ($m/z = 1296.685$), Glu1-fibrinopeptide B ($m/z = 1570.677$), and ACTH (18–39 clip) ($m/z = 2465.199$), and ACTH (7–38 clip) ($m/z = 3657.929$). Similarly, tandem mass spectra were externally calibrated using known fragment ion masses observed in the MS/MS spectrum of Glu1-fibrinopeptide B.

Peaklists were created by using the “peaks to mascot” tool in the Explorer software of the ABSciex 5800 mass spectrometer. Common settings were signal to noise ratios of 2 and minimum peak areas of 10. Data base searches were performed against an in-house created “*Leishmania*” (103645 sequences) database. The following search parameters were used: no restrictions on protein molecular weight, tryptic cleavage products including two tryptic missed cleavages allowed, variable modifications of cysteine (carbamidomethylation), methionine (oxidation), asparagine and glutamine (deamidation), and pyroglutamate formation at N-terminal glutamine of peptides. Decoy analysis revealed a false discovery rate of 0.8% considering peptide identity. It is worth mentioning that a second data base search against all entries (32611672 sequences) of the NCBI-non-redundant database (www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html) revealed nearly the same results and did not suffer from losses in sensitivity of protein identification.

Gene Ontology (GO) biological process annotations for *Leishmania* proteins were assigned according to those reported in the *Leishmania* GeneDB database and confirmed using the Panther Classification System (<http://www.pantherdb.org/panther/globalSearch.jsp?>).

2.9. Western blotting

Two-dimensional SDS-PAGE 12% (7 cm, pH 4–7) was used to fractionate 150 μ g of promastigote protein extract from miltefosine-sensitive and -resistant isolates. The proteins were transferred onto PVDF membranes (Hybond, Amersham, UK) in a trans-blot semidry transfer unit (GE Healthcare) by applying a current of 1.6 mA/cm² for 2 h. The membranes were rinsed with PBS-Tween 0.1% and incubated with blocking buffer (5% low-fat milk powder in PBS-Tween 0.1%) at 4 °C overnight. Trans-blotted proteins were probed overnight with a rabbit polyclonal anti-EF-1 β antibody (Cedarlane, Canada) and a mouse polyclonal anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich, USA) antibody at dilutions of 1:50 and 1:1000, respectively. After washing three times in PBS-Tween 0.5% for 5 min, the membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies that were used at a 1:2000 dilution. Specific

binding was revealed with a Western blotting detection ECL system (Amersham, UK) and exposed to a CCD camera (Kodak Gel Logig 1500 imaging system, USA). The eEF-1 β and tubulin (used as normalizer) signals were processed by ImageJ software (Wayne Rasband, NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) from 2-DE blotting. The signal intensities were measured in equal size delimited areas and were expressed as arbitrary units.

3. Results

3.1. In vitro susceptibility of *L. infantum chagasi* clinical isolates to miltefosine

The susceptibility of clinical isolates to miltefosine was evaluated in vitro by intracellular amastigote assay. The isolate from the cured patient had an EC₅₀ of 3.9 μ M and was considered miltefosine-sensitive (S), whereas the isolate from the relapsed patient had an EC₅₀ > 15 μ M, the highest concentration tested, and was considered drug resistant (R).

3.2. Comparative proteomics between *L. infantum chagasi* isolates differing in vitro susceptibility to miltefosine

To comparatively analyse the 2D-DIGE, a total of 3 large format 2DE gels were obtained. Two-paired samples (S and R) were labelled alternatively with Cy3 or Cy5 and were run in 3 gels along with a pooled standard, which was labelled with Cy2. The images were analysed by Decyder 2D software, v7.0. The image analysis showed that the average number of spots detected by CyDyes stains was 810 \pm 11.8. Protein spots presented migration positions from 14 to 100 kDa but were predominantly clustered between 14 and 70 kDa (Fig. 1).

A differential analysis between drug-sensitive and -resistant isolates was performed on 823 matched spots. A protein spot was considered to have differential abundance if the spot was detected in all of the experimental replicates with statistical significance ($\alpha < 0.05$). In the image analysis, 46 protein spots showed significant differences when comparing the miltefosine-sensitive and -resistant isolates. Out of the 46 spots, 26 (56.5%) showed greater and 20 (43.5%) showed lower expression of the resistant isolate compared to the sensitive isolate (Fig. 1). These differential spots were cut from the gels, digested, and used for MALDI-TOF/TOF analysis.

3.3. Identification of spots with differential abundances by MS/MS

With MALDI-TOF/TOF analysis, 41 (89.1%) out of the 46 differentially regulated protein spots were successfully identified with high confidence after searching databases. From these spots were identified 50 proteins correspondent to 34 non-redundant proteins. The molecular mass and isoelectric point values estimated by gel electrophoresis (experimental) showed a good correlation with predicted values of the identified proteins ($r = 0.97$, $p < 0.0001$ for the molecular weight; and $r = 0.69$, $p < 0.0001$ for the isoelectric point). However, some variations were observed suggesting that fragments or post-translational protein modifications were visualised (Supplementary material S1).

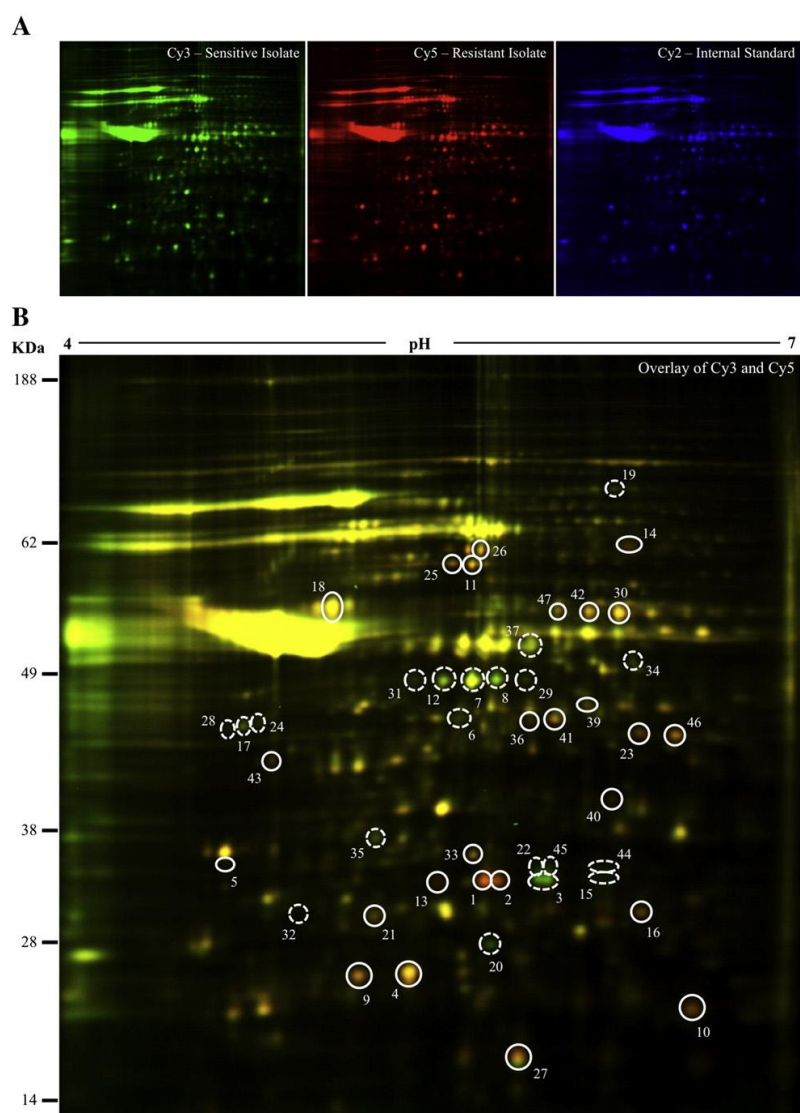


Fig. 1 – The 2D-DIGE comparative proteomics analysis between miltefosine-sensitive and -resistant *L. infantum chagasi* clinical isolates. (A) Representative 2D gels comprising *L. infantum chagasi* miltefosine-sensitive, miltefosine-resistant, and internal standard (mix of sensitive and resistant samples). (B) Overlay of Cy3 and Cy5 derived from a single gel, highlighting differentially expressed protein spots: solid line for over-regulation and a dashed line for down-regulation in the resistant isolate. The molecular weight markers (MW) are indicated. The highlighted spots were excised and identified by MALDI-TOF/TOF. Information about the proteins corresponding to the spot numbers is listed in [Tables 1 and 2](#) and in [Supplementary material S2](#).

Nine spots were excluded upon further analysis, because they corresponded to multiple proteins ([Supplementary material S2](#)). Thirty-two protein spots remained with unique protein identification correspondent to 22 non-redundant proteins.

Five proteins (chaperonin Hsp60, peroxiredoxin, NADP-dependent alcohol dehydrogenase, 2,4-dihydroxyhept-

2-ene-1,7-dioic acid aldolase and one hypothetical protein) were identified in different localisations on 2D-Gel spots, indicating potentially diverse protein forms, thus suggesting the occurrence of post-translational modification of mutation and of the presence of different protein species, as shown in [Tables 1 and 2](#), and in [Supplementary material S2](#).

The identified proteins were classified according to the Gene Ontology/Panther Annotation of Biological Processes and categorised into 12 diverse functional groups (Fig. 2). Up-regulated proteins identified in the miltefosine-resistant isolate were found to be mainly involved in antioxidant/detoxification, protein folding/chaperones, and stress processes. Conversely, proteins involved in amino acid metabolism and cytoskeleton were down-regulated in the miltefosine-resistant isolate. Proteins with unknown biological functions/hypothetical proteins represented 14.3% and

27% of the proteins in the miltefosine-resistant and -sensitive isolates, respectively.

3.4. Western blot

The validation of our proteomic data was performed using immunoblotting. According to protein fold changes and the availability of validation reagents, the translation elongation factor 1-beta protein (EF-1 β) was selected for verification of protein-expression changes between miltefosine-resistant and

Table 1 – Up-regulated proteins in the miltefosine-resistant phenotype identified in the proteomic study.

| ID ^a | Protein identity | Ratio (S/R) ^b | T-test (p) | Accession number ^c | pI ^d (exp/pred) | M _r ^e (exp/pred) | Reported association to drug sensitive phenotype | |
|--|---|--------------------------|------------|-------------------------------|----------------------------|--|--|-----------------|
| | | | | | | | Reg | Ref |
| Protein folding/chaperones and stress proteins^f | | | | | | | | |
| 11 | Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor | 1.28 | 0.014 | gi 134074164 | 5.71/5.33 | 60/59.32 | □ | [23,29] |
| 25 | Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor | 1.35 | 0.026 | gi 134074164 | 5.64/5.33 | 60/59.32 | | |
| 26 | Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor | 1.34 | 0.026 | gi 134074164 | 5.75/5.33 | 61/59.32 | | |
| 14 | Stress-induced protein sti1 | 1.23 | 0.016 | gi 134067520 | 6.33/5.90 | 62/62.20 | □/□ | [24]/[29] |
| Antioxidant/detoxification^f | | | | | | | | |
| 4 | Mitochondrial peroxiredoxin | 1.36 | 0.007 | gi 16751316 | 5.47/6.43 | 25/25.35 | □/□ | [21,29,49]/[21] |
| 9 | Mitochondrial peroxiredoxin | 1.38 | 0.008 | gi 16751316 | 5.27/6.43 | 24/25.35 | | |
| 10 | Cytosolic peroxiredoxin | 1.42 | 0.011 | gi 16751318 | 6.57/7.72 | 21/22.12 | | |
| Protein biosynthesis^f | | | | | | | | |
| 5 | Translation elongation factor 1-beta | 1.11 | 0.007 | gi 134074101 | 4.74/4.61 | 36/23.22 | □ | [20] |
| Protein targeting and signal transduction^f | | | | | | | | |
| 40 | Activated protein kinase c receptor (LACK) | 1.15 | 0.043 | gi 321398491 | 6.26/6.05 | 40/34.35 | □ | [50] |
| DNA replication and repair^f | | | | | | | | |
| 43 | Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) | 1.25 | 0.044 | gi 134068565 | 4.93/4.82 | 43/32.39 | □/□ | [29,47]/[51] |
| Respiratory electron transport chain^f | | | | | | | | |
| 18 | ATPase beta subunit | 1.15 | 0.019 | gi 134070254 | 5.17/5.14 | 55/56.26 | □/□ | [24,29]/[29] |
| Metabolic enzymes^f | | | | | | | | |
| Carbohydrate metabolism | | | | | | | | |
| 23 | NADP-dependent alcohol dehydrogenase | 1.43 | 0.026 | gi 134069817 | 6.37/5.96 | 44/38.43 | - | - |
| 46 | NADP-dependent alcohol dehydrogenase | 1.35 | 0.048 | gi 134069817 | 6.51/5.96 | 44/38.43 | - | - |
| Amino acid metabolism | | | | | | | | |
| 1 | 2,4-Dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 1.85 | 0.007 | gi 134070342 | 5.76/5.80 | 33/30.38 | □ | [21,29] |
| 2 | 2,4-Dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 1.78 | 0.007 | gi 134070342 | 5.81/5.80 | 33/30.38 | | |
| 13 | 2,4-Dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 1.92 | 0.015 | gi 134070342 | 5.61/5.80 | 33/30.38 | | |
| 16 | Pyrrroline-5-carboxylate reductase | 1.25 | 0.016 | gi 321399182 | 6.38/6.22 | 30/28.65 | - | - |
| Monosaccharide and phospholipid metabolic process/translation | | | | | | | | |
| 41 | GDP-mannose pyrophosphorylase | 1.24 | 0.043 | gi 134069789 | 6.04/5.70 | 45/41.81 | - | - |
| Unknown biological process/hypothetical proteins^f | | | | | | | | |
| 27 | Ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor | 1.21 | 0.027 | gi 134068463 | 5.89/6.74 | 17/21.30 | □ | [52] |
| 21 | Conserved hypothetical protein | 1.11 | 0.026 | gi 134073755 | 5.33/5.82 | 30/29.11 | - | - |
| 36 | Conserved hypothetical protein | 1.28 | 0.036 | gi 134071523 | 5.95/6.11 | 45/35.58 | - | - |

Reg — regulation, Ref — reference.
^a Spot ID — The numbers correspond to the specific spots as indicated in Fig. 1.
^b Average ratio DIGE (miltefosine-resistant (R) and miltefosine-resistant (S) phenotypes).
^c Accession number corresponds to *Leishmania infantum* genome database according to NCBI.
^d pI — Isoelectric point.
^e M_r — Molecular weight kDa (exp — experimental and pred — predicted).
^f Functional categories according to Gene Ontology and Panther biological process annotations.

Table 2 – Up-regulated proteins, in the miltefosine-sensitive phenotype, identified in the proteomic study.

| ID ^a | Protein identity | Ratio (S/R) ^b | T-test (p) | Accession number ^c | pI ^d (exp/pred) | M _r ^e (exp/pred) | Reported association to drug sensitive phenotype | |
|---|---|--------------------------|------------|-------------------------------|----------------------------|--|--|-----------------|
| | | | | | | | Reg | Ref |
| Proteolysis ^f | | | | | | | | |
| 19 | Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 | 1.24 | 0.019 | gi 134070535 | 6.27/5.84 | 68/77.18 | ☐ | [20,29,47] |
| Metabolic enzymes ^f | | | | | | | | |
| Amino acid metabolism | | | | | | | | |
| 35 | Spermidine synthase (SPDSYN) | 1.41 | 0.036 | gi 134066976 | 5.34/5.18 | 37/32.91 | – | – |
| 37 | S-adenosylmethionine synthetase | 1.20 | 0.036 | gi 321398550 | 5.95/5.50 | 52/43.10 | ☐ | [23,24,29,33] |
| 44 | Nitrilase | 1.27 | 0.047 | gi 134070599 | 6.25/5.99 | 34/31.11 | ☐ | [29] |
| 45 | 2,4-Dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase | 2.19 | 0.048 | gi 134070342 | 6.01/5.80 | 34/30.38 | ☐ | [21] |
| Translation | | | | | | | | |
| 34 | RNA helicase | 1.23 | 0.035 | gi 134069547 | 6.34/8.82 | 50/58.76 | ☐/☐ | [29,51]/[20] |
| Cytoskeleton proteins ^f | | | | | | | | |
| 7 | Actin | 1.43 | 0.007 | gi 134067044 | 5.77/5.41 | 52/42.02 | ☐/☐ | [23]/[23,29,52] |
| 12 | Actin | 1.36 | 0.014 | gi 134067044 | 5.60/5.41 | 48/42.02 | | |
| Unknown biological process/hypothetical proteins ^f | | | | | | | | |
| 17 | Conserved hypothetical protein | 1.51 | 0.019 | gi 134066959 | 4.81/4.72 | 45/39.14 | – | – |
| 24 | Conserved hypothetical protein | 1.51 | 0.026 | gi 134066959 | 4.88/4.72 | 45/39.14 | – | – |
| 28 | Conserved hypothetical protein | 1.47 | 0.027 | gi 134066959 | 4.75/4.72 | 45/39.14 | – | – |

Reg — regulation, Ref — reference.

^a Spot ID — The numbers correspond to the specific spots as indicated in Fig. 1.

^b Average ratio DIGE (miltefosine-resistant (R) and miltefosine-resistant (S) phenotypes).

^c Accession number corresponds to *Leishmania infantum* genome database according to NCBI.

^d pI — Isoelectric point.

^e Mr — Molecular weight kDa (exp — experimental and pred — predicted).

^f Functional categories according to Gene Ontology and Panther biological process annotations.

-sensitive isolates. Tubulin was used as a normaliser and this verification was carried out by 2D western blotting followed by densitometry analysis. Both proteins were well-detected and EF-1 β up-regulation in miltefosine-resistant phenotype was

confirmed (Fig. 3). Densitometry analysis confirmed the visual evaluation of the immunoblotting signals, and the ratio of the signals between the strains (R/S) was 1.05 and 1.57 arbitrary units for α -Tubulin and EF-1 β , respectively. These data indicate that

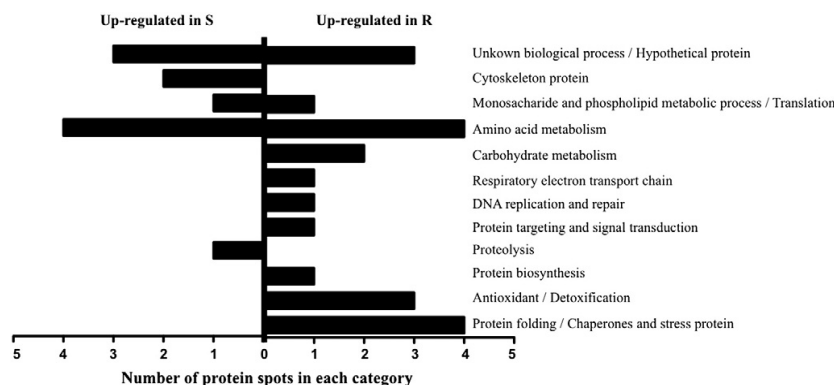


Fig. 2 – Functional assignment of identified proteins. Classes of biological process of up-regulated protein spot with unique protein identification in the miltefosine-resistant and -sensitive isolates. Protein functional classification was based on Gene Ontology and Panther annotations. Miltefosine-sensitive (S) and miltefosine-resistant (R) *L. infantum chagasi* clinical isolates.

EF-1 β is up-regulated in the miltefosine-resistant isolate, corroborating the results from our proteomic analysis.

4. Discussion

Miltefosine has proven to be highly effective against visceral leishmaniasis in India [18,19]. However, around 50% of VL patients treated with miltefosine relapse in Brazil. In addition, most isolates from relapsed patients were resistant in vitro to miltefosine, suggesting that treatment failure can be associated with natural resistance of the infecting parasite (Dietze R., unpublished data). In this scenario, proteomics screens have been useful in pinpointing novel drug resistance

mechanisms in *Leishmania* parasites [12,20–24]. Thus, a comparative proteomic approach was carried out and revealed significant changes in protein expression between isolates with different miltefosine susceptibilities.

In our study, soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *L. infantum chagasi* were separated with a high-resolution 2D-DIGE, with a mean number of 810 spots. This number covered 10.1% of the ~8000 open reading frames predicted for the *Leishmania* genome sequence, although post-translational modification and processing will significantly reduce this estimate. The total number of spots is slightly lower than that found in other studies of DIGE analysis on *Leishmania infantum* [25,26] and much lower than that found by Daneshvar et al. [21]. Indeed, the total number of spots visualized in the DIGE can be influenced by several factors such as sample type (species/strains of parasite), sample preparation, size and the pH range of IPG strip, size of the gel, and also the detection parameters used. A total of 32 protein spots with unique protein identification (22 non-redundant) were differentially expressed between miltefosine-sensitive and -resistant *L. infantum chagasi* isolates, which were clearly grouped by ontology into 12 functional categories. Most are involved in redox regulation and stress response functions. Some of these proteins have already been associated with resistance to different drugs in *Leishmania* spp. (see references in Tables 1 and 2).

The functional categories with the highest number of differentially expressed spots in resistant isolate were chaperones and stress proteins. Chaperones, also termed heat shock proteins (Hsps), comprise several highly conserved families of protein folding facilitators that play important roles in many aspects of cell function, including responses to chemical and physiological stresses. These proteins have been associated with cell protection, preventing programmed cell death activation by modulating multiple events within apoptotic pathways (for a review, see [27,28]). In our analysis, three protein spots corresponding to the same chaperone Hsp60, were up-regulated in the miltefosine resistant isolate. These spots could represent different variants of Hsp60 with different post-translational modifications, because a small difference between the calculated and experimental pI of the identified spots was found. Over-regulation of this protein was observed in *L. infantum chagasi* and *Leishmania braziliensis* antimonial-resistant lines [29] and in *L. major* methotrexate-resistant lines [23]. In this study, one protein spot corresponded to stress-induced protein sti1 exhibited higher abundance in the resistant isolate. This protein forms a complex with heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 (known as Hsp83 in *Leishmania* spp.) [30], acts as co-chaperone, and is produced in response to stress [31,32]. Considering this protein–protein interaction, the up-regulation of this stress protein could be associated with the resistant phenotype since the over-expression of Hsp83 has been linked to miltefosine and antimonial resistance in *L. donovani* [12]. Furthermore, Hsp83 interferes with the mitochondrial membrane potential, decreasing the drug-mediated programmed cell death in *L. donovani* [12], which has been described as an action mechanism of miltefosine [13,33,34].

In addition, pronounced changes in the peroxiredoxin protein, which belong to the antioxidant/detoxification category, were observed in this proteomic study. This protein was

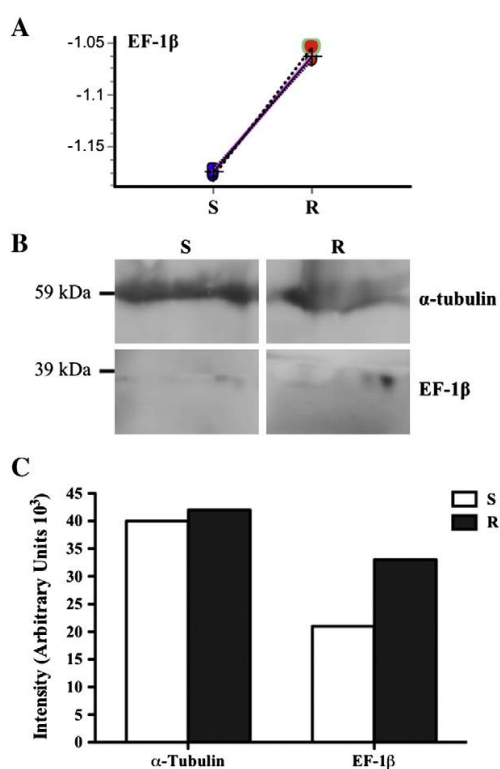


Fig. 3 – The validation of proteomic data. (A) Graphical representation of EF-1 β protein spots up-regulated in miltefosine-resistant isolate ($p < 0.01$). Protein spot quantification was performed by the Differential In-gel Analysis module of the DeCyder 7.0 software. Each circle (blue or red) represents the abundance of the referred spot in an individual gel, expressed as a volume ratio to its corresponding internal standard. **(B)** The 2D western blot image of the independent verification of EF-1 β and α -tubulin (normaliser) proteins in miltefosine-sensitive (S) and -resistant (R) isolates. **(C)** Densitometry analysis of EF-1 β and α -tubulin (normaliser) proteins in miltefosine-sensitive (S) and -resistant (R) isolates.

identified in three different protein spots, represented by two mitochondrial and one cytosolic peroxirredoxin, and all spots showed up-regulation in the miltefosine-resistant isolate. Peroxirredoxin is found in different organisms and has been implicated in a wide variety of cell functions, such as redox homeostasis, apoptosis, signal transduction, and pathogen infection [35–38]. Peroxirredoxin is best known for its ability as an antioxidant enzyme that can use different reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) as substrates. In the Trypanosomatidae family, peroxirredoxins are the major antioxidant enzymes [39]. Overexpression of this antioxidant protein has been associated previously with antimonial resistance in *L. infantum chagasi* and *L. braziliensis* [29] and with gentamicin resistance in *L. infantum* [21]. Harder et al. [40] showed that *L. donovani* parasites overexpressing peroxirredoxin are protected from hydrogen peroxide-induced programmed cell death. In accordance with these findings, a recent study indicated that miltefosine-unresponsive *L. donovani* has better redox machinery, which removes ROS more efficiently, improving its ability to maintain redox homeostasis [41].

In the current work, we highlighted other two proteins overexpressed in the resistant isolate, NADP-dependent alcohol dehydrogenase (NADP-ADH) and elongation factor-1 β (EF-1 β), and although they are sorted into carbohydrate metabolism and protein biosynthesis, respectively, they also play an important role in redox homeostasis. NADP-ADH, known as NADP-aldehyde-reductase, comprises a class of oxidoreductases that catalyses the reversible oxidation of ethanol to acetaldehyde with the concomitant reduction of NADPH [42]. It has been shown that in yeast, during oxidative stress conditions (the glutathione levels are depleted and the

glyoxalase pathway enzymes are inactive), aldose reductase activity is account for 40% of detoxification of the methylglyoxal in the cell [43]. EF-1 β complex is a functionally distinct part of elongation factor 1. This complex is involved in ribosomal protein synthesis and simultaneously displays distinct activities, including those of trypanothione S-transferase and peroxidase [44,45]. The trypanothione-dependent system is common to all *Leishmania* species and plays an important role in parasite survival by neutralising the harmful effects of ROS (for a review, see [46]).

Although previous studies have reported the overexpression of enzymes that are involved in the trypanothione biosynthesis system in antimonial- and methotrexate-resistant *Leishmania* lines [23,24], our results showed a down-regulation of two enzymes (Spermidine synthase and S-adenosylmethionine synthetase) that are involved in this pathway in the miltefosine-resistant isolate.

The other differentially expressed proteins with highly specific functions identified in this work that could be associated with the miltefosine resistant phenotype were proliferative cell nuclear antigen (PCNA) and mitochondrial ATPase β -subunit. PCNA participates in the process of replication and DNA repair. In agreement with our findings, PCNA was found to be up-regulated in antimonial-resistant *L. donovani* clinical isolates [47] and in an antimonial-induced resistant *L. braziliensis* line [29]. The mitochondrial ATPase β -subunit is the catalytic element of a multi-subunit hydrogen ion (H⁺) transporter that in yeast has a potential functional/regulatory relationship with an ABC efflux pump that is involved in multi-drug resistance [48]. Considering that miltefosine-resistance in *Leishmania* has been associated with an overexpression of ABC transporters related to a decrease in

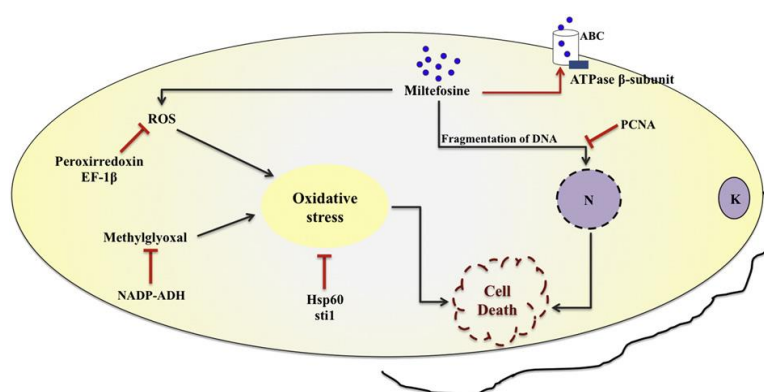


Fig. 4 – Proposed model for mechanism of miltefosine resistance in *L. chagasi*. The miltefosine (blue circles) induces the increased level of reactive oxygen species (ROS) which in turn leads to oxidative stress and then cell death [53]. The over expression of both Peroxirredoxin and elongation factor-1 β (EF-1 β) proteins decrease the ROS level, providing protection against oxidative stress. In addition, the over expression of NADP-dependent alcohol dehydrogenase (NADP-ADH), chaperone Hsp60, and stress-induced protein sti1 (sti1) could also help to maintain redox homeostasis and then protect oxidative stress. Miltefosine is also able to induce cell death process by DNA fragmentation [13]. In this way, over expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) could be involved in miltefosine resistance by repairing and replicating DNA. The over expression of ATPase β -subunit (considered a catalytic element of ABC efflux pump) also protects miltefosine-induced cell death by decreasing intracellular drug accumulation. N — nucleus and K — kinetoplast.

intracellular drug accumulation [10], the overexpression of this protein subunit in resistant isolate could be correlated with resistant phenotype.

In conclusion, we present, for the first time, a proteomic 2D-DIGE/MS analysis to elucidate the changes in expression between miltefosine-sensitive and -resistant *L. infantum chagasi* isolates from VL patients with different miltefosine treatment outcomes. Our study revealed overexpressed proteins in miltefosine-resistant isolate that plays a role in redox homeostasis, stress response, protection to apoptosis, and drug translocation, consistent with the resistance phenotype. These differentially expressed proteins are likely involved in miltefosine natural resistance and suggest that the miltefosine resistance mechanism in *Leishmania* is multifactorial. Based on the results of the present study we propose a mechanism of miltefosine resistance in *L. infantum chagasi* which is depicted in Fig. 4. We believe that these findings can contribute to better the understanding of the miltefosine-resistance phenotype. In addition, some of these highlighted proteins, after a better characterization, could be used as biomarkers of miltefosine-resistance in *Leishmania*, helping to establish more appropriate drug treatment.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.05.010>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgment

We thank Dr. Fausto E. L. Pereira for his precious contributions to this work. The study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (Grant 478080/2009 3) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo—FAPES (Grant 54694280/2011), Brazil. EML is grateful for the CNPq research fellowship (PQ).

REFERENCES

- Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 1996;22:1–13.
- Engel J. Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country — TDR — pharmaceutical industry (Zentaris). *TDR News* 2002;68:5.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002;347:1739–46.
- Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, et al. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2007;196:591–8.
- Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis* 2012;55:543–50.
- Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2397–403.
- Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* 2003;278:49965–71.
- Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* 2006;281:23766–75.
- Sanchez-Canete MP, Carvalho L, Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Castanys S. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1305–13.
- Perez-Victoria JM, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jimenez IA, Ravelo AG, Castanys S, et al. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2468–74.
- Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2677–86.
- Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:88–101.
- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:852–9.
- Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004;90:31–7.
- Sesana AM, Monti-Rocha R, Vinhas SA, Morais CG, Dietze R, Lemos EM. In vitro activity of amphotericin B coxleates against *Leishmania chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106:251–3.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988;9:255–62.
- Vergote D, Bouchut A, Sautiere PE, Roger E, Galinier R, Rognon A, et al. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int J Parasitol* 2005;35:215–24.
- Sundar S, Gupta LB, Makharia MK, Singh MK, Voss A, Rosenkaimer F, et al. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93:589–97.
- Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, et al. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998;352:1821–3.
- Biyani N, Singh AK, Mandal S, Chawla B, Madhubala R. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2011;179:91–9.
- Daneshvar H, Wyllie S, Phillips S, Hagan P, Burchmore R. Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. *J Proteomics* 2012;75:1463–71.
- Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and

- application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:146–55.
- [23] Drummelsmith J, Girard I, Trudel N, Ouellette M. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* 2004;279:33273–80.
- [24] Walker J, Gongora R, Vasquez JJ, Drummelsmith J, Burchmore R, Roy G, et al. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. *Mol Biochem Parasitol* 2012;183:166–76.
- [25] Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas LM, Pires SF, Chapeaurouge AD, et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. *J Proteome Res* 2011;10:2172–84.
- [26] da Fonseca Pires S, Fialho Jr LC, Silva SO, Melo MN, de Souza CC, Tafuri WL, et al. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J Proteome Res* 2014;13:1860–72.
- [27] Beere HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 2004;117:2641–51.
- [28] Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31:359–77.
- [29] Matrangolo FS, Liarte DB, Andrade LC, de Melo MF, Andrade JM, Ferreira RF, et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol Biochem Parasitol* 2013;190:63–75.
- [30] Hubel A, Clos J. The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. *Exp Parasitol* 1996;82:225–8.
- [31] Hombach A, Ommen G, Chrobak M, Clos J. The Hsp90-Sti1 interaction is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. *Cell Microbiol* 2012;15(4):585–600.
- [32] Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter BR. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J Biol Chem* 1997;272:1876–84.
- [33] Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 2007;116:1–13.
- [34] Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3010–5.
- [35] Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8841–8.
- [36] Droge W. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev* 2002;1:257–78.
- [37] Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 2003;300:650–3.
- [38] Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002;383:347–64.
- [39] Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragon A, Kelly JM. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2000;275:8220–5.
- [40] Harder S, Bente M, Isermann K, Bruchhaus I. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Eukaryot Cell* 2006;5:861–70.
- [41] Das M, Saudagar P, Sundar S, Dubey VK. Miltefosine unresponsive *Leishmania donovani* has better ability of resist reactive oxygen species. *FEBS J* 2013;280(19):4807–15.
- [42] Reid MF, Fewson CA. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* 1994;20:13–56.
- [43] Gomes RA, Sousa Silva M, Vicente Miranda H, Ferreira AE, Cordeiro CA, Freire AP. Protein glycation in *Saccharomyces cerevisiae*. Argpyrimidine formation and methylglyoxal catabolism. *FEBS J* 2005;272:4521–31.
- [44] Vickers TJ, Wyllie S, Fairlamb AH. *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. *J Biol Chem* 2004;279:49003–9.
- [45] Vickers TJ, Greig N, Fairlamb AH. A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13186–91.
- [46] Colotti G, Ilari A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids* 2011;40:269–85.
- [47] Kumar A, Sisodia B, Misra P, Sundar S, Shasany AK, Dube A. Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70:609–17.
- [48] Zhang X, Moye-Rowley WS. *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance gene expression inversely correlates with the status of the F(0) component of the mitochondrial ATPase. *J Biol Chem* 2001;276:47844–52.
- [49] Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH. Roles of trypanothione S-transferase and trypanothione peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1359–65.
- [50] El Fadili K, Drummelsmith J, Roy G, Jardim A, Ouellette M. Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. *Exp Parasitol* 2009;123:51–7.
- [51] Chawla B, Jhingran A, Panigrahi A, Stuart KD, Madhubala R. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One* 2011;6:e26660.
- [52] Sharma S, Singh G, Chavan HD, Dey CS. Proteomic analysis of wild type and arsenite-resistant *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol* 2009;123:369–76.
- [53] Moreira W, Leprohon P, Ouellette M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis* 2011;2:e201.