



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

TÁBATA RODRIGUES COSTA

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS PROTEÍNAS ABC (SUBFAMÍLIA F) NA
RESISTÊNCIA À PAROMOMICINA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF THE ABC PROTEINS (SUBFAMILY F) IN
PAROMOMYCIN RESISTANCE IN *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

CAMPINAS

(2021)

TÁBATA RODRIGUES COSTA

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DAS PROTEÍNAS ABC (SUBFAMÍLIA F) NA
RESISTÊNCIA À PAROMOMICINA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF THE ABC PROTEINS (SUBFAMILY F) IN
PAROMOMYCIN RESISTANCE IN *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Animal, na área de
Relações Antrópicas, Meio Ambiente e
Parasitologia.*

*Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for the
Master's Degree in Animal Biology, in the
area of Human Relations, Environment and
Parasitology.*

Orientador: PROF. DR. ADRIANO CAPPELLAZZO COELHO

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA TÁBATA
RODRIGUES COSTA E ORIENTADA PELO
PROF. DR. ADRIANO CAPPELLAZZO
COELHO.

CAMPINAS

(2021)

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823i Costa, Tábata Rodrigues, 1995-
Investigação do papel das proteínas ABC (subfamília F) na resistência à paromomicina em *Leishmania amazonensis* / Tábata Rodrigues Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Adriano Cappellazzo Coelho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania*. 2. Transportadores de cassetes de ligação de ATP. 3. Paromomicina. I. Coelho, Adriano Cappellazzo, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of the role of the ABC proteins (subfamily F) in paromomycin resistance in *Leishmania amazonensis*

Palavras-chave em inglês:

Leishmania

ATP-binding cassette transporters

Paromomycin

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Adriano Cappellazzo Coelho [Orientador]

Carolina Moura Costa Catta Preta

Juliana Ide Aoki

Data de defesa: 27-07-2021

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7584-4097>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0168222500040574>

Campinas, 27 de julho de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

Prof.(a). Dr.(a) Carolina Moura Costa Catta Preta

Prof.(a) Dr(a). Juliana Ide Aoki

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Unidade do Instituto de Biologia/UNICAMP.

À minha família, pelo esforço, incentivo, amor e carinho. Agradeço por terem lutado juntos para que eu pudesse ter acesso à uma educação de qualidade.

Ao espiritual, aos meus amigos e namorado, pelo incentivo, apoio e por sempre acreditarem na minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha mãe Kátia, meus avós Maria e Luiz, meus tios Denes, Elaine, Rômulo, Socorro, Idalina, Cleber e minha afilhada Maria Luiza. Sou grata por todo amor, apoio, incentivo e construção do meu caráter e personalidade. Em especial meus tios Denes e Elaine que além de todo apoio, me dão suporte financeiro para que eu possa realizar meus sonhos e alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano C. Coelho por ter me confiado um projeto tão interessante. Agradeço por ser um orientador muito presente e que está sempre disposto a ajudar e ensinar, que contribui muito para construção do meu pensamento crítico e desenvolvimento profissional. Você é um grande exemplo!

Aos meus colegas de laboratório Bianca, Cristielle, Elizabeth e Thales, por todo suporte e trabalho em equipe. Sou grata por proporcionarem um ambiente de trabalho leve, colaborativo e divertido. Ao Nilson, técnico e pesquisador do departamento, que sempre está disposto a ajudar, ensinar e que contribui demais para que tudo esteja em ótimas condições para exercermos nosso trabalho.

Aos professores e professoras do Departamento de Parasitologia, Marlene, Silmara, Fernanda, Danilo, Carlos, Selma e Patrícia por todo ensinamento e contribuição na minha caminhada como pesquisadora. Ao funcionário Camilo pela manutenção dos animais e às moças da limpeza por toda limpeza e gentileza.

Aos meus amigos meus amigos, especialmente Júlia, Rose, Larissa, Melissa, Laís, Marina e meu namorado Diogo, por todo apoio, carinho, diversão e por me fazerem muito bem.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX) no processo nº 2608/19, pela bolsa para que eu pudesse realizar meu projeto de pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto FAPESP 2016/21171-6), pelo financiamento do projeto do Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária com ampla distribuição geográfica em áreas tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. Não há vacinas disponíveis para o controle da doença e a quimioterapia é restrita a algumas drogas tóxicas como os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B. Embora não aprovada para o tratamento da leishmaniose no Brasil, a paromomicina tem sido usada no tratamento de leishmaniose visceral no Sul da Ásia, apresentando boa eficácia clínica. Estudos em outros organismos, demonstraram que as proteínas da subfamília ABC-F (*ATP Binding Cassete*) afetam a suscetibilidade à paromomicina, como por exemplo, o fator de alongamento 3 (EF-3) envolvido no processo de tradução de *Saccharomyces cerevisiae*. A busca de homólogos destas proteínas nas bases de dados do genoma de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* identificou três genes no genoma desta espécie: *ABCF1* (LAMA_000042000.1), *ABCF2* (LAMA_000297600.1) e *ABCF3* (LAMA_000698500.1), assim como em outras espécies de *Leishmania*. Neste trabalho, foi investigado o possível envolvimento destas proteínas na suscetibilidade e resistência à paromomicina, utilizando técnicas de genética molecular como superexpressão e inativação gênica dos genes que codificam as proteínas ABCF de *L. (L.) amazonensis*. Uma vez selecionadas as respectivas linhagens transgênicas, estas foram analisadas quanto ao fenótipo de crescimento e foram testadas quanto a suscetibilidade à paromomicina *in vitro* nas formas promastigotas. Verificou-se que as formas promastigotas das linhagens transgênicas não tiveram seu crescimento *in vitro* alterado de forma significativa em relação à linhagem selvagem. No caso das linhagens superexpressoras dos genes ABCFs, apenas a linhagem superexpressora do gene *ABCF1* apresentou um valor de EC₅₀ de cerca de 1,7 vezes maior que a linhagem selvagem, indicando que a superexpressão deste gene confere resistência à paromomicina. Foram geradas ainda linhagens *knockout* para os genes *ABCFs*. No entanto, foi possível apenas gerar mutantes nulos para o gene *ABCF2* em *L. (L.) amazonensis*, indicando que os genes *ABCF1* e *ABCF3* são essenciais para o parasito no estágio promastigota. Os mutantes nulos para o gene *ABCF2* apresentaram um valor de EC₅₀ que correspondia à metade do valor de EC₅₀ da linhagem selvagem, sugerindo um possível envolvimento na suscetibilidade à paromomicina medida pela proteína ABCF2. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para uma melhor compreensão do papel das proteínas ABCFs na resistência e suscetibilidade à paromomicina, além do possível envolvimento na biologia do parasito, como a infectividade *in vitro* em *Leishmania*.

ABSTRACT

Investigation of the role of the ABC proteins (subfamily F) in paromomycin resistance in *Leishmania amazonensis*

Leishmaniasis is a parasitic disease with wide geographical distribution in tropical and subtropical areas, including Brazil. There are no vaccines available to control the disease and chemotherapy is restricted to some toxic drugs such as pentavalent antimonials and amphotericin B. Although not approved for the treatment of leishmaniasis in Brazil, paromomycin has been used in the treatment of visceral leishmaniasis in the South from Asia, with good clinical efficacy. Studies in other organisms have shown that the proteins of the subfamily ABC-F (ATP Binding Cassette) affect the susceptibility to paromomycin, such as, for example, the elongation factor 3 (EF-3) involved in the translation process of *Saccharomyces cerevisiae*. The search for homologues of these proteins in the databases of the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* genome identified three genes in the genome this species: *ABCF1* (LAMA_000042000.1), *ABCF2* (LAMA_000297600.1) and *ABCF3* (LAMA_000698500.1), as well as in other *Leishmania* species. In this work, the possible involvement of these proteins in susceptibility and resistance to paromomycin was investigated, using molecular genetic techniques such as overexpression and gene inactivation of *ABCFs* genes of *L. (L.) amazonensis*. Once the respective transgenic lines were selected, they were analyzed for growth phenotype and tested for susceptibility to paromomycin *in vitro* in promastigote forms. It was found that the promastigote forms of the transgenic lines did not have their *in vitro* growth altered significantly in relation to the wild-type. In the case of the overexpressing lines of the *ABCFs* genes, only the overexpressing line of the *ABCF1* gene showed an EC₅₀ value of about 1.7 times greater than the wild-type, indicating that overexpression of this gene confers resistance to paromomycin. Knockout lines were also generated for the *ABCFs* genes. However, it was only possible to generate null mutants for the *ABCF2* gene in *L. (L.) amazonensis*, indicating that the *ABCF1* and *ABCF3* genes are essential for the parasite in the promastigote stage. The null mutants for the *ABCF2* gene showed an EC₅₀ value that corresponded to half the EC₅₀ value of the wild-type strain, suggesting a possible involvement in the susceptibility to paromomycin due to the *ABCF2* protein. The results obtained in this study contribute to a better understanding of the role of *ABCFs* proteins in resistance and susceptibility to paromomycin, and the possible involvement in the biology of the parasite, such as *in vitro* infectivity in *Leishmania*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo de vida do protozoário parasita do gênero *Leishmania*.

Figura 2: Representação dos estágios de vida dos flebotomíneos.

Figura 3: Representação da estrutura geral de uma proteína ABC.

Figura 4: Identidade em escala *heatmap* entre as proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis* (La_ABCF1, La_ABCF2 e La_ABCF3) e as proteínas ABCFs de outros organismos.

Figura 5: Alinhamento parcial das proteínas ABCF de *L. (L.) amazonensis*, do fator de transcrição EF-3, GCN20, ARB1, NEW1 e HEF-3 de *S. cerevisiae* (Sc).

Figura 6: Alinhamento parcial das proteínas ABCF1 de *L. (L.) amazonensis* (La) e de seus ortólogos de *L. (V.) braziliensis* (Lb), *L. (L.) major* (Lmj), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) e *Homo sapiens* (Hs).

Figura 7: Alinhamento parcial das proteínas ABCF2 de *L. (L.) amazonensis* (La) e de seus ortólogos de *L. (V.) brazilienses* (Lb), *L. (L.) major* (Lmj), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) e de *Homo sapiens* (Hs).

Figura 8: Alinhamento parcial das proteínas ABCF3 de *L. (L.) amazonensis* (La) e de seus ortólogos em *L. (V.) brazilienses* (Lb), *L. (L.) major* (Lmj), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) e em *Homo sapiens* (Hs).

Figura 9: Representação esquemática da localização dos iniciadores e o tamanho aproximado dos fragmentos amplificados dos genes *DLDH*, *BCAT*, *ABCF1*, *ABCF2* e *ABCF3*.

Figura 10: (A) Representação esquemática dos sítios de restrição dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT* clonados no vetor pGEM-T *easy*. (B) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da digestão dos genes clonados no vetor pGEM-T *easy* com as enzimas de restrição indicadas em (A).

Figura 11. (A) Representação esquemática dos sítios de restrição dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT* clonados no vetor pSP72 α HYG α . Os genes e os sítios não estão em escala. (B) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da digestão dos genes clonados no vetor pSP72 α HYG α com as enzimas de restrição indicadas em (A).

Figura 12. Amplificação por PCR dos cassetes lineares contendo os genes de resistência à puromicina (*PURO*) (1,8 kb) e à blasticidina (*BLAST*) (1,7 kb) (A), para a síntese *in vivo* dos RNAs guias 5' e 3' a partir da enzima T7 RNA polimerase (0,1 kb) (B). (C) Representação esquemática do plasmídeo pT007 com a localização dos iniciadores internos do gene Cas9 (setas pretas) e (D) a confirmação da presença do gene da Cas9 por eletroforese em gel.

Figura 13: Geração da linhagem mutante para um dos alelos do gene *MT* em *L. amazonensis* (*La*-sKO-MT) utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9.

Figura 14: Suscetibilidade à MF das linhagens *La* (WT), *La-Cas9* e *La*-sKO-MT na forma promastigota.

Figura 15: Geração das linhagens mutantes para o gene *ABCF1* de *L. (L.) amazonensis*.

Figura 16: Geração das linhagens mutantes para o gene *ABCF2* de *L. (L.) amazonensis*.

Figura 17: Geração das linhagens mutantes para o gene *ABCF3* de *L. (L.) amazonensis*.

Figura 18: Curvas de crescimento das linhagens selvagem, superexpressoras e mutantes dos genes *ABCFs*.

Figura 19: Suscetibilidade à PAR na forma promastigota da linhagem selvagem [*La* (WT)] e das linhagens transfectantes superexpressoras dos genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*.

Figura 20: Suscetibilidade à PAR na forma promastigota da linhagem selvagem [*La* (WT)], *La*-Cas9 e das linhagens mutantes para os genes *ABCFs*.

Figura 21: Porcentagem de infecção e número de amastigotas por macrófago infectado da linhagem selvagem *La* (WT), da linhagem *La*-Cas9 e das linhagens mutantes para os genes *ABCF1* de *L. (L.) amazonensis* em 48h (A, B) e 72h (C, D).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos iniciadores para a clonagem dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT* em vetores de expressão, tamanho em pares de base (pb) do produto amplificado, enzima de PCR utilizada e a temperatura de associação de cada um dos genes.

Tabela 2. Lista de iniciadores utilizados para a geração de linhagens mutantes dos genes *ABCF* de *L. amazonensis* por CRISPR-Cas9.

Tabela 3. Suscetibilidade à MF na forma promastigota da linhagem *La* (WT), *La*-Cas9 e da linhagem mutante para o gene *MT*.

Tabela 4. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota da linhagem *La* (WT), *La*-pSP72 α HYG α e das linhagens transfectantes superexpressoras dos genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*.

Tabela 5. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9e mutante para os genes *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis*.

Tabela 6. Porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago infectado das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e mutantes para o gene *ABCF1* após 48 horas.

Tabela 7. Porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago infectado das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e mutantes para o gene *ABCF1* após 72h.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

RNase: Ribonuclease

EC₅₀: Concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

g: Aceleração da gravidade ($\cong 9,8 \text{ m/s}^2$)

g: Grama

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Kb: Quilobase

Kg: Quilograma

L: Litro

LB: Luria Bertani

LT: Leishmaniose tegumentar

LV: Leishmaniose visceral

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MTT: 3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NADPH: Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida

ng: Nanograma

PAR: Paromomicina

pb: Par de bases

PBS: Tampão fosfato salino

PCR: Reação em cadeia da polimerase

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA

tRNA: RNA transportador

U: Unidade

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µM: Micromolar

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactosídae

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Leishmanioses	16
1.2. Gênero <i>Leishmania</i>	17
1.2.1. Genética de <i>Leishmania</i> spp.	18
1.3. Ciclo biológico	18
1.4. Inseto vetor.....	20
1.5. Tratamento	21
1.5.1. Paromomicina.....	24
1.6. Proteínas ABC subfamília F.....	26
2. Justificativa	29
3. Objetivos	30
4. Material e Métodos	31
4.1. Cultivo do parasito.....	31
4.2. Fármacos	31
4.3. Extração de DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i>	31
4.4. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas ABCF de <i>L. (L.) amazonensis</i> e seus ortólogos em outros organismos	31
4.5. Amplificação por PCR e clonagem dos genes ABCF de <i>L. (L.) amazonensis</i>	32
4.6. Adição de adenina a extremidade 5' dos produtos amplificados.....	35
4.7. Clonagem dos produtos amplificados no vetor pGEM-T <i>easy</i> e transformação bacteriana	36
4.8. Transformação bacteriana do produto clonado no vetor pGEM-T <i>easy</i>	36
4.9. Subclonagem dos genes de interesse no vetor de expressão pSP72 α HYG α	37
4.10. Geração de linhagens mutantes dos genes ABCF de <i>L. (L.) amazonensis</i> utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9	38
4.11. Transfecção por eletroporação em <i>L. (L.) amazonensis</i>	41
4.12. Seleção de clones das linhagens mutantes para um dos alelos e mutantes nulos dos genes ABCFs	43
4.13. Avaliação do crescimento das linhagens transgênicas na forma promastigota <i>in vitro</i>	43
4.14. Avaliação da suscetibilidade à PAR em formas promastigotas e das linhagens transgênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	43

4.15.	Avaliação da infectividade das formas amastigotas intracelulares das linhagens transgênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
5.	Resultados	45
5.1.	Proteínas ABCF de <i>L. (L.) amazonensis</i>	45
5.2.	Amplificação e clonagem dos genes <i>ABCFs</i> e dos genes <i>DLDH</i> e <i>BCAT</i> no vetor pGEM-T <i>easy</i>	52
5.3.	Geração de mutantes nulos dos genes <i>ABCFs</i> utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9 em <i>L. (L.) amazonensis</i>	55
5.4.	Crescimento <i>in vitro</i> de promastigotas das linhagens selvagem, superexpressoras e mutantes dos genes <i>ABCFs</i>	64
5.5.	Avaliação da suscetibilidade à PAR das linhagens transfectadas e superexpressoras dos genes <i>ABCFs</i> , <i>DLDH</i> e <i>BCAT</i>	66
5.6.	Avaliação da suscetibilidade à PAR das linhagens selvagem e mutantes para os genes <i>ABCFs</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
5.7.	Infectividade e crescimento <i>in vitro</i> de amastigotas intracelulares das linhagens La (WT), La-Cas9 e mutantes dos genes <i>ABCFs</i>	69
6.	Discussão	71
7.	Conclusão	76
8.	Referências	77
9.	Anexos	85
9.1.	Certificado de aprovação de uso de Organismos Geneticamente Modificados pela CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio.....	85
9.2.	Certificado de aprovação de uso de animais pela CEUA/UNICAMP	86
9.3.	Declaração de Direitos Autorais	87

1. Introdução

1.1. Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença parasitária com ampla distribuição geográfica no Brasil e no mundo, ocorrendo principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Esta parasitose é causada por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania*, que são transmitidos através da picada de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos, infectados com o parasito (Burza, Croft et al. 2018). Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* capazes de causar doença no homem e que se dividem em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Pace 2014). A transmissão das leishmanioses se dá por insetos flebotomíneos que pertencem ao gênero *Phlebotomus* na África, Ásia e Europa e aos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* nas Américas (Ready 2013). No Brasil, os flebotomíneos são conhecidos popularmente como mosquito-palha, birigui, tatuíra, dentre outros, dependendo da região (Uliana 2012). Os adultos voam pequenas distâncias, sendo mais ativos no começo e no fim do dia. Apenas as fêmeas transmitem a leishmaniose, já que apenas elas se alimentam de sangue do hospedeiro mamífero (Ready 2013, Pace 2014).

As leishmanioses são endêmicas em 98 países, com cerca de 350 milhões de pessoas sob risco de adquirir a doença e um número médio de 1,3 milhão de novos casos por ano (Alvar, Velez et al. 2012, Burza, Croft et al. 2018). A doença pode adotar várias formas no homem que vão desde lesões cutâneas e mucocutâneas até uma forma visceral severa que afeta órgãos como fígado, baço e medula óssea (Pace 2014). Existem basicamente duas formas clínicas de leishmaniose: a visceral e a tegumentar. Esta última pode se apresentar em quatro formas distintas: cutânea localizada, cutânea disseminada, mucocutânea ou cutânea difusa (Reithinger, Dujardin et al. 2007). A ocorrência de leishmaniose tegumentar no Brasil tem se expandido geográfica e numericamente, com um aumento do número de casos em áreas urbanas e periurbanas (Oliveira, Lacerda et al. 2004). No Brasil, *L. (Viannia) braziliensis* é a espécie de maior prevalência com ampla distribuição geográfica no território nacional. Esta espécie está relacionada a quadros clínicos cutâneos localizados, à leishmaniose disseminada e à forma mucosa que infecta e destrói os tecidos da mucosa nasofaríngea em até 10% dos pacientes (Reithinger, Dujardin et al. 2007). Embora em menor frequência, também ocorrem infecções por *L. (L.) amazonensis*, associada a quadros de leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa, esta última refratária aos tratamentos disponíveis até o momento, além de *L. (V.) guyanensis* associada a quadros cutâneos

localizados de difícil tratamento. Estudos recentes têm reportado também um aumento do número de casos de infecção por outras espécies do parasito, como *L. (V.) naiffi* na região Amazônica, cujas infecções cutâneas não apresentam cura espontânea e a resposta ao tratamento nem sempre é satisfatória (Fagundes-Silva, Romero et al. 2015).

1.2. Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania*, constituído por protozoários tripanossomatídeos pertencentes à ordem Kinetoplastida, abrange mais de 20 espécies que causam doença em humanos (Uliana 2012). *Leishmania* spp. são classificadas em dois subgêneros com base nas diferenças nos locais de desenvolvimento do parasita no intestino do flebotomíneo: *Leishmania*, no intestino médio e anterior ou *Viannia* no intestino posterior e mais posteriormente ocorre a migração dos parasitas para o intestino médio e anterior (Lainson and Shaw 1987). Espécies do subgênero *Leishmania* são encontradas na América, Europa, Ásia e África, e as espécies do subgênero *Viannia*, são endêmicas apenas nas Américas (Pace 2014).

Esses protozoários, assim como os outros tripanossomatídeos, possuem um único flagelo, possuem organelas que são comuns a outras células eucarióticas e também outras organelas que são restritas a esse grupo. As organelas exclusivas desse grupo são: acidocalcissomos, glicossomos e cinetoplasto (kDNA) (Uliana 2012). Os glicossomos, são peroxissomos especializados, contêm seis enzimas envolvidas na parte inicial da via glicolítica e duas enzimas do metabolismo do glicerol (Oppendoes and Michels 1993). Também estão envolvidos na gliconeogênese, produção de NADPH por meio das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase, na recuperação de purina e metabolismo de fosfato (Maslov, Oppendoes et al. 2019). Os acidocalcissomos servem como reservatório primário de cálcio (Ca^{2+}), também são ricos em fosfato na forma de ortofosfato (Pi), pirofosfato (PPi) e polifosfato (poliP). Também desempenham um papel na autofagia, resposta a mudanças no pH e na osmorregulação do parasito (Docampo and Huang 2016, Maslov, Oppendoes et al. 2019).

Além do DNA genômico, estes protozoários também possuem o DNA mitocondrial ou cinetoplasto que contém uma grande quantidade de DNA extracelular, organizado em duas classes de DNAs circulares: os minicírculos e os maxicírculos (Maslov, Oppendoes et al. 2019).

1.2.1. Genética de *Leishmania* spp.

Os genomas de *Leishmania* spp. possuem de 34 a 36 pares de cromossomos lineares, dependendo da espécie (Real, Vidal et al. 2013, Maslov, Oppendoes et al. 2019). Os genes não possuem íntrons e nem promotores e a transcrição dos genes ocorre de forma policistrônica, assim como em outros tripanossomatídeos. Dessa forma, os genes de uma mesma fita de DNA são transcritos de uma só vez até que haja uma mudança de orientação dos genes (Maslov, Oppendoes et al. 2019). Os longos transcritos são processados por *trans-splicing* e poliadenilação, processo conjugado que irá processar o RNA mensageiro (RNAm) maduro (Michaeli 2011, Clayton 2019, Maslov, Oppendoes et al. 2019). Este processamento dos RNAs é realizado pelo spliciossomo que adicionará de forma simultânea uma sequência chamada de sequência líder na região 5' e uma cauda de poliadenina (poli-A) na porção 3' do transcrito (Clayton 2019). Após a maturação, os mesmos são transportados para o citoplasma para serem traduzidos. Os RNAm que não possuem a estabilidade necessária, são transportados para o núcleo para serem degradados (Clayton 2016).

1.3. Ciclo biológico

As espécies de *Leishmania* spp. possuem um ciclo biológico heteroxênico no qual apresentam duas formas distintas: promastigota e amastigota. As formas promastigotas possuem corpo celular fusiforme e um único flagelo e são encontradas no tubo digestório de insetos flebotomíneos. As formas amastigotas são encontradas no interior de um fagolisossomo das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos do hospedeiro mamífero. Na forma amastigota, as leishmânias são intracelulares obrigatórias, com corpo celular esférico ou ovóide e que não possuem motilidade (Uliana 2012).

No tubo digestório do hospedeiro invertebrado, os promastigotas se multiplicam por divisão binária, utilizando nutrientes do conteúdo intestinal do inseto, onde são ancorados por moléculas de lipofosfoglicanos (LPG). Estes se diferenciam na forma promastigota metacíclica que é infectante para o hospedeiro mamífero, migram para região anterior do tubo digestório do inseto (Fig. 1), onde secretam uma substância gelatinosa denominada “*promastigote secretory gel*”. Esta substância gera um bloqueio no tubo digestório dos flebotomíneos infectados e os força a regurgitar os parasitas durante o repasto sanguíneo do inseto (Bates 2018). Os promastigotas metacíclicos ao entrar no organismo do hospedeiro mamífero são fagocitados pelas células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente por neutrófilos e macrófagos (Fig. 1). Estas células internalizam os parasitos quando os

receptores de reconhecimento de padrões do hospedeiro (PRRs) reconhecem os componentes conservados da *Leishmania*, chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Batista, Nájera et al. 2020). Além desta forma de entrar na célula hospedeira, os parasitos da espécie *L. (L.) amazonensis* também são capazes de entrar em células não fagocíticas, como fibroblastos, através de mecanismos dependente de Ca^{2+} (Cavalcante-Costa, Costa-Reginaldo et al. 2019, Batista, Nájera et al. 2020).

Após a fagocitose, o parasito é abrigado em vacúolos, chamado de “vacúolos parasitóforos” ou fagossomo, uma etapa preliminar essencial no desenvolvimento intracelular destes parasitas. Os vacúolos parasitóforos atuam como filtros para nutrientes em detrimento dos fatores de resposta imune da célula hospedeira, criando um nicho para a diferenciação e/ou multiplicação do parasita (Batista, Nájera et al. 2020). Os macrófagos recrutam lisossomas e estes se fundem ao vacúolo parasitóforo, liberando substâncias ácidas ricas em proteínas proteolíticas. O pH ácido e a mudança de temperatura para 37°C , funcionam como sinalização para que os promastigotas se diferenciem em amastigotas, que irão se multiplicar até o rompimento da membrana macrófago, liberando-as e infectando novas células (Batista, Nájera et al. 2020) (Fig. 1). O flebotomíneo fêmea ao realizar um repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingere as células hospedeiras contendo as formas amastigotas que são infectivas para o vetor. Os amastigotas são liberados no tudo digestório do inseto e se diferenciam em promastigotas, dando continuidade ao ciclo biológico (Fig. 1).

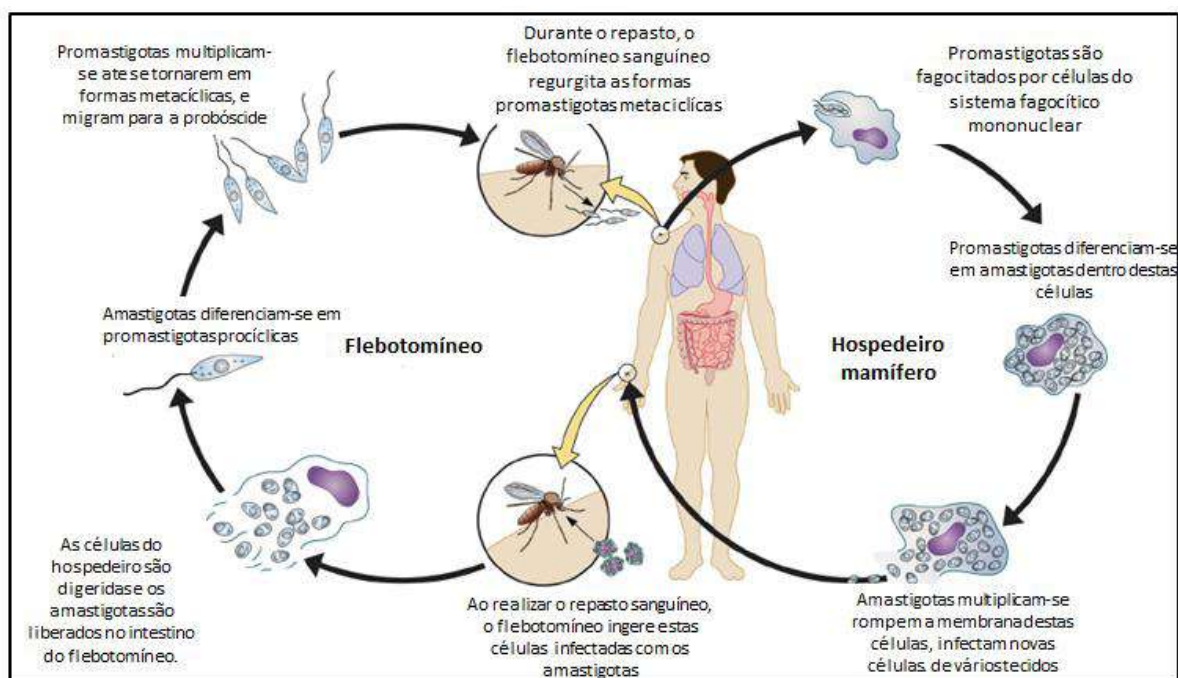


Figura 1. Esquematização do ciclo biológico de *Leishmania* spp.. Fonte: Esch e Petersen (2013) (modificado).

1.4. Inseto vetor

Os flebotomíneos são dipteros da família *Psychodidae* e pertencentes à subfamília *Phlebotominae*. Estes insetos são holometábolos, ou seja, seu ciclo de vida passa pelo estágio de ovo, larva, pupa e adulto (Fig. 2). São insetos pequenos, com corpo recoberto por inúmeras cerdas e coloração castanho escuro (Killick-Kendrick 1999). As larvas destes insetos se alimentam de material orgânico presente no solo e os adultos vivem em abrigos úmidos e escuros e se alimentam de fontes naturais de açúcar (Killick-Kendrick 1999, Uliana 2012). Apenas as fêmeas adultas são hematófagas, o sangue é necessário para o desenvolvimento dos seus ovos, e são consideradas o principal vetor natural do protozoário *Leishmania* (Ready 2013). Alguns flebotomíneos se alimentam do sangue de vários hospedeiros, incluindo canídeos, roedores e marsupiais, enquanto outros se alimentam principalmente de sangue humano (Steverding 2017).

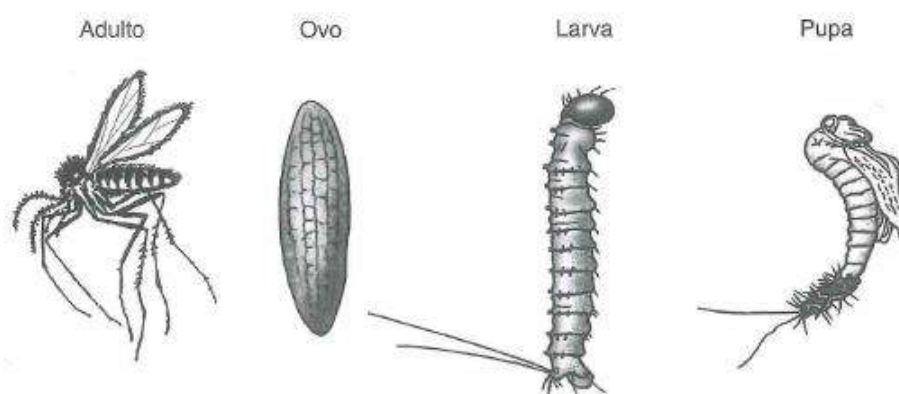


Figura 2. Representação dos estágios de vida dos flebotomíneos. Fonte: Uliana (2012).

Os flebotomíneos estão presentes principalmente em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália, sudeste da Europa e nas Américas (Killick-Kendrick 1999). De aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos, aproximadamente 70 foram implicadas na transmissão da leishmaniose (Ready 2013). Estas espécies pertencem ao gênero *Phlebotomus*, encontrado na Ásia, Europa e África e aos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* nas Américas (Uliana 2012). No Brasil, cerca de 20 espécies de flebotomíneos são responsáveis pela transmissão das principais espécies endêmicas de *Leishmania* spp. A maioria dos flebotomíneos são apenas espécies taxonômicas, distintas de parentes próximos por ligeiras diferenças morfológicas que podem não estar associadas nem ao isolamento reprodutivo nem a características fenotípicas, como resistência a inseticidas ou suscetibilidade à infecção por *Leishmania* (Ready 2013). Em 2009, foi descrito que há troca de material

genético entre os parasitas *Leishmania* no flebotomíneo (Akopyants, Kimblin et al. 2009), indicando que o vetor pode ser considerado como hospedeiro definitivo deste protozoário (Ready 2013).

1.5. Tratamento

Os tratamentos disponíveis para leishmaniose são poucos e sua maioria é utilizada há algum tempo. Estes tratamentos possuem alta toxicidade, variações nas eficácias, dificuldade na adesão ao tratamento devido aos fármacos administrados por via parenteral, custos financeiros altos, relato de resistência emergente aos medicamentos e falta de acesso em áreas regionais (Zulfiqar, Shelper et al. 2017). A variação na eficácia de alguns fármacos depende da espécie, das formas clínicas e das regiões geográficas do parasito (Zulfiqar, Shelper et al. 2017). O tratamento das leishmanioses no Brasil consiste na utilização de antimoniais pentavalentes (Pentostam® e Glucantime®), a anfotericina B e a pentamidina, que possuem diversos efeitos colaterais e são tóxicos além do custo e da administração parenteral (Uliana, Trinconi et al. 2018).

A emergência de resistência clínica aos antimoniais pentavalentes agravou o problema do tratamento da leishmaniose (Croft, Sundar et al. 2006). Os antimoniais pentavalentes foram e ainda são o fármaco de primeira opção para o tratamento da leishmaniose visceral em algumas regiões do mundo (Uliana, Trinconi et al. 2018). Porém, desde a década dos anos 80, foi notado o aumento do número de tratamentos com falha terapêutica na Índia e também o aumento das doses para que o fármaco tivesse o efeito esperado (Thakur 1984, Uliana, Trinconi et al. 2018). No Brasil, os antimoniais são ainda a primeira linha de tratamento tanto para a leishmaniose tegumentar quanto para a visceral. Em ambos os casos, a resposta clínica é altamente variável chegando a taxas de cura de cerca de 50% em infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, por exemplo (Machado, Ampuero et al. 2010, Chrusciak-Talhari, Dietze et al. 2011). No distrito de Bihar na Índia, as doses de antimoniais utilizadas para o tratamento aumentaram significativamente nos últimos 50 anos e as taxas de cura não atingem mais do que 50% dos pacientes tratados (Sundar 2001, Sundar, Pai et al. 2001). Este fármaco apresenta alta toxicidade, especialmente cardiotoxicidade na forma de arritmias cardíacas, taquicardia ventricular, entre outros (Chakravarty and Sundar 2019).

Atualmente, as recomendações da Organização Mundial de Saúde sugerem a utilização dos antimoniais como segunda escolha para o tratamento da leishmaniose visceral em áreas endêmicas, e a anfotericina B como fármaco de primeira opção para o tratamento da

doença (Uliana, Trinconi et al. 2018). Porém, em muitas regiões endêmicas, a primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral continua sendo os antimônias. Para o tratamento da leishmaniose cutânea endêmica nas Américas, também é a primeira opção de tratamento, apesar de possuir uma grande variedade em sua eficácia (Chakravarty and Sundar 2019).

Além de ser utilizada em casos de não resposta ao tratamento pelos antimonias, a anfotericina B vem sendo utilizada em casos de coinfeção pelo vírus HIV. É esperado, no entanto, o aparecimento de casos de resistência também a este fármaco, devido a sua maior utilização, além da sua elevada meia-vida no plasma sanguíneo o que aumenta a possibilidade de seleção de parasitos resistentes (Uliana, Trinconi et al. 2018). Este medicamento possui a formulação anfotericina desoxicolato, que é administrada via venosa e requer internação dos pacientes e que possui alta toxicidade para os rins e um custo financeiro alto (Uliana, Trinconi et al. 2018, Chakravarty and Sundar 2019). A forma lipossomal, na qual o desoxicolato é substituído por outros lipídeos, possui eficácia similar à formulação anterior, porém é muito menos tóxica (Uliana, Trinconi et al. 2018). A absorção é rápida e o fármaco fica concentrado no sistema mononuclear fagocitário (Chakravarty and Sundar 2019). A forma lipossomal da anfotericina B, administrada em dose única tem sido considerada a droga recomendada juntamente com a miltefosina (MF) na quimioterapia da leishmaniose visceral na Índia, ambas com resultados bastante satisfatórios (Sundar and Chakravarty 2013).

A pentamidina é utilizada com menor frequência já que apresenta toxicidade ainda maior do que aquela relatada para os antimonias pentavalentes. Este fármaco era utilizado para o tratamento de leishmaniose visceral na Índia no início dos anos 1940 (Bray, Barrett et al. 2003). A alta frequência de efeitos tóxicos, como por exemplo, cardiotoxicidade e distúrbios metabólicos, tornou a pentamidina uma opção menos utilizada até o surgimento de resistência aos antimonias. Porém, não mostrou uma boa eficácia devido ao grande número de recidivas (Jha, Singh et al. 1991), sugerindo que a resistência clínica à pentamidina poderia ser facilmente selecionada (Uliana, Trinconi et al. 2018). Sua utilização no Brasil restringe-se essencialmente a casos de leishmaniose tegumentar refratários aos fármacos mencionados previamente. Em estudo recente, no entanto, foi demonstrada sua eficácia contra a leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*, com taxas de cura maiores que 80% quando os pacientes eram tratados com duas ou três doses de pentamidina (Gadelha, Ramasawmy et al. 2018).

Duas drogas alternativas vêm sendo utilizadas principalmente no sudeste Asiático: a MF e a paromomicina (PAR). Nessa região os pacientes já não respondem aos antimoniais pentavalentes, o principal fármaco ainda utilizado no tratamento das leishmanioses no Brasil. A MF é um análogo de fosfatidilcolina desenvolvida inicialmente como composto antitumoral (Jha, Sundar et al. 1999, Sundar, Jha et al. 2006). Este fármaco de administração oral interfere na biossíntese e no metabolismo de fosfolipídios (Jha, Sundar et al. 1999, Lux, Heise et al. 2000, Rakotomanga, Saint-Pierre-Chazalet et al. 2005, Sundar, Jha et al. 2006). O acúmulo intracelular da MF em *Leishmania* se dá pelo transportador de MF que é responsável pela entrada do fármaco através da membrana plasmática do parasito (Jha, Sundar et al. 1999, Lux, Heise et al. 2000, Perez-Victoria, Castanys et al. 2003, Perez-Victoria, Gamarro et al. 2003, Rakotomanga, Saint-Pierre-Chazalet et al. 2005, Sundar, Jha et al. 2006, Coelho, Boisvert et al. 2012, Coelho, Trinconi et al. 2014). As desvantagens deste fármaco são seu potencial teratogênico e a meia-vida longa que pode levar à seleção de linhagens resistentes (Dorlo, van Thiel et al. 2008, Uliana, Trinconi et al. 2018).

Devido a elevada incidência de casos de resistência aos antimoniais na Índia, a MF é considerada o medicamento de escolha no tratamento da leishmaniose visceral. A MF por alguns anos foi utilizada como primeira escolha de tratamento para leishmaniose visceral na Índia, mas atualmente é utilizada como segunda opção ou em combinação com outros fármacos devido ao aparecimento de casos de recaída (Uliana, Trinconi et al. 2018). No Brasil, apenas dois estudos clínicos utilizando a MF foram realizados. Estes estudos demonstraram uma eficácia de cerca de 70% para infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* em pacientes com leishmaniose cutânea, ambos com eficácia superior quando comparados com o tratamento utilizando o antimonial pentavalente (Machado, Ampuero et al. 2010, Chrusciak-Talhari, Dietze et al. 2011).

A terapia combinada vem sendo utilizada devido ao contínuo surgimento de resistência, sua utilização previne que os parasitos adquiram resistência, contribui para uma melhor eficácia do tratamento e redução tanto dos efeitos colaterais, quanto da duração do tratamento (Zulfiqar, Shelper et al. 2017). Neste tipo de terapia, são utilizados um fármaco com uma meia vida curta e o segundo fármaco com uma meia vida maior para matar os parasitas que ainda restam no organismo (Musa, Khalil et al. 2012, Zulfiqar, Shelper et al. 2017). Uma das combinações utilizadas é o estibogluconato de sódio com a PAR, que vem sendo implementada nos países do leste da África (Musa, Khalil et al. 2012, Zulfiqar, Shelper et al. 2017). Outra combinação é a MF com a Anfotericina B lipossomal, que tem apresentado

alta eficácia no estado Bihar, na Índia. Porém a taxa de cura geral não é estatisticamente significativa, esta combinação não afeta muito a eficácia do tratamento (Sundar, Rai et al. 2008, Zulfiqar, Shelper et al. 2017). Um estudo de fase III realizado com combinações de Anfotericina B lipossomal, MF e PAR, mostrou uma eficácia de 97%. Porém, o tratamento de preferência ainda é a opção de Anfotericina B lipossomal com MF (Sundar, Sinha et al. 2011, Zulfiqar, Shelper et al. 2017).

1.5.1. Paromomicina

A PAR é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro que já foi demonstrado como um agente oral efetivo para um grande número de agentes infecciosos, desde bactérias a protozoários intestinais (Davidson, den Boer et al. 2009). Embora ainda não tenha sido aprovado para tratamento em humanos no Brasil, a PAR tem apresentado resultados promissores para o tratamento da leishmaniose visceral no sudeste Asiático. Casos de resistência clínica não foram descritos até o momento, o que demonstra o seu potencial de utilização no tratamento da doença (Croft, Sundar et al. 2006). Além disso, foi demonstrado que isolados clínicos de pacientes resistentes aos antimoniais de *L. (L.) donovani* são uniformemente suscetíveis à PAR (Kulshrestha, Singh et al. 2011), o que indica o potencial promissor deste fármaco na quimioterapia da leishmaniose.

Quanto ao mecanismo de ação em *Leishmania*, a PAR inibe a síntese proteica mitocondrial e citoplasmática (Fernandez, Malchiodi et al. 2011). Mutações têm sido observadas na subunidade menor do DNA ribossomal em microrganismos resistentes à PAR, mas não em parasitos do gênero *Leishmania* selecionados *in vitro*, sugerindo que os mecanismos associados à resistência não são os mesmos (Fong, Chan et al. 1994). Em linhagens resistentes de *L. (L.) donovani* selecionadas *in vitro* foi observado uma redução no acúmulo de PAR intracelular, além do aumento de vacúolos vesiculares no corpo celular de promastigotas (Jhingran, Chawla et al. 2009, Chawla, Jhingran et al. 2011, Bhandari, Sundar et al. 2014). Foi observado ainda através da análise comparativa do proteoma de uma linhagem resistente com a linhagem selvagem de *L. (L.) donovani* um aumento dos níveis de proteínas ribossomais na linhagem resistente, indicando que a tradução proteica é um importante alvo da PAR (Chawla, Jhingran et al. 2011). Em um estudo recente foi demonstrado que a inibição do crescimento do parasito pela PAR se dá pela inibição da tradução do ribossomo citoplasmático, sugerindo esta estrutura como o principal alvo deste fármaco (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017). Neste estudo, foi obtido a estrutura e a interação em resolução atômica do sítio ativo ribossomal com a PAR. Demonstrou-se ainda que a

interação ocorre no sítio de decodificação, responsável pelo monitoramento da complementariedade do RNAt e o RNAm na tradução proteica (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017).

Recentemente, dois genes foram descritos como associados aos mecanismos de resistência à PAR em *L. (L.) donovani*, D-LDH (D-lactato desidrogenase) e BCAT (aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada) (Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018). Estes genes foram encontrados amplificados e superexpressos em uma linhagem resistente à PAR de *L. (L.) donovani* selecionada *in vitro* (Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018). Foi identificado ainda, dois *loci* de *L. (L.) infantum* utilizando um método de clonagem funcional combinada com o sequenciamento de nova geração de cosmídeos, denominada “Cos-Seq”. Nesta abordagem, parasitos selvagens superexpressores de bibliotecas genômicas são selecionados em presença de fármacos para a identificação de alvos de drogas e/ou genes relacionados com a resistência, utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração (Gazanion, Fernandez-Prada et al. 2016). Através desta metodologia de triagem em larga escala, dois cosmídeos contendo porções dos cromossomos 6 e 36 conferiam resistência à PAR. No cosmídeo LinJ.06b, o gene *LinJ.06.1010*, que codifica uma proteína hipotética com domínio repetido rico em leucina, é responsável pelo fenótipo de resistência à PAR (Gazanion, Fernandez-Prada et al. 2016).

Em outro estudo recente, foram identificados potenciais genes envolvidos na resistência à MF e à PAR em *L. (L.) infantum*, utilizando metodologia que emprega o tratamento dos parasitos com agentes mutagênicos para indução de mutações, seguido por um protocolo de seleção em presença desses fármacos. A seguir, os parasitos resistentes selecionados tiveram o seu genoma completo sequenciado, utilizando tecnologia de sequenciamento de larga escala para identificação dos potenciais genes envolvidos na resistência a esses fármacos (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Dentre os genes envolvidos na resistência à PAR, foi identificado o gene *LinJ.33.1810* que codifica uma proteína quinase dependente de cálcio, chamada CDPK1 (proteína quinase dependente de cálcio). A CDPK1 interage com várias proteínas envolvidas no processo de tradução, além de proteínas ribossomais, dentre elas a L28 e L23. Quando há mutação homozigótica ou inativação de um dos alelos de CDPK1, há o aumento da tradução proteica do parasito (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019), fenômeno também observado em uma linhagem de *L. (L.) donovani* resistente à PAR (Chawla, Jhingran et al. 2011).

Um estudo realizado pelo nosso grupo, mostrou diferença de suscetibilidade à PAR *in vitro* e *in vivo* entre um isolado clínico de *L. (L.) amazonensis*, que nunca havia sido exposto ao fármaco, e uma linhagem referência desta espécie (Coser, Ferreira et al. 2020). O isolado clínico mostrou uma alta sensibilidade à PAR nos experimentos *in vitro* em promastigotas e amastigotas quando comparado com a linhagem referência. Os animais infectados com este isolado e tratados com PAR, interessantemente, responderam melhor ao tratamento do que os animais infectados com a linhagem referência, indicando que a eficácia do tratamento da PAR *in vivo* pode ser correlacionada com a atividade *in vitro* deste fármaco (Coser, Ferreira et al. 2020). Além disso, a análise da suscetibilidade *in vitro* de um painel de isolados clínicos de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* mostrou variação significativa de sensibilidade, sugerindo que pode haver variação na resposta clínica a este medicamento no tratamento da leishmaniose tegumentar no Brasil (Coser, Ferreira et al. 2021).

1.6. Proteínas ABC subfamília F

As proteínas ABC constituem a maior família de transportadores de membrana, encontradas em todos os seres vivos e são responsáveis pelo transporte de uma grande diversidade de moléculas em eucariotos (Higgins 1992, Coelho and Cotrim 2018). A estrutura geral dessas proteínas é constituída por duas porções, sendo cada uma delas formada por uma região transmembrana e um domínio de ligação de ATP (Fig. 3) (Higgins 1992, Gottesman and Pastan 1993). Essas proteínas podem ainda estar envolvidas em processos biológicos não relacionados ao transporte, não apresentando as regiões transmembrana e tendo funções como reparo de DNA, tradução e expressão gênica (Coelho and Cotrim 2018). A diversidade da família ABC em *Leishmania* foi revelada pelo sequenciamento do genoma das várias espécies do parasito que contêm membros de todas as subfamílias das proteínas ABC (subfamílias ABCA a ABCH) (Ivens, Peacock et al. 2005, Leprohon, Legare et al. 2006, Peacock, Seeger et al. 2007). Apesar da grande diversidade de subfamílias, a maior parte das funções descritas para as proteínas ABC em *Leishmania* são restritas a resistência a drogas e ao tráfico de fosfolipídios, sendo pertencentes principalmente às famílias ABCA, ABCB, ABCC e ABCG (Ouellette, Fase-Fowler et al. 1990, Callahan and Beverley 1991, Coelho, Beverley et al. 2003, Araujo-Santos, Parodi-Talice et al. 2005, El Fadili, Messier et al. 2005, Coelho and Cotrim 2018).

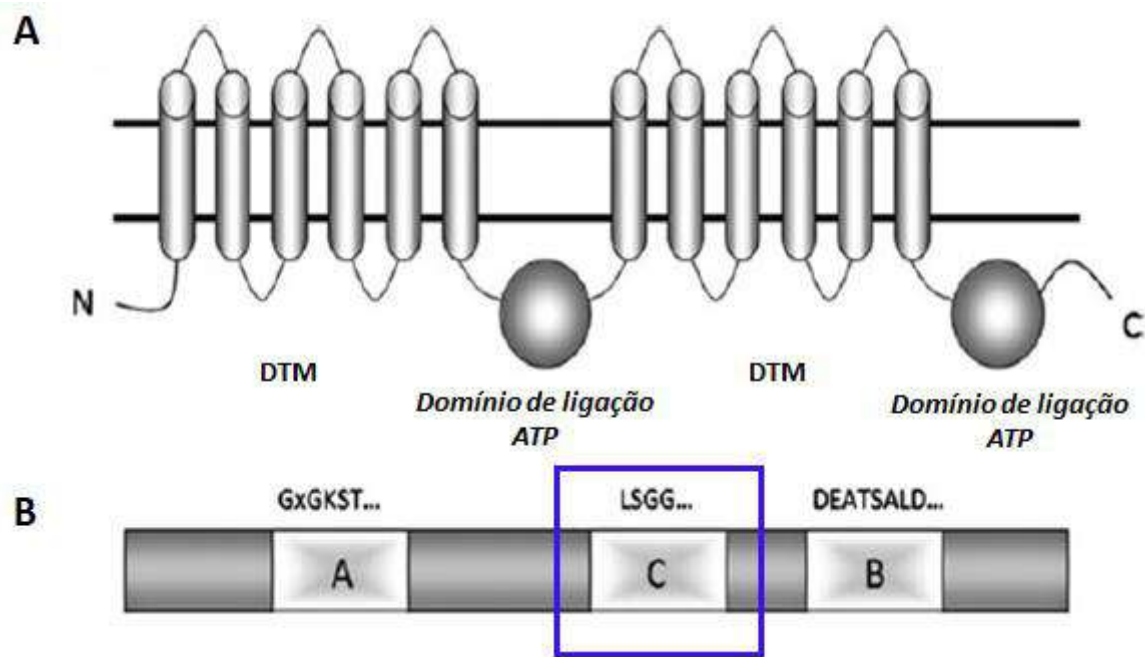


Figura 3. Representação da estrutura geral de uma proteína ABC. A estrutura é composta por duas porções, cada uma contendo uma região transmembrana (DTM) e um domínio de ligação ATP (A). O domínio de ligação ATP é constituído pelos motivos “walker” A e B e a assinatura C da proteína, destacada em azul (B). Fonte: Coelho e Cotrim (2018)(modificado).

No fungo *Saccharomyces cerevisiae*, a elevação dos níveis proteicos do fator de alongação de tradução EF-3, aumenta a sensibilidade aos aminoglicosídeos PAR e higromicina (Sandbaken, Lupisella et al. 1990). Este fator de alongação é único em fungos, sem um análogo funcional em procariotos e eucariotos (Belfield and Tuite 1993), embora apresente similaridade de aminoácidos com membros da subfamília F de proteínas ABC (*ATP Binding Cassette*). A subfamília ABCF é composta por proteínas que contêm dois domínios de ligação de ATP, mas não possui domínios transmembrana. Estas proteínas estão envolvidas no controle da tradução do RNAm, sendo altamente conservada nos mais diversos grupos de seres vivos (Coelho and Cotrim 2018). Outra proteína deste organismo que possui similaridade com as proteínas ABCF de *Leishmania* spp. e com a EF-3, é a proteína GCN20. Esta proteína está envolvida na ativação da tradução em condições de falta de aminoácidos (Bates and Tetley 1993, Vazquez de Aldana, Marton et al. 1995, Marton, Vazquez de Aldana et al. 1997).

No genoma de *Leishmania* spp., existem três genes que codificam membros desta subfamília (Leprohon, Legare et al. 2006) e em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína EF-3 possui cerca de 15% de identidade com a proteína ABCF1 de *Leishmania mexicana* (dados não mostrados). Além da proteína EF-3, a proteína GCN20, uma proteína ABC (Vazquez de

Aldana, Marton et al. 1995), apresenta identidade de cerca de 30% com a proteína ABCF1 de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* (dados não mostrados). O ortólogo humano, ABCF1 associa-se com o ribossomo e é responsável pela ativação do fator de iniciação de tradução em eucariotos (eIF2), componente essencial para o controle do início da tradução (Tyzack, Wang et al. 2000). Já em procariotos, as proteínas ABCF já foram implicadas na resistência aos macrolídeos, grupo de antibióticos inibidores da síntese proteica (Kerr 2004). Recentemente, foi demonstrado que as proteínas ABCF de procariotos protegem o ribossomo bacteriano da ação de antibióticos através do deslocamento destes do ribossomo (Sharkey, Edwards et al. 2016). Estes achados sugerem que os membros dessa subfamília de proteínas ABC podem eventualmente afetar a suscetibilidade à PAR em *Leishmania*.

2. Justificativa

A PAR é um fármaco potencial para o uso no tratamento da leishmaniose tegumentar. Além de apresentar boa eficácia clínica no tratamento da leishmaniose visceral, é um fármaco de baixo custo e o seu período de tratamento é curto, o que diminui as chances dos parasitos se tornarem resistentes. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de ação e resistência à PAR em *Leishmania*. A investigação de um possível papel das proteínas ABCF poderão auxiliar na elucidação destes mecanismos. Além disso, estudos destas proteínas em outros organismos indicam participação no processo de tradução proteica. As linhagens transgênicas geradas nesse estudo poderão ainda ser úteis para investigar se a inativação gênica e/ou a superexpressão dessas proteínas, podem interferir em outros aspectos da biologia do parasito como por exemplo, crescimento *in vitro* e *in vivo* e infectividade, podendo contribuir na elucidação da função dessa subfamília de proteínas em *Leishmania*.

3. Objetivos

O objetivo deste projeto foi investigar funcionalmente os membros da subfamília ABCF na suscetibilidade e na resistência à PAR, utilizando técnicas de manipulação genética em *L. (L.) amazonensis*, e se estes podem interferir em outros aspectos do parasito como por exemplo, crescimento *in vitro* e infectividade. Os objetivos específicos foram:

3.1. Clonar os genes *ABCF1* e *ABCF3* em vetor de expressão circulares e transfectá-los em *L. (L.) amazonensis*;

3.2. Inativar os genes *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis* e gerar mutantes nulos destes genes nesta espécie do parasito;

3.3. Investigar a suscetibilidade à PAR *in vitro* da cepa selvagem, das linhagens superexpressoras e dos mutantes nulos dos respectivos genes *ABCF* em *L. (L.) amazonensis*;

3.4. Investigar se a inativação gênica ou superexpressão dessas proteínas, podem interferir no crescimento *in vitro*;

3.5. Investigar se a inativação gênica do gene *ABCF1* pode afetar a infectividade do parasito *in vitro*.

4. Material e Métodos

4.1. Cultivo do parasito

Promastigotas *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) foram cultivados em meio M199 (Sigma-Aldrich) diluído em água Milli-Q, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 40 mM HEPES (pH 7,4), 0,1 mM adenina, 0,005% hemina, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Kapler, Coburn et al. 1990). O meio era esterilizado por filtração e as culturas eram mantidas em estufa a 25°C.

4.2. Fármacos

Todos os fármacos utilizados foram diluídos em água Milli-Q e filtrados em filtro de 0,22 µm. As concentrações estoque dos fármacos utilizados foram: 100 mM de PAR e 10 mM de MF (Sigma-Aldrich). Os antibióticos utilizados foram higromicina B (HYG) (50 mg/mL); blasticidina (BLA) (5mg/mL); puromicina (PUR) (20 mg/mL) (Thermo Fischer Scientific).

4.3. Extração de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*

Utilizou-se cerca de 10 mL de cultura contendo promastigotas em fase logarítmica de crescimento para a extração do DNA genômico. A cultura foi centrifugada por 10 minutos à 850 x g e, a seguir, o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com 5 mL de PBS e novamente centrifugadas por 10 minutos à 850 x g. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 500 µL de DNAzol (Thermo Fisher Scientific) para lisar os parasitos e 500 µL de etanol 99%, homogeneizando por inversão de 3 a 5 vezes. Em seguida, o DNA genômico foi recuperado utilizando uma alça de fio de plástico, este então foi lavado 2 vezes com etanol 70%, mergulhando a alça de fio de plástico que contém o DNA genômico em tubos contendo a solução. Posteriormente, o DNA foi seco em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos, sendo então solubilizado em água Milli-Q.

4.4. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas ABCF de *L. (L.) amazonensis* e seus ortólogos em outros organismos

Para o alinhamento das proteínas ABCFs, as respectivas sequências foram obtidas no banco de dados de genomas de tripanossomatídeos (TriTrypDB) (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (Aslett, Aurrecochea et al. 2010). As sequências das proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis* e de seus ortólogos em *S. cerevisiae*, *L. (V.)*

braziliensis, *L. (L.) major*, *T. brucei*, *T. cruzi* e *Homo sapiens* foram alinhadas, utilizando o ClustalW e então foram editadas com o programa GeneDoc 2.6 (Nicholas, Nicholas et al. 1997). Os respectivos domínios das proteínas ABCFs foram determinados com base na plataforma de banco de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

4.5. Amplificação por PCR e clonagem dos genes *ABCF* de *L. (L.) amazonensis*

Para amplificação dos genes ABCF de *L. (L.) amazonensis*, as sequências dos genes *ABCF1* (LAMA_000042000.1), *ABCF2* (LAMA_000297600.1) e *ABCF3* (LAMA_000698500.1), disponíveis no banco de dados de genomas de tripanossomatídeos (TriTryDB) (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (Aslett, Aurrecoechea et al. 2010), foram obtidas e analisadas utilizando o software Clone Manager 9.0, sendo então utilizadas para o delineamento dos pares de iniciadores. O mesmo procedimento foi realizado para os genes que foram utilizados como controle dos ensaios de suscetibilidade à PAR, os respectivos ortólogos de *L. (L.) infantum* dos genes *DLDH* (LAMA_000549100) e *BCAT* (aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada) (LAMA_000549700) que conferem resistência à PAR quando superexpressos (Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018). Cerca de 500 pares de base (pb) da região à jusante e à montante da fase de leitura aberta de cada gene foram utilizadas para o desenho dos iniciadores. As sequências dos iniciadores foram obtidas utilizando o software Primer3 (Koressaar and Remm 2007) (Tabela 1). As sequências dos iniciadores foram analisadas *in silico*, adicionando nas extremidades dos iniciadores sítios de restrição para facilitar a clonagem nos vetores de expressão de *Leishmania* (Tabela 1).

As fases de leitura aberta dos genes ABCF, dos genes controle de *L. (L.) amazonensis* foram amplificados por PCR com a enzima *Phusion High-Fidelity* (New England Biolabs) ou *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Para as reações com *Phusion High-Fidelity*, utilizou-se: GC Buffer 1x, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 100 ng de DNA genômico e 1U de enzima para completar um volume final de 50 µl. Nas reações com *Q5 High-Fidelity*, utilizou-se: Q5 Buffer 1x, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 100 ng de DNA genômico, 1U de enzima e água Milli-Q para completar um volume final de 50 µL. Para amplificação utilizou-se o ciclo inicial para a desnaturação de 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos e um ciclo para a extensão final 72°C por 5 minutos. As etapas de cada ciclo foram: 98°C por 10 segundos, temperatura de associação dos iniciadores por 30 segundos (Tabela 1) e 72°C por 2 minutos para a extensão

(30 segundos por kb). Para a amplificação de cada um dos genes, a temperatura de associação dos respectivos iniciadores, assim como o tamanho do produto amplificado, estão indicados na

Tabela

1.

Tabela 1. Lista dos iniciadores para a clonagem dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT* em vetores de expressão, tamanho em pares de base (pb) do produto amplificado, enzima de PCR utilizada e a temperatura de associação de cada um dos genes.

Gene de <i>L. (L.) amazonensis</i>	Nome do iniciador	Sítio de restrição	Sequência do iniciador *	Tamanho do gene (pb)	Produto amplificado (pb)	Enzima utilizada	Temp. de associação
<i>ABCF1</i>	ABCF1- F	<i>Xba</i> I	5'-GCG TCTAGA GGGCCCTAACCCTACCCTCC-3'	2.174	3.007	Phusion	61,4°C
	ABCF1- R	<i>Hind</i> III	5'-CGC AAGCTT GCCTCACCGCGCGACTATCT-3'				
<i>ABCF2</i>	ABCF2- F	<i>Xba</i> I	5'-GCG TCTAGA GTCGCTCGCGTGGCCATCTA-3'	1.838	2.911	Phusion	60°C
	ABCF2- R	<i>Pvu</i> II	5'-CGC CAGCTG CCGCGCCCACATCACCATTG-3'				
<i>ABCF3</i>	ABCF3- F	<i>Xba</i> I	5'-CGC TCTAGA GCGCACGTCTGCATTGGTGG-3'	2.007	2.367	Q5	63,4 °C
	ABCF3- R	<i>Hind</i> III	5'-GCG AAGCTT CGATGAGGGGGTGCACCTGGT-3'				
<i>DLDH</i>	DLDH- F	<i>Xba</i> I	5'-GCG TCTAGA ATGGACGCGCTGAGA(G/C)AGGC-3'	1.482	2.082	Q5	59°C
	DLDH- R	<i>Hind</i> III	5'-GCG AAGCTT TGGAGCGACACAC(G/A)CCCTCG- 3'				
<i>BCAT</i>	BCAT- F	<i>Xba</i> I	5'-GCG TCTAGA CACGGCGCACAGAAGAAGCG-3'	1.206	2.094	Q5	65°C
	BCAT- R	<i>Hind</i> III	5'-GCG AAGCTT TGGTAAGACACGCACGC(G/C)CA- 3'				

* os sítios de restrição nos respectivos iniciadores, estão indicados em negrito.

Os produtos amplificados foram analisados em uma eletroforese em gel de agarose em tampão TBE 1x e o marcador de peso molecular utilizado foi o *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) ou o *100bp DNA ladder RTU* (GeneDirex). O DNA foi corado com brometo de etídio e as amostras visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta. Os respectivos produtos amplificados e visualizados em gel de agarose foram purificados com o *PureLink Quick Gel extraction kit* (Thermo Fisher Scientific). Para purificação, adicionou-se o volume de 3 vezes de solução L3 (solubilizadora de gel) equivalente da massa de gel contendo o produto amplificado. As amostras foram deixadas em banho-maria à 50°C durante 10 minutos. Posteriormente, 850 µL da amostra foi passado para coluna de extração e centrifugada à 12.000 x g por 1 minuto. O volume residual foi descartado e adicionou-se à coluna 500 µL de solução de lavagem e as amostras centrifugadas novamente. O volume residual foi descartado e as amostras foram centrifugadas mais uma vez para remoção do excesso da solução de lavagem, e para finalizar, água Milli-Q foi adicionada à coluna eluir o DNA. A concentração do DNA purificado foi determinada em um Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

4.6. Adição de adenina a extremidade 5' dos produtos amplificados

As DNA polimerases de alta fidelidade utilizadas nas reações de PCR para amplificação dos genes *ABCF*, *DLDH* e *BCAT*, não adicionam uma adenina na extremidade da fita de DNA sintetizada, não permitindo a clonagem direta do produto amplificado em um vetor de clonagem TA, como por exemplo o pGEM-T *easy* (Promega) (item 4.6). Para a adição de adenina nos produtos amplificados, foi utilizado uma Taq DNA Polimerase convencional. Para esta etapa utilizou-se o DNA amplificado previamente purificado, tampão de PCR 1X [Tris-HCl 10 mM pH 8,8 a 25°C; KCl 50 mM, 0,8% (v/v) Nonidet P40], 200 µM de cada dNTP, 1,25 U de enzima Taq DNA Polimerase (GeneDirex) submetido a um ciclo de 72°C por 15 minutos. O produto de PCR foi então purificado pelo *PureLink Quick PCR Purification kit* (Thermo Fisher Scientific). Adicionou-se ao microtubo contendo o produto de PCR, a solução B2, sendo então a solução transferida para a coluna de purificação seguido de centrifugação à 12.000 x g durante 1 minuto. A solução foi descartada, e adicionou-se 650 µL do tampão de lavagem e a amostra foi centrifugada novamente por mais duas vezes para descartar o volume residual deste tampão. Após esses procedimentos, a coluna foi transferida para um microtubo e o DNA foi eluído em água Milli-Q.

4.7. Clonagem dos produtos amplificados no vetor pGEM-T *easy* e transformação bacteriana

Para a ligação no vetor de clonagem pGEM-T *easy* (Promega), foram utilizados cerca de 2,5 µL do tampão *2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase* (60 mM de Tris-HCl, pH 7.8; 20 mM de MgCl₂; 20 mM de DTT; 2 mM de ATP e 10% de polietilenoglicol), 25 ng do vetor (0,5 µL), 100 ng do produto de DNA amplificado e 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (3 U/ µL) (Promega) para um volume final de 5 µL. Incubou-se a ligação a 4°C durante 16 horas.

4.8. Transformação bacteriana do produto clonado no vetor pGEM-T *easy*

Adicionou-se para transformação bacteriana 5 µL de mix de ligação em 100 µL de bactérias competentes de *Escherichia coli* (cepa DH5α), estas preparadas previamente conforme descrito (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Incubou-se por 30 minutos no gelo, seguidos de 1 minuto e 30 segundos a 42°C e mais 5 minutos de incubação no gelo. Adicionou-se 1 mL de meio líquido LB (10 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl; pH 7,2) e os tubos foram levados a estufa a 37°C com agitação constante por 1 hora para o crescimento das bactérias e depois foram plaqueadas em LB contendo ágar (1,5 g/L) e 100 µg/mL de ampicilina. Previamente ao plaqueamento, foi ainda adicionado 100 µL de IPTG 100 mM e 20 µL de X-Gal (substrato da enzima β-galactosidase) 50 mg/mL. Uma vez plaqueadas, as bactérias foram incubadas em estufa a 37°C durante 16h. O vetor pGEM-T *easy* possui em sua construção um gene de resistência à ampicilina e o gene *LacZ*. Na sequência deste segundo gene que o inserto de DNA é ligado ao plasmídeo, o gene *lacZ* funciona como gene repórter. O IPTG induz esse gene a produzir β-galactosidase, enzima que promove a degradação do substrato X-Gal, formando um produto que deixa a coloração das colônias bacterianas azuis. Porém, quando o plasmídeo está ligado ao inserto de DNA exógeno, esse gene perde sua função e as colônias ficam com coloração branca. Sendo assim, as colônias de bactérias recombinantes de coloração brancas foram selecionadas para extração do DNA plasmidial.

As colônias recombinantes foram incubadas em estufa a 37°C com agitação constante por 12 horas. O DNA plasmidial de cada colônia recombinante foi extraído com *GenElute Plasmid Miniprep kit* (Sigma-Aldrich). Para a extração com o kit, as culturas foram centrifugadas a 2.880 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em solução contendo RNase. A seguir, foi adicionado o tampão de lise e

incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este período, foi adicionada a solução neutralizadora, responsável pela precipitação de DNA cromossomal, proteínas e lipídeos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado à coluna de purificação de DNA plasmidial, sendo centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto. O volume residual foi descartado e adicionou-se à coluna 700 µL da solução lavagem. A amostra foi novamente centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto, o volume residual descartado e a amostra foi centrifugada mais uma vez para remoção dos resíduos da solução de lavagem. Para a diluição do DNA, foi adicionado cerca de 50 µL de água Milli-Q na coluna contendo o DNA plasmídial e centrifugou-se 12.000 x g por 1 minuto.

Os DNAs plasmidiais obtidos foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas e foram selecionados os clones contendo o padrão de bandas esperado. Após a confirmação inicial da presença do inserto, os clones dos respectivos genes foram sequenciados segundo método descrito por Sanger, Nicklen et al. (1977) para a confirmação da sequência dos genes clonados. Todas as reações de sequenciamento foram realizadas pela empresa Myleus Biotecnologia, utilizando o seu serviço de sequenciamento. O aparelho utilizado é o ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Para as reações de sequenciamento foram utilizados os terminadores fluorescentes do *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Applied Biosystems) conforme as instruções do fabricante. As análises das sequências de DNA foram realizadas utilizando os programas Lasergene (DNASTAR) e Clone Manager 9.0.

4.9. Subclonagem dos genes de interesse no vetor de expressão pSP72αHYGα

Os clones contendo os respectivos genes de interesse clonado no vetor pGEM-T *easy*, foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição (Tabela 1) purificados e clonados no vetor pSP72αHYGα previamente digerido com as mesmas enzimas. O vetor de expressão pSP72αHYGα é um DNA circular capaz de se autorreplicar tanto em bactéria (*Escherichia coli*) quanto em *Leishmania* (El Fadili, Messier et al. 2005, Coelho, Leprohon et al. 2012) e possui o gene de resistência à higromicina B, utilizado como marcador de seleção em *Leishmania*. As amostras digeridas dos genes de interesse e do vetor pSP72αHYGα foram separadas em gel de agarose 0,8% e as respectivas bandas contendo os DNA correspondentes aos fragmentos foram purificadas conforme previamente descrito (item 4.5).

Para a clonagem no vetor pSP72αHYGα, foi utilizado aproximadamente 100 ng de DNA dos respectivos fragmentos contendo os genes de interesse, 50 ng de DNA do vetor

pSP72αHYGα digerido, tampão de ligação da enzima T4 DNA ligase 1X (50 mM de Tris-HCl [pH 7,6], 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP, 1 mM de DTT, 25% [m/v] polietilenoglicol-8000), 1U da enzima *T4 DNA ligase* (Thermo Fisher Scientific). O produto da ligação foi mantido à 14°C durante 16 horas. Posteriormente, a reação foi diluída em 100 µL de água Milli-Q (para cada 10µL de ligação). O produto foi utilizado para transformação bacteriana, seguido extração de DNA plasmidial e seleção de clones contendo os respectivos insertos através da digestão com enzimas de restrição apropriadas conforme descrito anteriormente (item 4.7).

4.10. Geração de linhagens mutantes dos genes *ABCF* de *L. (L.) amazonensis* utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9

Os estudos de inativação gênica foram feitos através da substituição do gene de interesse (*ABCF*) por um gene contendo um marcador de resistência a um antibiótico, como por exemplo os genes *Puromicina N-acetiltransferase (PURO)*, *Higromicina Fosfotransferase (HYG)* e *Blasticidina S (BLAST)* (Freedman and Beverley 1993, Ryan, Dasgupta et al. 1993, Goyard and Beverley 2000), através da técnica de CRISPR/Cas9 para a inativação dos respectivos genes *ABCF*. Esta tecnologia foi recentemente descrita em *Leishmania* e em outros tripanossomatídeos (Beneke, Madden et al. 2017, Martel, Beneke et al. 2017, Ishemgulova, Hlavacova et al. 2018) e permite gerar mutantes nulos em uma única transfecção na forma promastigota do parasito.

Para a geração dos alelos mutantes, foi utilizada a linhagem de *L. amazonensis* previamente transfectada com o plasmídeo pT007 e que expressa as enzimas T7 RNA polimerase e Cas9 (Beneke, Madden et al. 2017). Estas células foram transfectadas com cassetes de DNA gerados por PCR que transcrevem os RNAs guia e os respectivos cassetes de reparo também gerados por PCR. Para a amplificação dos cassetes de reparo, contendo os marcadores de resistência, foram utilizados os plasmídeos pTBLAST e pTPURO, que possuem os genes de resistência à blasticidina e à puromicina respectivamente, ambos cedidos pela Profa. Dra. Eva Gluenz (Beneke, Madden et al. 2017). Nesta ferramenta, o RNA guia é sintetizado *in vivo* pela T7 RNA polimerase a partir do cassete de DNA previamente amplificado e transfectado no parasito (Bassett and Liu 2014, Beneke, Madden et al. 2017).

Para o desenho dos iniciadores para a amplificação do cassete de reparo e para a síntese do RNA guia *in vivo* foi utilizado o sítio (<http://www.leishgedit.net/>) (Beneke, Madden et al. 2017). Este sítio disponibiliza iniciadores com base no genoma de *L. (L.) mexicana* para todos os genes do parasito. As sequências obtidas para os genes ABCFs foram

adaptadas para as respectivas sequencias dos genes de *L. (L.) amazonensis* (Tabela 2). Como controle dos experimentos, foi utilizado como alvo o gene que codifica o transportador de MF (*MT*) e que está envolvido na resistência a esse fármaco quando inativado (Perez-Victoria, Gamarro et al. 2003, Coelho, Trinconi et al. 2014). As sequências dos genes *ABCFs* e do *MT* de *L. (L.) amazonensis* foram obtidos no sítio do TritrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (Aslett, Aurrecoechea et al. 2010).

Tabela 2. Lista de iniciadores utilizados para a geração de linhagens mutantes dos genes *ABCF* de *L. (L.) amazonensis* por CRISPR-Cas9.

Gene de <i>L. (L.) amazonensis</i>	Cassete de reparo (5'-3') ¹	5'sg RNA (5'-3') ²	3'sgRNA (5'-3') ²
<i>MT</i>	5'TTGTGGTACGTCTCCTCTCTTC CTGCTTCGgtataatgcagacctgtgc; 5'CGTTCCTCCTAGTGTGCTTCC CCCCTCCTccaatttgagagacctgtgc	5'gaaattaatacgactcactataggGCTCCT AGGGGGTATATGAAGtttttagagctag aaatagc	5'gaaattaatacgactcactataggAGAGA AGATTCAAGCACTGGgttttagagc tagaaatagc
<i>ABCF1</i>	5'TTTCGTCTGCGCCCCCCTTG CCTCGTCAGtataatgcagacctgtgc; 5'GAAGCGTCGAGCGTCCGCCTC ACCCCCCccaatttgagagacctgtgc	5'gaaattaatacgactcactataggCCCATA AGCGTAAACAGACAgttttagagctag aaatagc	5'gaaattaatacgactcactataggAGCCA AAGGCGGGTGTGTGGgttttagagc tagaaatagc
<i>ABCF2</i>	5'GCGCTGATCCGCTCTCCGGAA AGGAGGCCGgtataatgcagacctgtgc; 5'GCACCACGTCTTCGCGAGTGC GCGTTGCCGccaatttgagagacctgtgc	5'gaaattaatacgactcactataggGTATCG GCTTCGTCTATGGGgttttagagctaga aaatagc	5'gaaattaatacgactcactataggAGGAC AGCGCGAAACGAACGgttttagag ctagaaatagc
<i>ABCF3</i>	5'ACCAAATACGCGCACATTTA CTCGGCCCGgtataatgcagacctgtgc; 5'ATCACCACACACCTACCTC CCCCTTCCCccaatttgagagacctgtgc	5'gaaattaatacgactcactataggAGATCG AACTTTACAATGATgttttagagctag aaatagc	5'gaaattaatacgactcactataggAGGCG GTGTTTCAGGAGAGGTgttttagagc tagaaata

¹ As bases indicadas em letra maiúscula correspondem a sequência do respectivo gene e em letra minúscula a sequência dos vetores pTBLAST e pTPURO para a amplificação dos cassetes de reparo.

² As bases indicadas em letra maiúscula correspondem a sequência alvo da Cas9 a ser transcrita *in vivo* pela T7 RNA polimerase. Além dos iniciadores para a síntese do 5'sgRNA e 3'sgRNA foi sintetizado o iniciador G00 que corresponde ao *sgRNA scaffold* (Beneke, Madden et al. 2017).

Para as reações de PCR do cassete de reparo contendo os genes de resistência BLAST e/ou PURO respectivamente foi utilizado a enzima *Phusion High Fidelity* (New England Biolabs). Foi utilizado o tampão GC 1x, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada um dos iniciadores (Tabela 2), 10 ng de DNA genômico e 1U da enzima, além de água Milli-Q para um volume final de 50µL. As etapas utilizadas para a amplificação foram: ciclo inicial para a desnaturação de 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, temperatura de associação de 60°C por 30 segundos, temperatura de extensão 72°C de 2 minutos (30 segundos por kb) e um ciclo para a extensão final 72°C por 5 minutos. Nas reações para amplificar o cassete para síntese do RNA guia *in vivo*, utilizou-se o tampão GC *Buffer* 1x, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador (5' sgRNA ou 3' sgRNA) (Tabela 2)

e

G00

(5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC), além de 1U da enzima *Phusion High Fidelity* (New England Biolabs) e água Milli-Q para completar volume final de 50µL. As etapas utilizadas para a amplificação foram: ciclo inicial para a desnaturação de 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, temperatura de associação de 60°C por 30 segundos, temperatura de extensão 72°C de 45 segundos (30 segundos por kb) e um ciclo para a extensão final 72°C por 5 minutos.

Os cassetes de DNA amplificados foram purificados a partir da precipitação de DNA com acetato de sódio 3M (0,1X volume) e etanol absoluto (2X volume). As amostras foram incubadas à -20°C por 20 minutos e depois centrifugadas a 17.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas mais uma vez, e o sobrenadante descartado. Após a secagem do DNA, este foi diluído em água Milli-Q. A concentração de DNA foi determinada em um Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Os cassetes dos respectivos DNAs de reparo assim como para síntese dos RNAs guias foram transfectados utilizando o eletroporador *Amaza Nucleofector IIb* (Lonza Scientific) conforme descrito no item 4.10. As respectivas concentrações de seleção para os transfectantes foram: 10 µg/mL de blasticidina e 10 µg/mL de puromicina.

4.11. Transfecção por eletroporação em *L. (L.) amazonensis*

Para obter as linhagens superexpressoras, utilizou-se as construções circulares do vetor pSP72αHYGα contendo os genes *ABCFs*, *DLDH* ou *BCAT*; para a realização do método CRISPR/Cas9, as células foram transfectadas com o plasmídeo pT007 capaz de

expressar a enzima Cas9 e T7 RNA polimerase em *Leishmania* (Beneke, Madden et al. 2017). Este plasmídeo foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Eva Gluenz da Universidade de Oxford, Reino Unido.

Para cada transfecção, foi utilizado cerca de $1-1,2 \times 10^7$ promastigotas em fase logarítmica e pelo menos 1 μ g de DNA do vetor contendo os respectivos insertos além do vetor vazio pSP72 α HYG α , este último utilizado como controle das linhagens superexpressoras dos genes estudados. O tampão de transfecção utilizado foi o Tb-BSF 3x (200 mM de Na₂HPO₄, 70 mM de NaH₂PO₄, 15 mM de KCl, 150 mM de HEPES e H₂O Milli-Q) (Schumann Burkard, Jutzi et al. 2011). A partir deste tampão foi preparado o tampão Tb-BSF diluído para 1x contendo 150 μ M de CaCl₂. Para cada eletroporação, promastigotas foram centrifugados a 800 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os parasitos foram lavados com tampão Tb-BSF 1x e então submetidos à centrifugação a 800 x g por 5 minutos, posteriormente os promastigotas foram ressuspensos em Tb-BSF 1x contendo o DNA a ser transfectado e transferidos para uma cubeta de transfecção de 2 mm (Bio-Rad) para a eletroporação. Para a transfecção gênica, foi utilizado o eletroporador *Amaga Nucleofector Iib* (Lonza Scientific) e o protocolo X-001, segundo previamente descrito (Beneke, Madden et al. 2017). Após a eletroporação, os parasitos foram transferidos para 5 mL de meio de cultura e incubados por 24 horas, sendo a seguir adicionado o antibiótico de seleção de acordo com o vetor utilizado. As respectivas concentrações de seleção para os transfectantes foram: 32 μ g/mL de higromicina B; 10 μ g/mL de blasticidina; 10 μ g/mL de puomicina.

Alternativamente, as transfecções gênicas foram realizadas utilizando o eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (Bio-Rad). Para cada transfecção gênica, foram utilizados cerca de 5×10^7 promastigotas em fase logarítmica de crescimento e 3-20 μ g de DNA a ser transfectado conforme protocolo previamente descrito (Kapler, Coburn et al. 1990, Coelho, Leprohon et al. 2012). As células foram centrifugadas por 10 minutos a 850 x g e o sedimento celular ressuspensão com 10 mL do tampão de eletroporação (EPB) (HEPES 21 mM; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; NaH₂PO₄ 0,7 mM; glicose 6 mM; pH 7,05). A centrifugação foi repetida e o sedimento celular foi então ressuspensão com EPB na densidade de 10^8 promastigotas/mL. Desta suspensão celular foram transferidos 0,4 mL para uma cubeta de transfecção de 2 mm (Bio-Rad) (mantida no gelo) já contendo o DNA a ser transfectado. Os parasitos foram então transfectados utilizando a voltagem e capacitância de 450 V e 500 μ F respectivamente. Após a eletroporação, os parasitos foram incubados no gelo por 10 minutos e então transferidos para um frasco de cultura de células contendo 5 mL de meio

M199 por cerca de 18 a 24 horas a 25°C, sendo a seguir adicionado o antibiótico de seleção de acordo com o vetor utilizado, conforme mencionado acima.

Para a confirmação da presença do gene *Cas9* na linhagem transfectada com o plasmídeo pT007 (*La-Cas9*), foi realizado um PCR com iniciadores dirigidos a fase aberta de leitura deste gene e que amplificam um fragmento de cerca de 1 kb. Os iniciadores utilizados foram: 5' CATCGTGGACGAGGTGGCCT e 5' GAGGGCCCCACGTAGTAGGGG .

4.12. Seleção de clones das linhagens mutantes para um dos alelos e mutantes nulos dos genes *ABCFs*

Uma vez gerados e selecionados os parasitos mutantes para cada um dos respectivos genes *ABCFs*, utilizou-se dois métodos distintos para selecionar clones. As linhagens contendo um ou os dois alelos deletados, foram plaqueadas em placa contendo meio M199 (item 4.1), ágar 2%, 10% soro fetal bovino inativado, bioterina e o antibiótico(s) apropriado(s). Alternativamente, as linhagens foram selecionadas através de diluição seriada em placas de 96 poços. Uma vez selecionados, os respectivos clones foram expandidos em meio de cultura contendo o meio M199 líquido (item 4.1), para extração de DNA gênomico dos clones. Estes clones foram ainda avaliados quanto a suscetibilidade à PAR, infectividade e crescimento *in vitro* (itens 4.13, 4.14 e 4.15).

4.13. Avaliação do crescimento das linhagens transgênicas na forma promastigota *in vitro*

Curvas de crescimento foram realizadas em garrafas de 25 cm², contendo 5 mL de meio M199 e inóculo inicial de 5x10⁵ promastigotas por mL. As culturas foram contadas em câmara de Neubauer durante um período de 4 dias.

4.14. Avaliação da suscetibilidade à PAR em formas promastigotas e das linhagens transgênicas de *L. (L.) amazonensis*

A atividade da PAR contra formas promastigotas das linhagens transgênicas de *L. (L.) amazonensis* foi avaliada utilizando o teste do MTT, conforme protocolo previamente descrito (Zauli, Yokoyama-Yasunaka et al. 2012). Após contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, cerca de 2x10⁵ promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram incubados em concentrações crescentes de PAR (0; 9,37; 18,75; 37,5; 75; 150; 300; 600 µM) em volume de 200 µL de meio M199 em placa de 96 poços por 48 horas a 25°C. Posteriormente foi adicionado 30 µL de solução de MTT (5 mg/mL), sendo incubado por cerca de 3 horas. Após

esse período, a reação foi interrompida com 50 µL de SDS 20% para a lise dos parasitos. O resultado foi avaliado por espectrofotometria, medindo a absorbância de 595 nm, utilizando como referência a absorbância de 690 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando as respectivas cepas referência como controle do experimento. O valor de EC₅₀ (concentração de PAR que inibe a viabilidade celular em 50%) foram determinados a partir de curvas de regressão sigmoide utilizando o programa GraphPad Prism 7 conforme previamente descrito (Coelho, Trinconi et al. 2014).

4.15. Avaliação da infectividade das formas amastigotas intracelulares das linhagens transgênicas de *L. (L.) amazonensis*

A infectividade de amastigotas intracelulares das linhagens transgênicas dos genes *ABCFs* foi avaliada utilizando macrófagos derivados de medula óssea que foram infectados e avaliados quanto a sua viabilidade após coloração com Giemsa e observação em microscópio óptico. Os macrófagos, diferenciados em meio R2020 contendo 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929 (responsáveis pela secreção do fator de crescimento e diferenciação de macrófagos), 20% de soro fetal bovino e 50% de meio RPMI, foram cultivados em placas de 24 poços contendo previamente lamínulas redondas de vidro de 13 mm de diâmetro estéreis. Após incubação por 24 horas em estufa à 37°C e 5% CO₂, os macrófagos foram infectados com promastigotas em fase estacionária na proporção de 5 promastigotas por macrófago. As infecções foram realizadas por cerca de 3-4 horas em atmosfera contendo 5% de CO₂ na temperatura de 34°C. Após esse período, os parasitas não internalizados foram removidos e então foi adicionado meio RPMI.

Os macrófagos infectados foram incubados à 34°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 48-72 horas. Após esse período, as lâminas foram fixadas, coradas e observadas ao microscópio óptico. Foram realizados três experimentos independentes realizados em triplicata e a porcentagem de infecção e o número de amastigotas por macrófago foram determinados. A porcentagem de infecção foi determinada pela contagem de macrófagos infectados de um total de pelo menos 100 macrófagos por lamínula.

5. Resultados

5.1. Proteínas ABCF de *L. (L.) amazonensis*

A subfamília ABCF é composta por proteínas que contêm dois domínios de ligação de ATP e estão envolvidas no controle da tradução, sendo altamente conservada nos mais diversos grupos de seres vivos (Higgins 1992, Coelho and Cotrim 2018). O genoma de *Leishmania* spp. possui nas diferentes espécies do parasito três genes anotados como ABCFs e correspondem aos genes *ABCF1*, *ABCF2* e *ABCF3* localizados respectivamente nos cromossomos 3, 19 e 32 de *L. (L.) mexicana* segundo o TriTrypDB (Aslett, Aurrecoechea et al. 2010). O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas ABCFs mostrou que proteína ABCF1 possui 30% de identidade com a ABCF2 e 24% com a ABCF3, e entre as proteínas ABCF2 e ABCF3 a identidade é de 33% (Fig. 4 e Fig. 5).

Em *S. cerevisiae*, a elevação dos níveis proteicos do fator de alongação de tradução EF-3, aumenta a sensibilidade aos aminoglicosídeos PAR e higromicina B (Sandbaken, Lupisella et al. 1990). Este fator de alongação é único em fungos, sem um análogo funcional em procariotos e eucariotos (Belfield and Tuite 1993). A análise das sequências de aminoácidos da proteína EF-3 indicou esta proteína como uma proteína atípica, pelo fato de possuir um domínio definido como *chromodomain-like* não presente em membros da subfamília ABCF de *Leishmania*, em outros tripanossomatídeos e mamíferos (*Homo sapiens*) (Fig. 5 e dados não mostrados). Esse domínio ausente nas proteínas ABCF de *L. (L.) amazonensis* e de outros organismos, foi relacionado com o aumento da sensibilidade à PAR quando mutado (Sasikumar and Kinzy 2014). A proteína EF-3 possui cerca de 13% de identidade com as proteínas ABCFs (Fig. 4).

Além da proteína EF-3, *S. cerevisiae* possui as proteínas ABCFs: GCN20 (Chakraborty 2001), ARB1 (Dong, Lai et al. 2005), NEW1 (Decottignies and Goffeau 1997) e HEF-3 (Murina, Kasari et al. 2019). A proteína ARB1 é essencial em *S. cerevisiae* e quando depletada prejudica a biogênese ribossomal (Dong, Lai et al. 2005). Esta proteína tem identidade de cerca de 29 a 40% com as proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis*, sendo mais similar com a proteína ABCF2 (Fig. 4 e Fig. 5). A proteína GCN20 de *S. cerevisiae* está envolvida na ativação da tradução em condições de falta de aminoácidos quando associada com a proteína GCN1 (Marton, Vazquez de Aldana et al. 1997). Curiosamente, a superexpressão da proteína GCN1 induz um aumento da sensibilidade à PAR, enquanto que sua deleção, resistência a esse antibiótico em fungos (Sattlegger and Hinnebusch 2000). A

proteína GCN20 apresenta identidade de cerca de 23-32% com as proteínas ABCF de *L. (L.) amazonensis*, sendo a maior identidade com a ABCF1 (Fig. 4). A proteína NEW1 é um fator de tradução, que se liga ao ribossomo e facilita a terminação da tradução e a reciclagem ribossomal nos códons de parada (Kasari, Pochopien et al. 2019). A ausência desta proteína resulta em defeitos na montagem do ribossomo em *S. cerevisiae*, além do retardo de crescimento deste organismo em baixas temperaturas (Li, Lee et al. 2009). A proteína NEW1 possui identidade de aproximadamente 10% com as proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis* (Fig. 4 e Fig. 5). O gene que codifica a proteína HEF-3 é parálogo ao gene da EF-3 e a proteína codificada por esse gene tem 87% de identidade com a proteína EF-3 (Maurice, Mazzucco et al. 1998). O domínio *chromodomain-like* também está presente na proteína HEF-3 (Fig. 5). Finalmente, esta proteína possui cerca de 10% de identidade com as proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis* (Fig. 4).

O alinhamento da proteína ABCF1 de *L. (L.) amazonensis* com seus ortólogos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*, mostrou identidades de 93% e de 97% respectivamente (Fig. 4 e Fig. 6). Quando comparada com a sequência proteica dos tripanossomatídeos *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*, a sequência de aminácidos apresentou identidade de 72% com os respectivos ortólogos destas espécies (Fig. 4 e Fig. 6). Estas proteínas possuem um domínio de superhélice ou *coiled coil* que podem estar envolvidas em diversas funções, por exemplo, na sustentação estrutural de organelas, reparo e a replicação do material genético, transporte de vesículas, dentre outras (Truebestein and Leonard 2016)(Fig. 4 e Fig. 6). A proteína ABCF1 de *L. (L.) amazonensis* possui identidade de 34% com seu ortólogo em *H. sapiens* (ABCF3) (Fig. 4 e Fig. 6). A proteína ABCF2 de *L. (L.) amazonensis* possui identidade de 92% com seu ortólogo em *L. (V.) braziliensis* e de 97% em *L. (L.) major* (Fig. 4 e Fig. 7). Já os ortólogos de *T. brucei* e *T. cruzi* possuem identidade de 78% e 75% respectivamente (Fig. 4 e Fig. 7). A proteína ABCF2 humana tem identidade de 47% com a ABCF2 de *L. (L.) amazonensis* (Fig. 4 e Fig. 7). A proteína ABCF3 de *L. amazonensis* possui identidade de 91% com seu ortólogo de *L. (V.) braziliensis* e 97% com seu ortólogo de *L. (L.) major* (Fig. 4 e Fig. 8). Os ortólogos de *T. brucei* e *T. cruzi* possuem identidade de 71% e 73% respectivamente (Fig. 4 e Fig. 8). Estas proteínas também possuem o domínio *coiled coil*, assim como a proteína ABCF1. A identidade obtida com o ortólogo humano ABCF1 é de 28% (Fig. 4 e Fig. 8). A proteína ABCF1 humana está envolvida no início da tradução e promove a precisão translacional, além de participar de um mecanismo alternativo de início da tradução, conforme revisado por Ousalem, Singh et al. (2019).

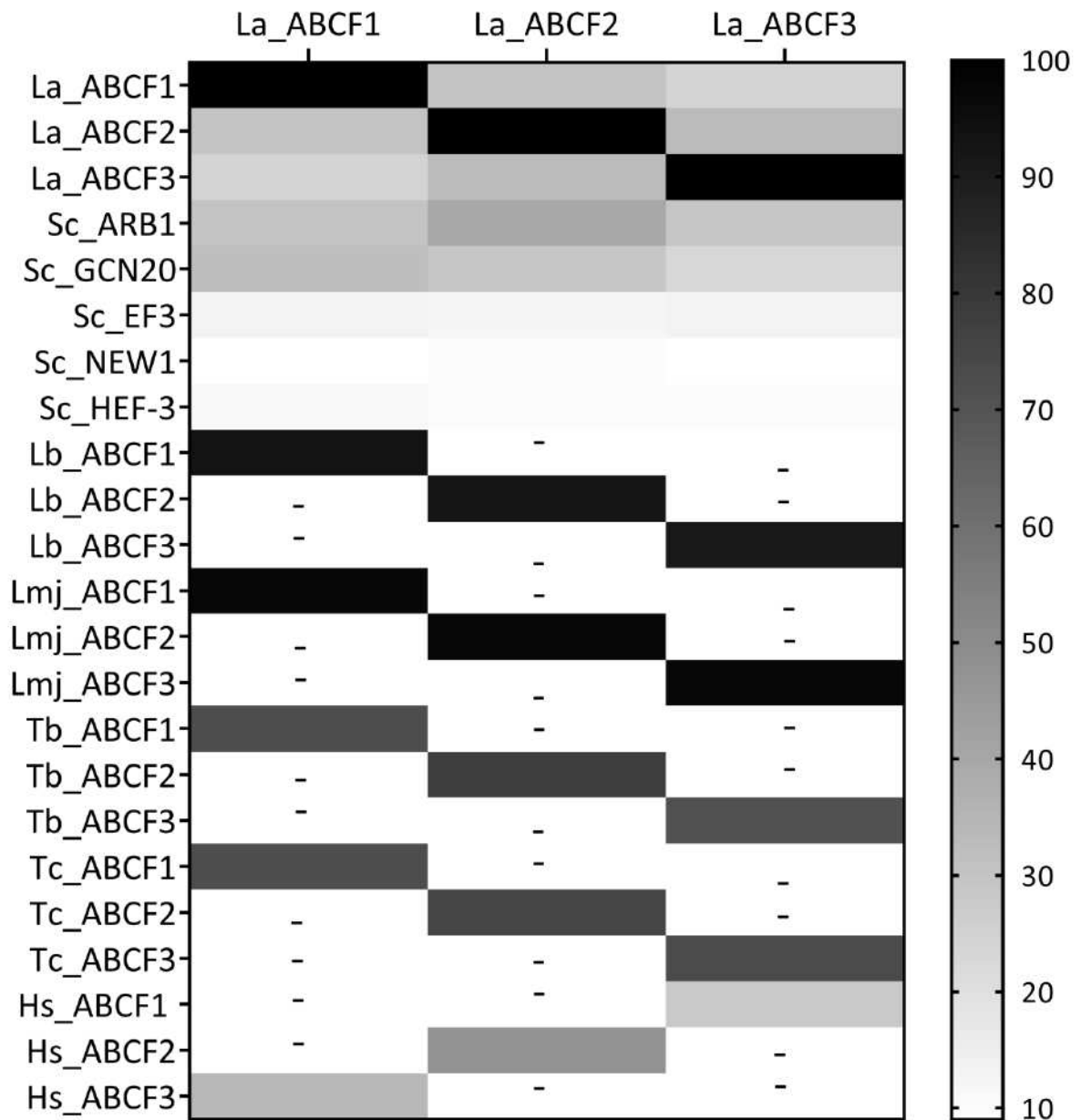


Figura 4. Identidade em escala *heatmap* entre as proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis* (La_ABCF1, La_ABCF2 e La_ABCF3) e as proteínas ABCFs de outros organismos. Na Figura, os valores apresentados estão em porcentagem, conforme a legenda à direita. Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Lb, *L. (V.) braziliensis*; Lmj, *L. (L.) major*; Tb, *T. brucei*; Tc, *T. cruzi* e Hs, *Homo sapiens*. (-) as sequências não foram comparadas.

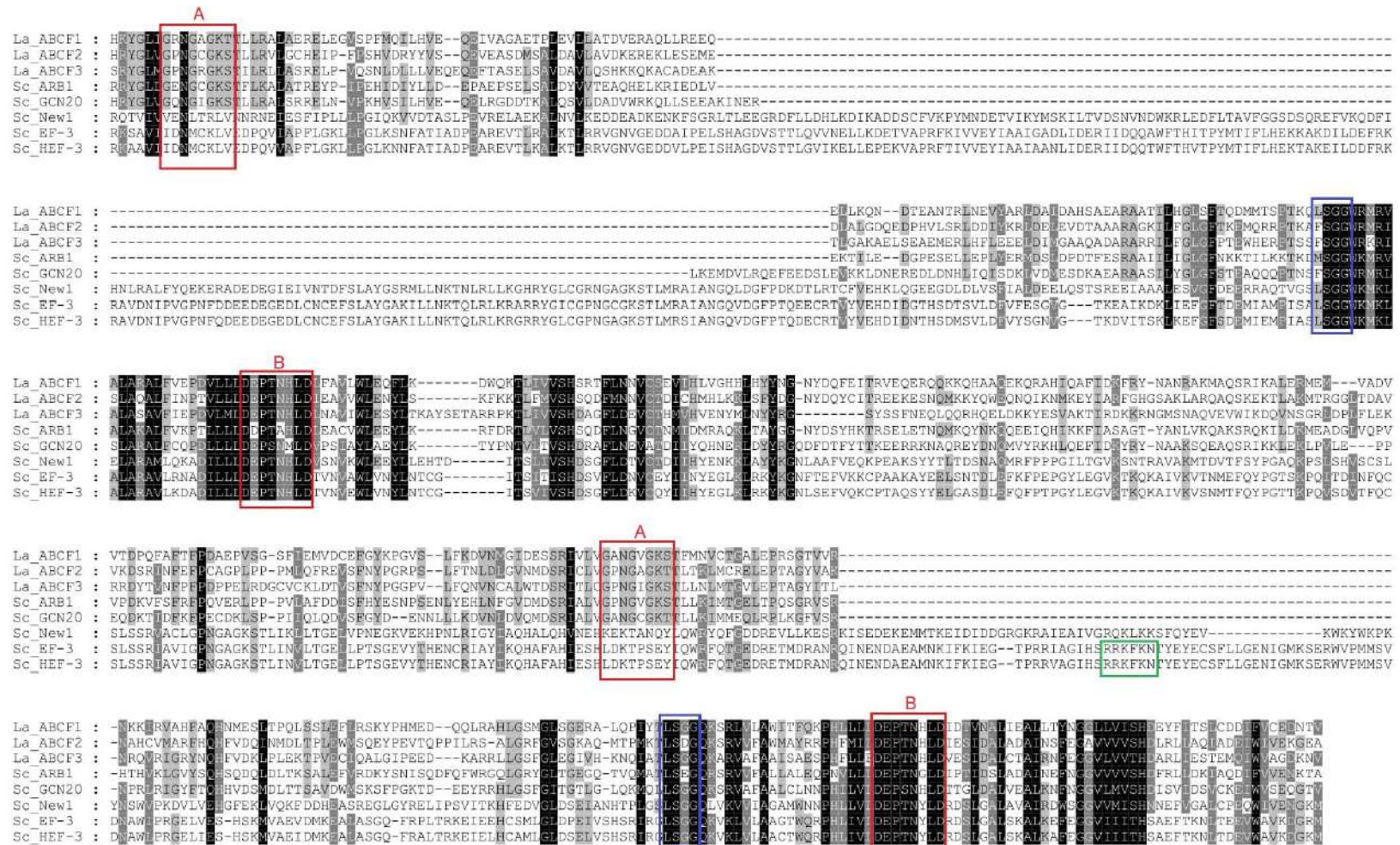


Figura 5. Alinhamento parcial das proteínas ABCF de *L. (L.) amazonensis* e das proteínas EF-3, GCN20, ARB1, NEW1 e HEF-3 de *S. cerevisiae* (Sc). Os dois domínios de ligação de ATP estão indicados no alinhamento em vermelho (motivos Walker A e B de cada um dos domínios), além da assinatura das proteínas ABC, localizada entre os motivos *Walker* A e B (em azul). O domínio *chromodomain-like* presente nas proteínas EF-3 e HEF-3 e que afeta a sensibilidade à PAR em *S. cerevisiae* está indicado em verde.

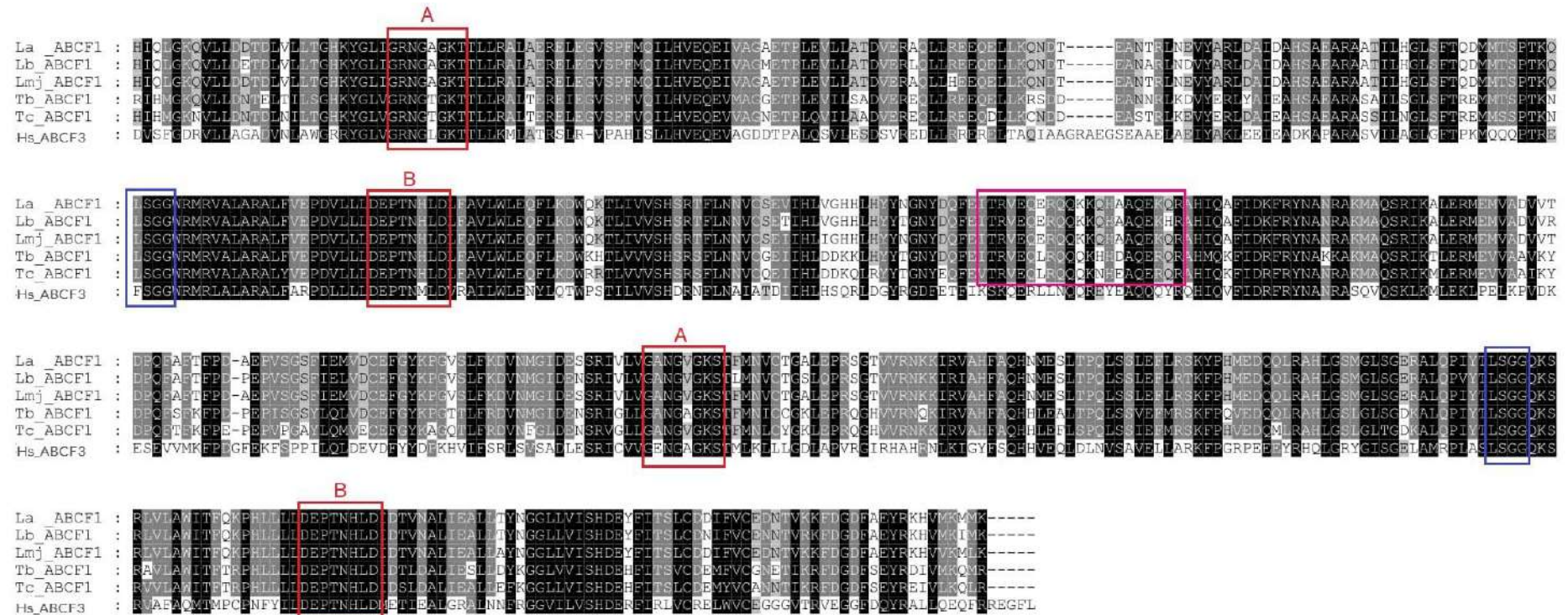


Figura 6. Alinhamento parcial da proteína ABCF1 de *L. (L.) amazonensis* (La) e de seus ortólogos de *L. (V.) braziliensis* (Lb), *L. (L.) major* (Lmj), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) e *Homo sapiens* (Hs). Os dois domínios de ligação de ATP estão indicados no alinhamento em vermelho (motivos Walker A e B de cada um dos domínios); a assinatura das proteínas ABC localizado entre os motivos *Walker* A e B está indicado em azul. O domínio de superhélice está indicado em rosa.

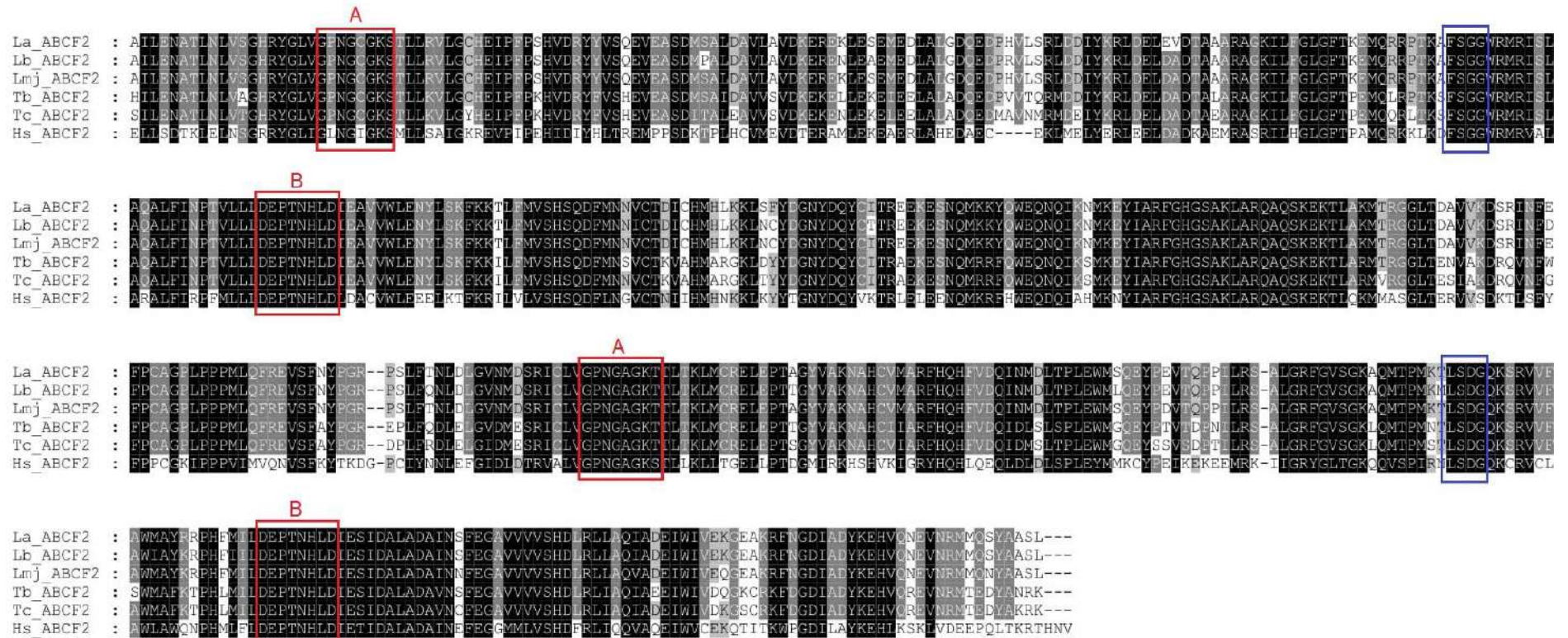


Figura 7. Alinhamento parcial da proteína ABCF2 de *L. (L.) amazonensis* (La) e de seus ortólogos de *L. (V.) braziliensis* (Lb), *L. (L.) major* (Lmj), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) e *Homo sapiens* (Hs). Os dois domínios de ligação de ATP estão indicados no alinhamento em vermelho (motivos Walker A e B de cada um dos domínios); a assinatura das proteínas ABC localizado entre os motivos *Walker A* e B está indicado em azul.

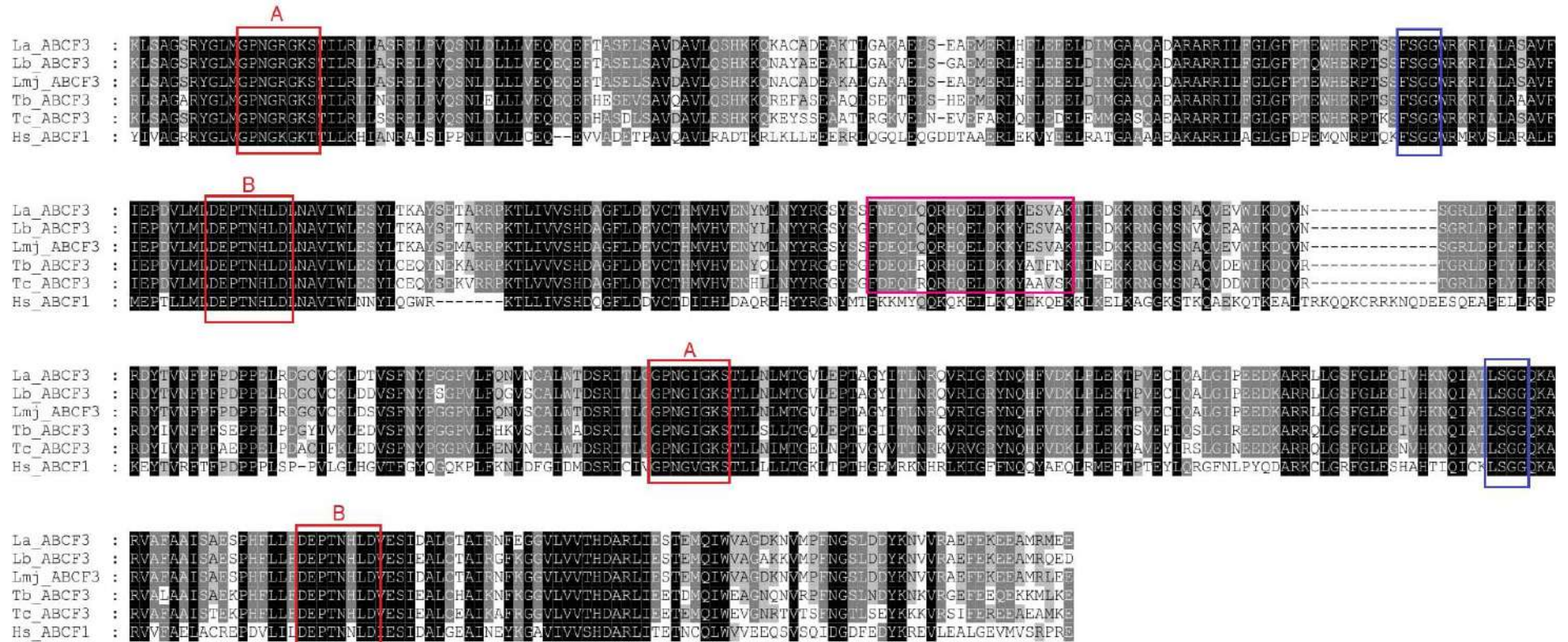


Figura 8. Alinhamento parcial da proteína ABCF3 de *L. (L.) amazonensis* (La) e de seus ortólogos de *L. (V.) braziliensis* (Lb), *L. (L.) major* (Lmj), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) e *Homo sapiens* (Hs). Os dois domínios de ligação de ATP estão indicados no alinhamento em vermelho (motivos Walker A e B de cada um dos domínios); a assinatura das proteínas ABC localizada entre os motivos *Walker* A e B está indicado em azul. O domínio de superhélice está indicado em rosa.

5.2. Amplificação e clonagem dos genes *ABCFs* e dos genes *DLDH* e *BCAT* no vetor pGEM-T *easy*

As fases de leitura aberta dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT* foram amplificadas por PCR gradiente com a enzimas *Phusion High-Fidelity* (New England Biolabs) ou *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). O tamanho dos fragmentos amplificados dos genes *DLDH*, *BCAT*, *ABCF1*, *ABCF2* e *ABCF3* foram 2,08 kb, 2,1 kb, 3 kb, 2,9 kb e 2,4 kb respectivamente (Tabela 1 e Fig. 9). Os respectivos fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM-T *easy* (Fig. 10).

A

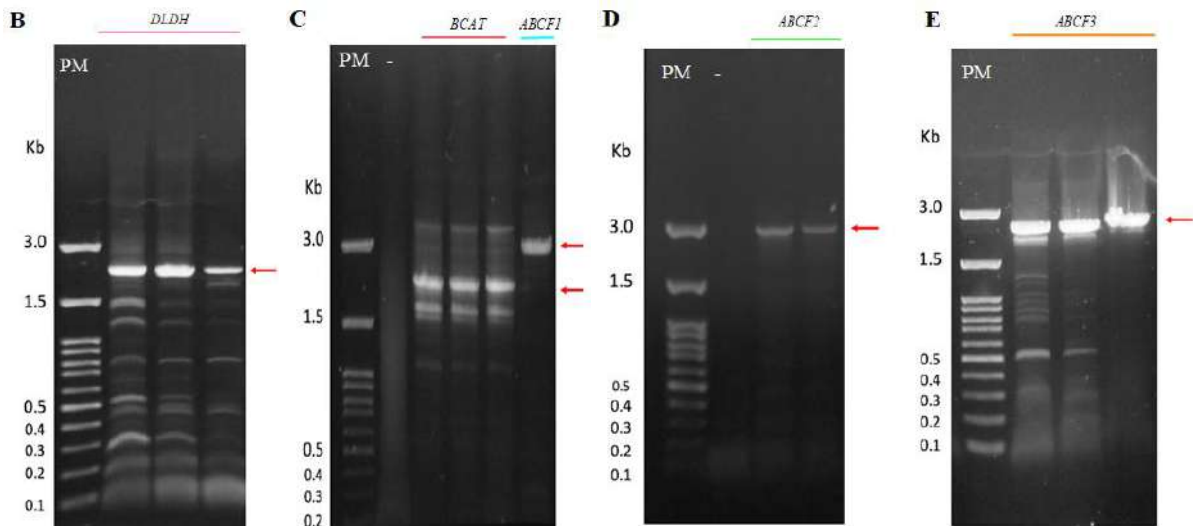
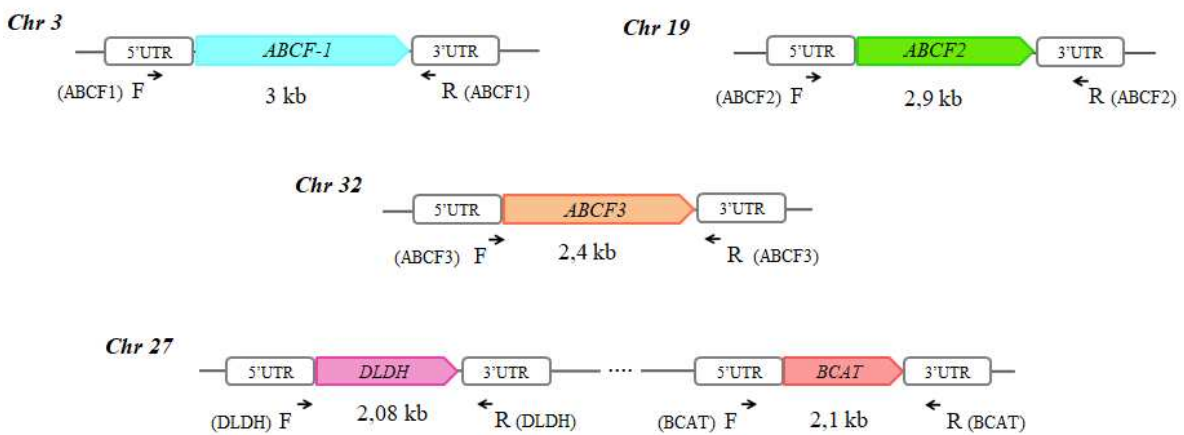


Figura 9. (A) Representação esquemática da localização dos iniciadores e o tamanho aproximado dos fragmentos amplificados dos genes *DLDH*, *BCAT*, *ABCF1*, *ABCF2* e *ABCF3*. Produtos amplificados por PCR com gradiente de temperatura dos genes *DLDH* (B), *BCAT* (C) e *ABCFs* (C, D e E) de *L. (L.) amazonensis* em uma eletroforese em gel de agarose. Os produtos amplificados dos respectivos genes estão indicados pelas setas em vermelho. Legenda: PM, peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*; (-) controle negativo do PCR.

Para verificar se cada produto amplificado e clonado estava correto para cada um dos genes, estes foram digeridos com enzimas de restrição indicadas (Fig. 10A). As enzimas de restrição selecionadas foram baseadas em análises *in silico* dos respectivos genes, assim como do vetor pGEM-T *easy* (Fig. 10A). Como controle, utilizou-se o plasmídeo pGEM-T *easy* sem inserto digerido com enzima *EcoRI*. Esta enzima lineariza o plasmídeo, gerando uma banda de cerca de 3 kb. Para o gene *ABCF1*, utilizou-se a enzima *EcoRV* e o padrão de restrição foram duas bandas de aproximadamente 4,6 e 1,3 kb; para o gene *ABCF2* a digestão ocorreu com a enzima *HindIII*, gerando uma banda de aproximadamente 5,3 kb e outra de 0,65 kb; o gene *ABCF3* foi digerido com *EcoRI* gerando bandas de 2,9, 1,7 e 0,7 kb (Fig. 10B). Os genes *DLDH* e *BCAT* foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, gerando bandas de aproximadamente 3 e 2,1 kb (Fig. 10B).

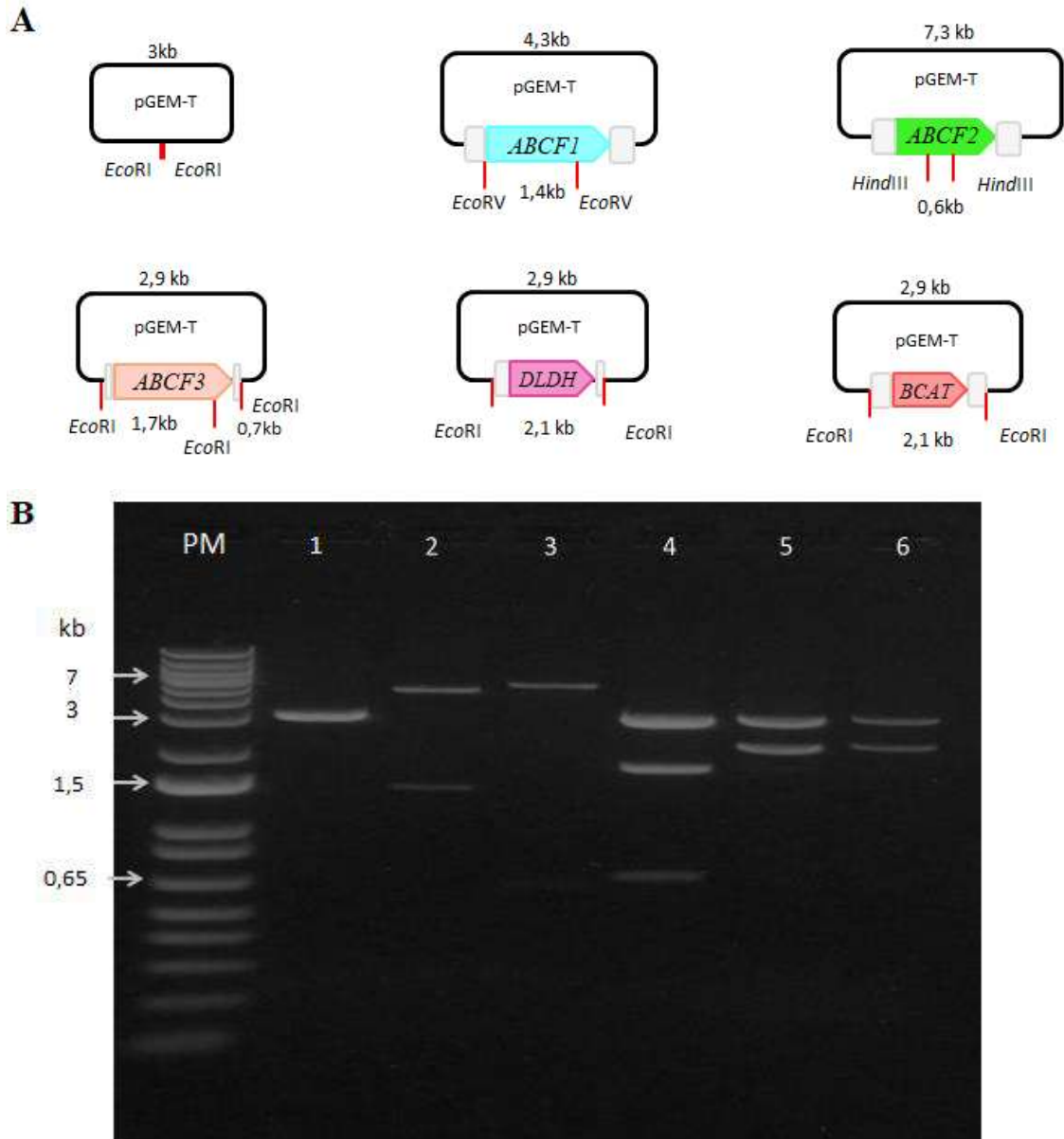


Figura 10. (A) Representação esquemática dos sítios de restrição dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT* clonados no vetor pGEM-T *easy*. Os genes e os sítios não estão em escala. (B) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da digestão dos genes clonados no vetor pGEM-T *easy* com as enzimas de restrição indicadas em (A). PM, peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*; 1 - pGEM-T *easy* linearizado com *EcoRI*; 2 - pGEMT-*La*-*ABCF1* digerido com *EcoRV*; 3- pGEMT-*La*-*ABCF2* digerido com *HindIII*; 4 - pGEMT-*La*-*ABCF3* digerido com *EcoRI*; 5- pGEMT-*La*-*D*-*LDH* digerido com *EcoRI*; 6 - pGEMT-*La*-*BCAT* digerido com *EcoRI*.

Os respectivos genes clonados foram ainda confirmados, através do sequenciamento de nucleotídeos pelo método descrito por (Sanger, Nicklen et al. 1977). Foi utilizado como referência as sequências previamente disponíveis dos respectivos genes de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* disponíveis no TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/>). Os respectivos clones dos genes com a sequência de nucleotídeos confirmada foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição indicadas (Tabela 1), e então subclonados no vetor

pSP72 α HYG α (El Fadili, Kundig et al. 2002). Os DNAs plasmidiais do vetor pSP72 α HYG α contendo os genes *ABCF1* e *ABCF3* (Fig. 11 A e B), além dos genes *BCAT* e *DLDH* (Fig. 11 A e B) previamente envolvidos na resistência à PAR em *L. infantum* (Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018), foram selecionados e transfectados em *L. (L.) amazonensis*. Não foi obtida, até a conclusão desta dissertação de Mestrado, a clonagem do gene *ABCF2* no vetor de expressão pSP72 α HYG α .

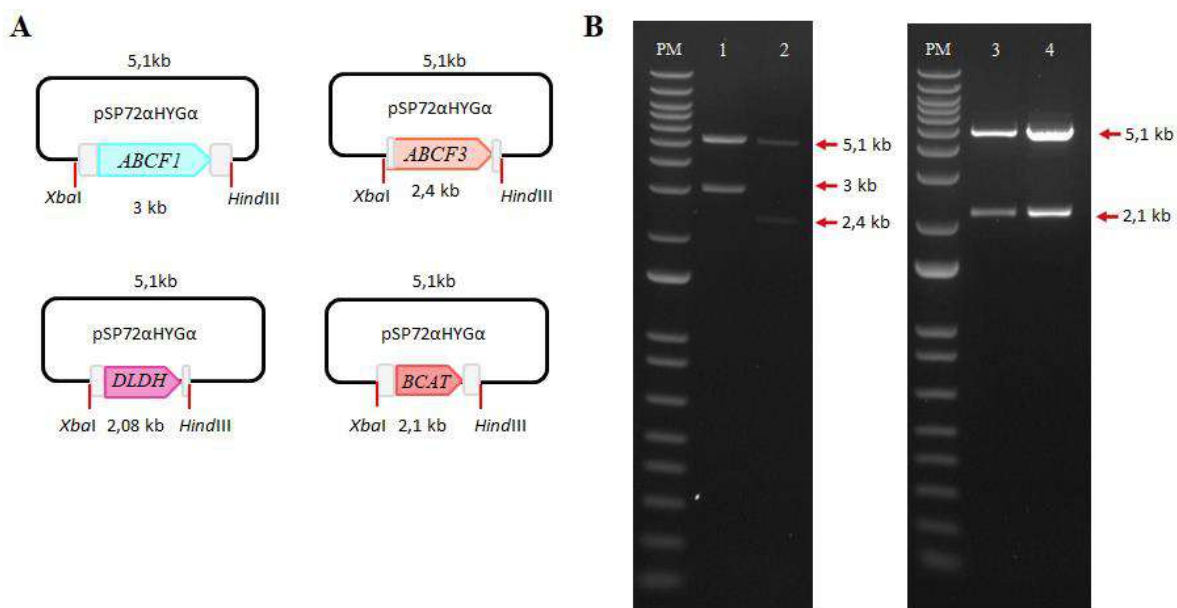


Figura 11. (A) Representação esquemática dos sítios de restrição dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT* clonados no vetor pSP72 α HYG α . Os genes e os sítios não estão em escala. (B) Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da digestão dos genes clonados no vetor pSP72 α HYG α com as enzimas de restrição indicadas em (A). PM, peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder; 1- *La*-pSP72 α HYG α -*ABCF1*; 2- *La*-pSP72 α HYG α -*ABCF3*; 3- *La*-pSP72 α HYG α -*DLDH*; 4- *La*-pSP72 α HYG α -*BCAT*.

Os resultados de suscetibilidade obtidos para as linhagens superexpressoras dos genes *ABCFs* são apresentados no item 5.4.

5.3. Geração de mutantes nulos dos genes *ABCFs* utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9 em *L. (L.) amazonensis*

Para a padronização da tecnologia do sistema CRISPR/Cas9 no laboratório, foi utilizado como alvo inicial o gene *MT* para a geração de um alelo inativado. Este gene codifica o transportador de MF (*MT*) e é responsável pelo fenótipo de resistência à MF quando mutado ou deletado (Perez-Victoria, Gamarro et al. 2003, Perez-Victoria, Sanchez-Canete et al. 2006, Coelho, Trinconi et al. 2014). O fenótipo de resistência à MF pode ser facilmente testado nas linhagens mutantes do gene *MT* através de um ensaio de suscetibilidade *in vitro* em promastigotas utilizando o teste do MTT (Coelho, Trinconi et al. 2014). Os cassetes lineares contendo os genes de resistência à puromicina e à blasticidina,

assim como os cassetes lineares para a transcrição *in vivo* de cada um dos RNAs guia (sgRNA) foram amplificados por PCR, conforme previamente descrito (Beneke, Madden et al. 2017). Uma alíquota de cada uma das amostras foi analisada em uma eletroforese em gel de agarose (Fig. 12 A e B), previamente a transfecção na linhagem de *L. (L.) amazonensis* transfectada com o plasmídeo pT007 e que expressa as enzimas Cas9 e a T7 RNA polimerase (*La-Cas9*) (Beneke, Madden et al. 2017). Os cassetes de reparo contendo os marcadores de resistência à puromicina e à blasticidina, amplificaram fragmentos de 1,8 e 1,7 kb respectivamente (Fig. 12A). Já os cassetes lineares para a transcrição *in vivo* dos RNAs guias 5' e 3' do gene *MT* amplificaram produtos de cerca de 100 pb, conforme esperado (Fig. 12B). Para a confirmação da presença do gene *Cas9* na linhagem transfectada (*La-Cas9*), foi realizado um PCR que amplifica um fragmento de cerca de 1kb deste gene (Fig. 12C e D).

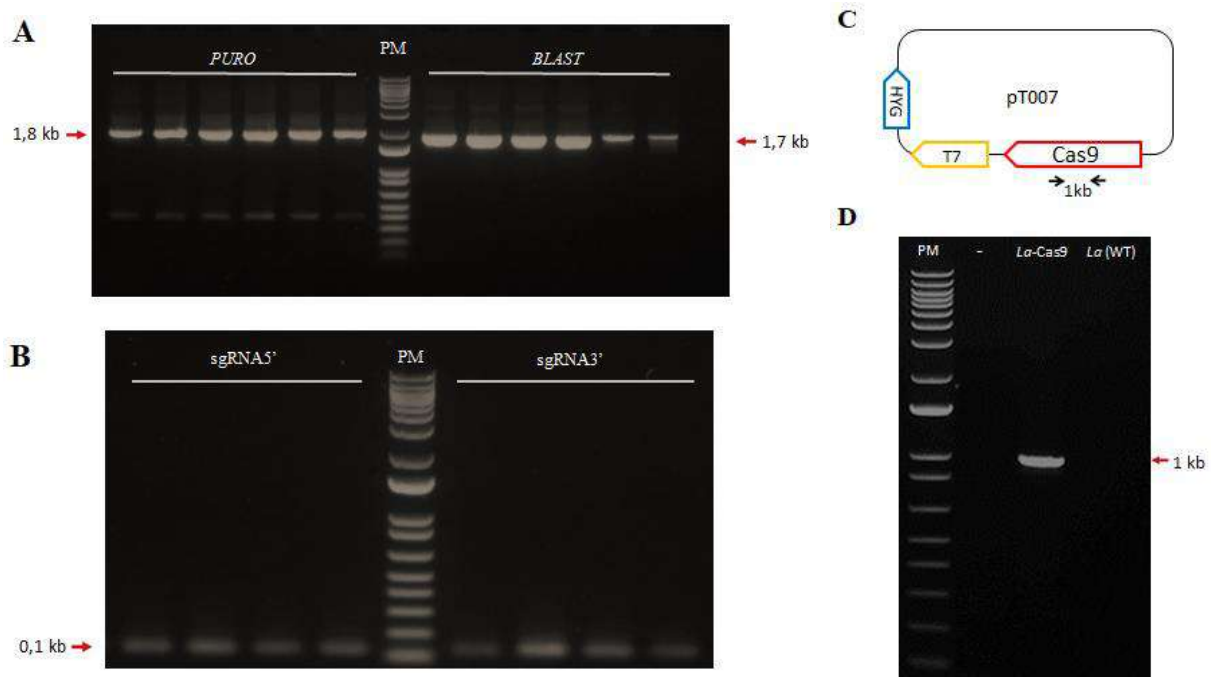


Figura 12 Amplificação por PCR dos cassetes lineares contendo os genes de resistência à puromicina (*PUR*O) (1,8 kb) e à blasticidina (*BLAST*) (1,7 kb) (A), para a síntese *in vivo* dos RNAs guias 5' e 3' a partir da enzima T7 RNA polimerase (0,1 kb) (B). (C) Representação esquemática do plasmídeo pT007 com a localização dos iniciadores internos do gene *Cas9* (setas pretas) e a confirmação da presença do gene *Cas9* por eletroforese em gel (D). Os respectivos fragmentos amplificados estão indicados pelas setas vermelhas e foram utilizados em ensaio de transfecção por eletroporação para a geração de mutantes nulos do gene *MT* em *L. (L.) amazonensis*. PM, peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*; (-) controle negativo da PCR.

A transfecção dos fragmentos lineares na linhagem de *L. (L.) amazonensis* transfectada com o plasmídeo pT007 permitiu a seleção de parasitos resistentes à puromicina, mas não a ambos os antibióticos (Fig. 13B e dados não mostrados). Os parasitos selecionados em presença deste antibiótico tiveram o seu DNA genômico extraído para avaliar a eficácia da ferramenta utilizada na geração do mutante de um dos alelos do gene *MT*. A análise por PCR utilizando iniciadores dirigidos ao gene *MT* e que flanqueiam a fase de leitura aberta do gene, além de iniciadores específicos do gene que confere resistência à puromicina permitiram confirmar o genótipo esperado (Fig. 13). A linhagem selecionada em presença de puromicina possui um dos alelos do gene *MT* inativado, substituído pelo marcador de resistência à puromicina conforme análise por PCR do DNA genômico desta linhagem (*La-sKO-MT*) (Fig. 13B).

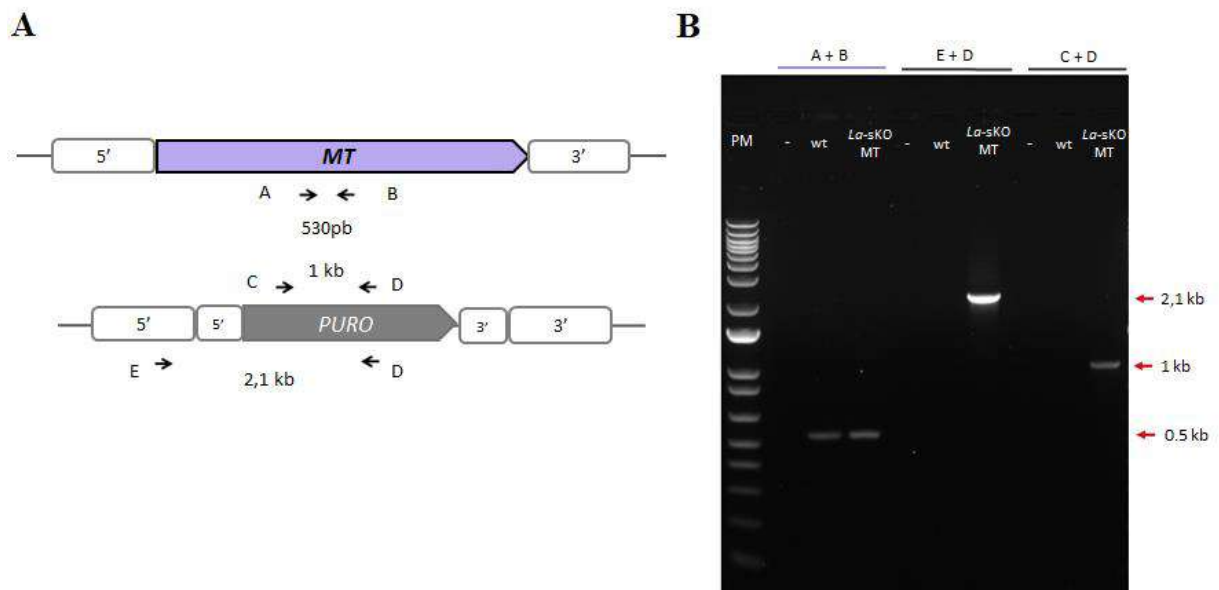


Figura 13. Geração da linhagem mutante para um dos alelos do gene *MT* em *L. (L.) amazonensis* (*La*-sKO-*MT*) utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9. (A) Mapa esquemático do locus do gene *MT* de *L. (L.) amazonensis* e localização dos iniciadores utilizados para análise por PCR do alelo mutante e selvagem do gene *MT*. (B) Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR utilizando os iniciadores indicados em (A), a partir do DNA genômico da linhagem selvagem [*La* (WT)] e da linhagem mutante para um dos alelos do gene *MT* (*La*-sKO-*MT*). PM, peso molecular 1Kb *Plus DNA Ladder*; (-) controle negativo da PCR.

Uma vez confirmada a inativação de um dos alelos do gene *MT* utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9, foi avaliada a suscetibilidade à MF. Conforme esperado, observou-se que a linhagem *La*-sKO-*MT* apresentou um valor de EC_{50} significativamente maior que a *La* (WT) e a linhagem transfectada com o plasmídeo pT007 (*La*-Cas9) (pelo menos 3 vezes maior) (Tabela 3 e Fig. 14). Pôde-se observar ainda que a linhagem transfectada com o plasmídeo pT007 apresentou crescimento similar ao da linhagem *La* (WT) (Fig.18).

Tabela 3. Suscetibilidade à MF na forma promastigota da linhagem *La* (WT), *La*-Cas9 e da linhagem mutante para o gene *MT*.

Linhagem	EC ₅₀ ± DP (μM)	(n) ¹
<i>La</i> (WT)	39,09 ± 1,83	3
<i>La</i> -Cas9	46,6 ± 3,45	3
<i>La</i> -sKO-MT	143 ± 3,14	3

¹ número de experimentos independentes realizados em triplicata.

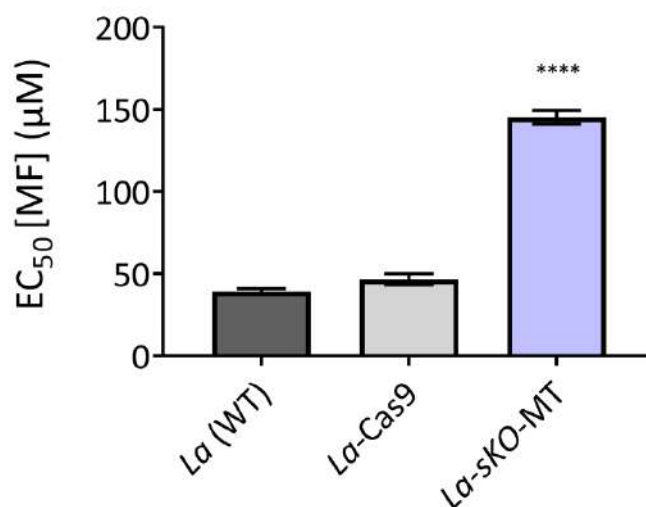


Figura 14. Suscetibilidade à MF das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e *La*-sKO-MT na forma promastigota. Está representado a média e o desvio padrão dos valores de EC₅₀ das linhagens indicadas após incubação com o fármaco por um período de 24 horas. **** (p < 0,0001) em comparação com as linhagens *La* (WT) e *La*-Cas9 utilizando o teste “One way ANOVA” no software GraphPad Prism 7.

Uma vez confirmado o emprego da tecnologia de CRISPR/Cas9 em *L. (L.) amazonensis*, foram realizados os ensaios dirigidos aos alelos dos genes *ABCF1*, *ABCF2* e *ABCF3*. Os cassetes lineares com os genes de resistência à puromicina e à blasticidina, assim como para a transcrição do RNA guia, foram amplificados por PCR e transfectados na linhagem *La*-Cas9.

Inicialmente, obtivemos apenas linhagens mutantes para um dos alelos de cada um dos genes *ABCF* de *L. (L.) amazonensis* (Fig. 15B, 16B e 17B). Após transfecção e seleção aos respectivos antibióticos, foram selecionados clones referentes às linhagens geradas. Estes clones tiveram o seu DNA genômico extraído para análise por PCR utilizando um iniciador dirigido à região codificadora do gene de resistência e um outro dirigido à montante e/ou jusante da fase de leitura aberta para cada um dos genes *ABCF*. Além destes, foi utilizado um par de iniciadores específicos dirigidos ao gene que confere resistência à

puromicina e/ou blasticidina, além de um par de iniciadores dirigidos a cada um dos genes ABCF (Fig. 15A, Fig. 16A e Fig. 17A). Para o gene *ABCF1*, um dos alelos foi substituído pelo gene de resistência à BLA na linhagem *La*-sKO-ABCF1 (Fig. 15B). O gene *ABCF2* da linhagem *La*-sKO-ABCF2 e o gene *ABCF3* da linhagem *La*-sKO-ABCF3 tiveram seus respectivos alelos substituídos pelo cassete *PURO* que contém o gene de resistência à puromicina (Fig. 15B e 17B). Após um segundo *round* de transfecção, foram obtidos para os genes *ABCF1* e *ABCF3* a substituição destes genes pelo cassete contendo o gene de resistência à blasticidina, embora os parasitos ainda continham uma cópia do gene selvagem (*La*-dKO-ABCF1 e *La*-dKO-ABCF3) (Fig. 15 e Fig. 17). A retenção de pelo menos uma cópia dos genes *ABCF1* e *ABCF3* nas respectivas linhagens mutantes, sugerem a essencialidade destes genes (Fig. 15 e Fig. 17). No caso da linhagem *La*-sKO-ABCF2, foi possível a geração de um mutante nulo, após uma segunda transfecção, onde o gene *ABCF2* foi substituído pelo gene que confere resistência à blasticidina (Fig. 16).

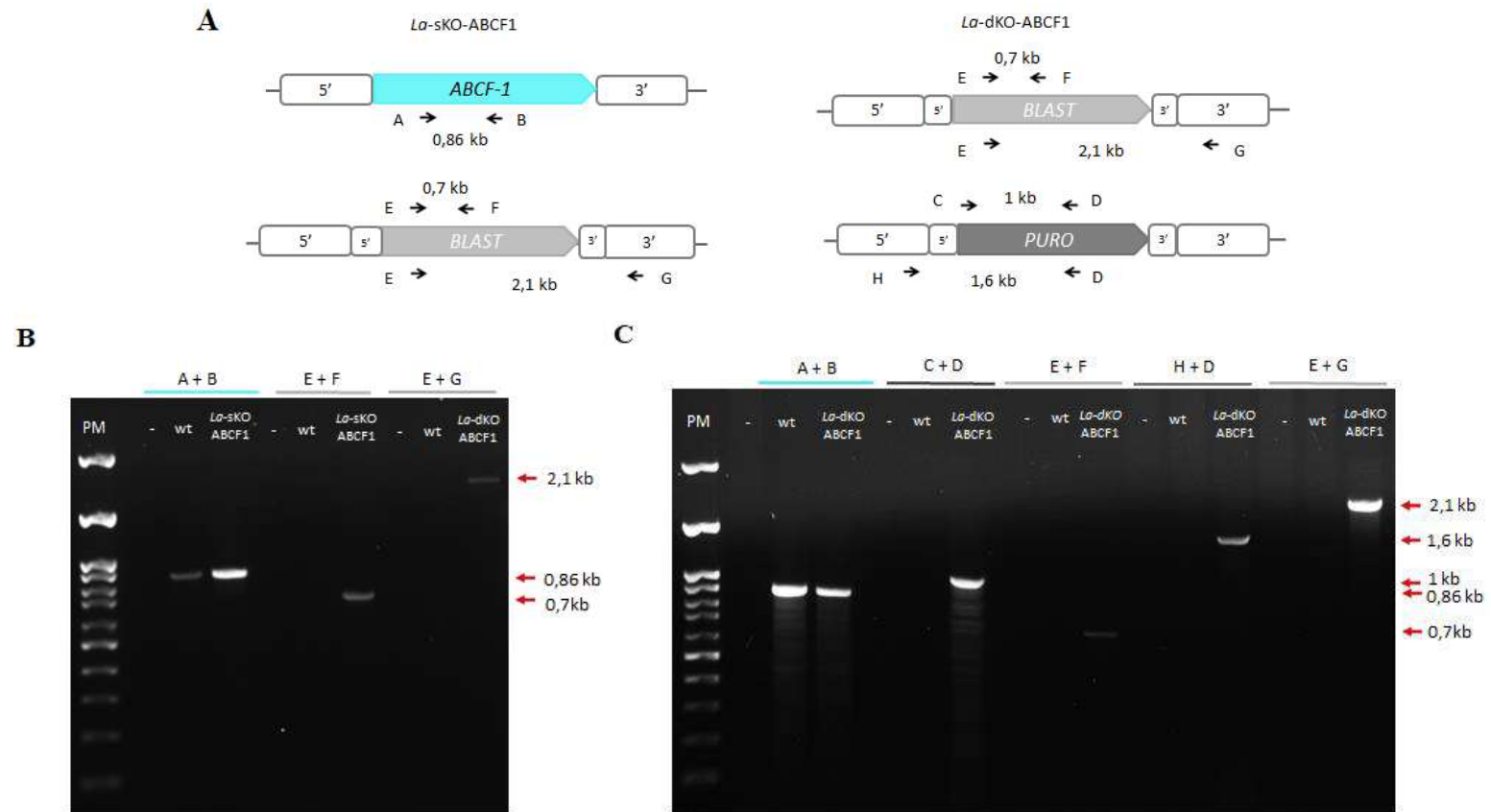


Figura 15. Geração das linhagens mutantes para o gene *ABCF1* de *L. (L.) amazonensis*. (A) Representação esquemática dos genes *ABCF1*, *PURO* e *BLAST*, contendo os iniciadores utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados para o mapeamento das linhagens mutantes. (B) Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR utilizando os iniciadores indicados em (A), a partir do DNA genômico da linhagem *La* (WT) e do clone da linhagem *La-sKO-ABCF1*. (C) Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR utilizando os iniciadores indicados em (A), a partir do DNA genômico da linhagem *La* (WT) e do clone da linhagem *La-dKO-ABCF1*. PM, peso molecular 100bp *DNA ladder* RTU; (-) controle negativo da PCR.

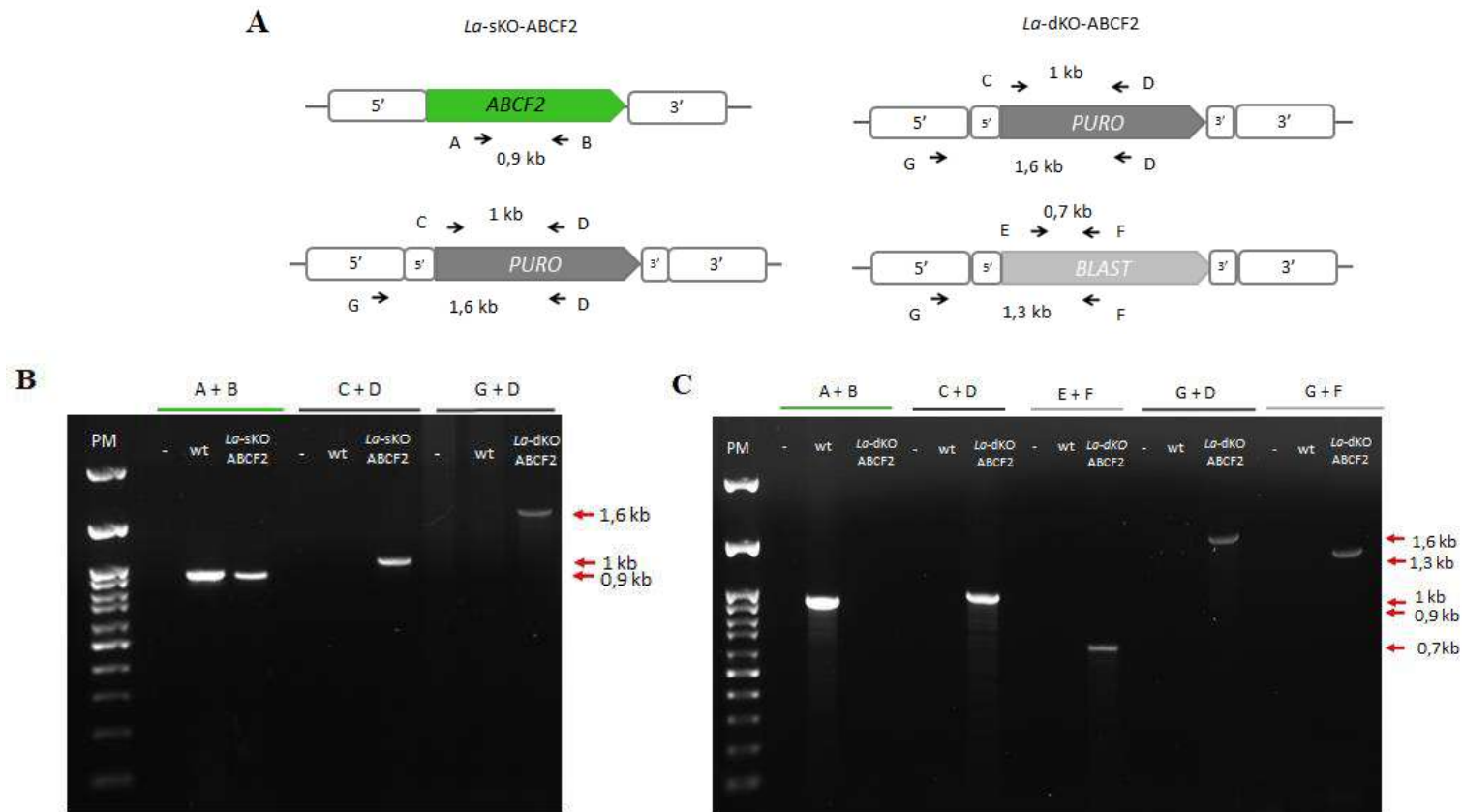


Figura 16. Geração das linhagens mutantes para o gene *ABCF2* de *L. (L.) amazonensis*. (A) Representação esquemática dos genes *ABCF2*, *PURO* e *BLAST*, contendo os iniciadores utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados para o mapeamento das linhagens mutantes para o gene *ABCF2*. (B) Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR utilizando os iniciadores indicados em (A), a partir do DNA genômico da linhagem *La* (WT) e do clone da linhagem *La-sKO-ABCF2*. (C) Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR utilizando os iniciadores indicados em (A), a partir do DNA genômico da linhagem *La* (WT) e do clone da linhagem *La-dKO-ABCF2*. PM, peso molecular 100bp DNA ladder RTU; (-) controle negativo da PCR.

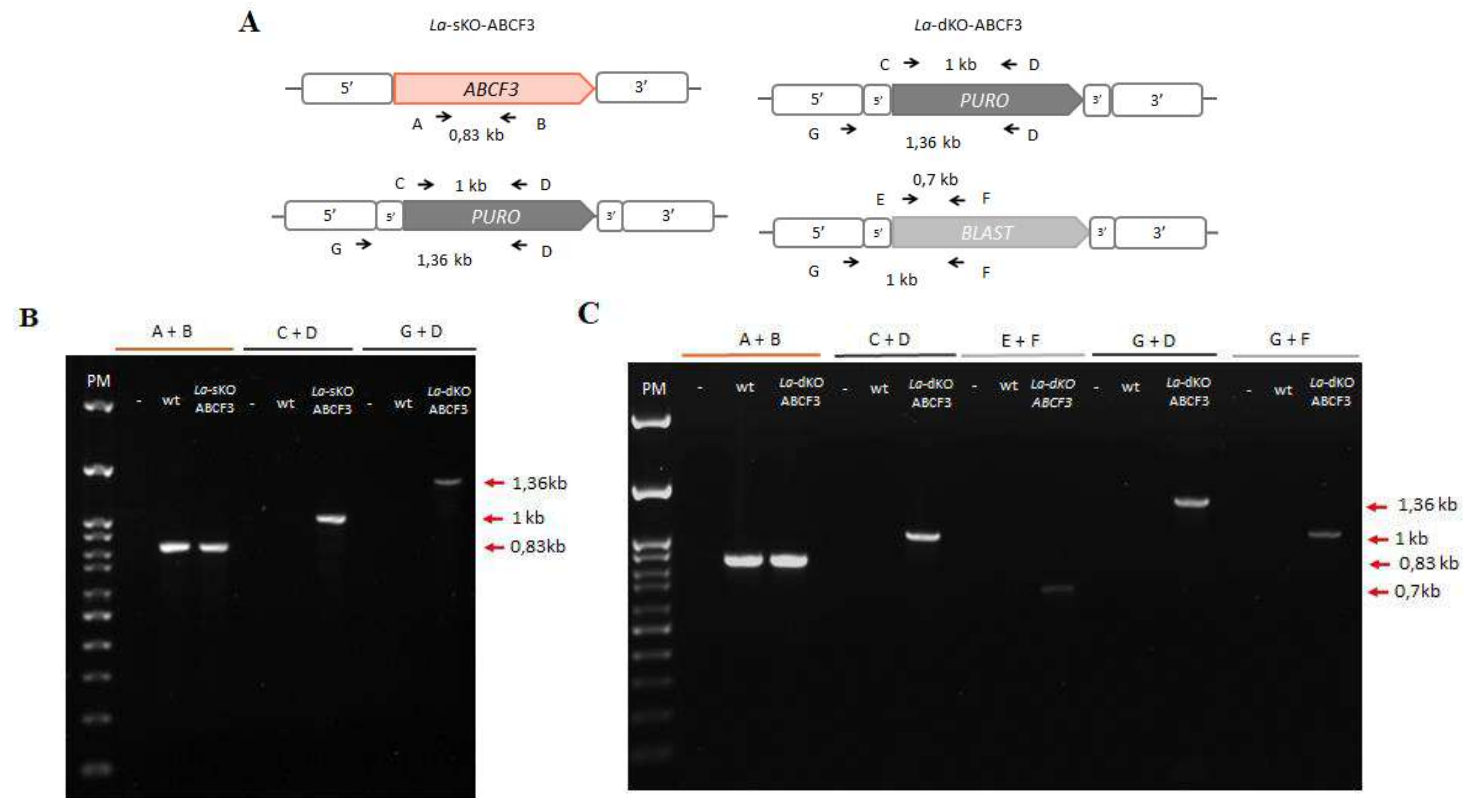


Figura 17. Geração das linhagens mutantes para o gene *ABCF3* de *L. (L.) amazonensis*. (A) Representação esquemática dos genes *ABCF3*, *PURO* e *BLAST*, contendo os iniciadores utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados para o mapeamento das linhagens mutantes para o gene *ABCF2*. (B) Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR utilizando os iniciadores indicados em (A), a partir do DNA genômico da linhagem *La* (WT) e do clone da linhagem *La-sKO-ABCF3*. (C) Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR utilizando os iniciadores indicados em (A), a partir do DNA genômico da linhagem *La* (WT) e do clone da linhagem *La-dKO-ABCF3*. PM, peso molecular 100bp DNA ladder RTU; (-) controle negativo da PCR.

5.4. Crescimento *in vitro* de promastigotas das linhagens selvagem, superexpressoras e mutantes dos genes *ABCFs*

Para avaliar se os superexpressores e os mutantes dos respectivos genes *ABCFs* poderiam afetar o crescimento de promastigotas do parasito, foram realizadas curvas de crescimento das respectivas linhagens geradas. As linhagens *La*-pSP72 α HYG α e os superexpressores dos genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*, não apresentaram variação significativa no crescimento quando comparados com a linhagem *La* (WT) (Fig. 18A). Em relação as linhagens *La*-Cas9 e mutantes dos genes *ABCFs*, estas também não apresentaram diferença significativa quando comparadas com a linhagem *La* (WT) (Fig. 18 B, C e D).

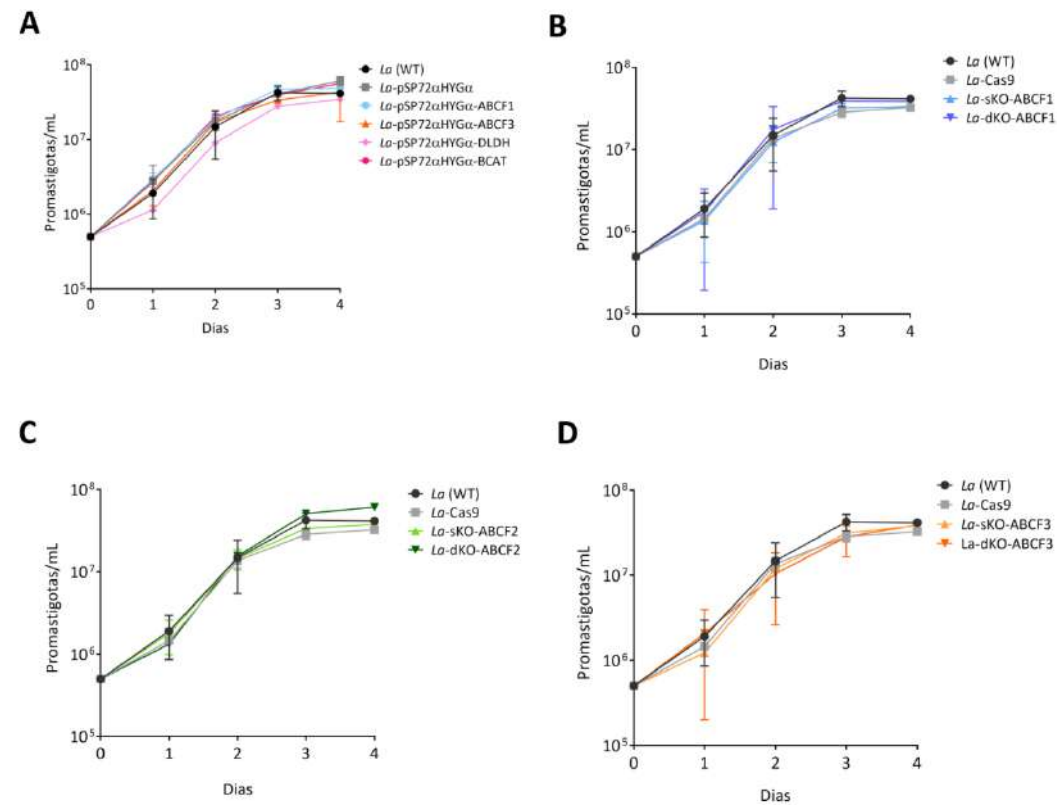


Figura 18. Curvas de crescimento das linhagens selvagem, superexpressoras e dos clones mutantes dos genes *ABCFs*. As curvas de crescimento foram realizadas a partir de um inóculo de 5×10^5 promastigotas por mL. Está representado a média de três experimentos independentes. (A) Curvas de crescimento das linhagens *La* (WT), *La*-pSP72αHYGα e os respectivos superexpressores dos genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*. (B) Curvas de crescimento das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e os respectivos clones dos mutantes do gene *ABCF1*. (C) Curvas de crescimento das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e os respectivos clones dos mutantes do gene *ABCF2*. (D) Curva de crescimento das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e os respectivos clones dos mutantes do gene *ABCF3*.

5.5. Avaliação da suscetibilidade à PAR das linhagens transfectadas e superexpressoras dos genes *ABCFs*, *DLDH* e *BCAT*

A suscetibilidade *in vitro* à PAR em promastigotas das linhagens superexpressoras foi determinada utilizando o teste do MTT. Após os experimentos, foram realizadas curvas de inibição de crescimento celular para determinar o valor de EC₅₀, concentração do fármaco que inibe a viabilidade celular em 50%. Os valores de EC₅₀, obtidos das linhagens, indicaram que a linhagem superexpressora do gene *ABCF1* apresentou um valor de EC₅₀ de cerca de 1,7 vezes maior que a linhagem transfectada com o vetor vazio (*La*-pSP72αHYGα) e com a linhagem *La* (WT) (Tabela 4 e Fig. 19). Os valores de EC₅₀ dos parasitos superexpressores do gene *ABCF3* não apresentaram diferença significativa quando comparados com os valores de EC₅₀ das linhagens *La*-pSP72αHYGα e *La* (WT) (Tabela 4 e Fig. 19). Os genes *BCAT* e *DLDH* foram previamente envolvidos na resistência à PAR em *L. (L.) infantum* (Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018). No entanto, valor de EC₅₀ da linhagem superexpressora do gene *DLDH* foi quase metade do que as linhagens controle [*La*-pSP72αHYGα e *La* (WT)] (Tabela 4 e Fig. 19). Já a linhagem superexpressora para o gene *BCAT* apresentou um valor de EC₅₀ de cerca de 1,6 vezes maior que as linhagens *La*-pSP72αHYGα ou *La* (WT) (Tabela 4 e Fig. 19). Estes resultados apresentados indicam que apenas o gene *BCAT* conferiu resistência à PAR em *L. (L.) amazonensis*, além do gene *ABCF1* quando superexpressos no parasito (Tabela 4 e Fig. 19).

Tabela 4. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota da linhagem *La* (WT), *La*-pSP72αHYGα e das linhagens transfectantes superexpressoras dos genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*.

Linhagens	EC ₅₀ ± DP (μM)	(n) ¹
<i>La</i> (WT)	91,75 ± 6,85	5
<i>La</i> -pSP72αHYGα	90,38 ± 8,90	5
<i>La</i> -pSP72αHYGα-ABCF1	157,97 ± 4,57	5
<i>La</i> -pSP72αHYGα-ABCF3	84,49 ± 13,76	5
<i>La</i> -pSP72αHYGα-DLDH	57,45 ± 12,18	5
<i>La</i> - pSP72αHYGα-BCAT	151,17 ± 4,23	5

¹ número de experimentos independentes realizados em triplicata.

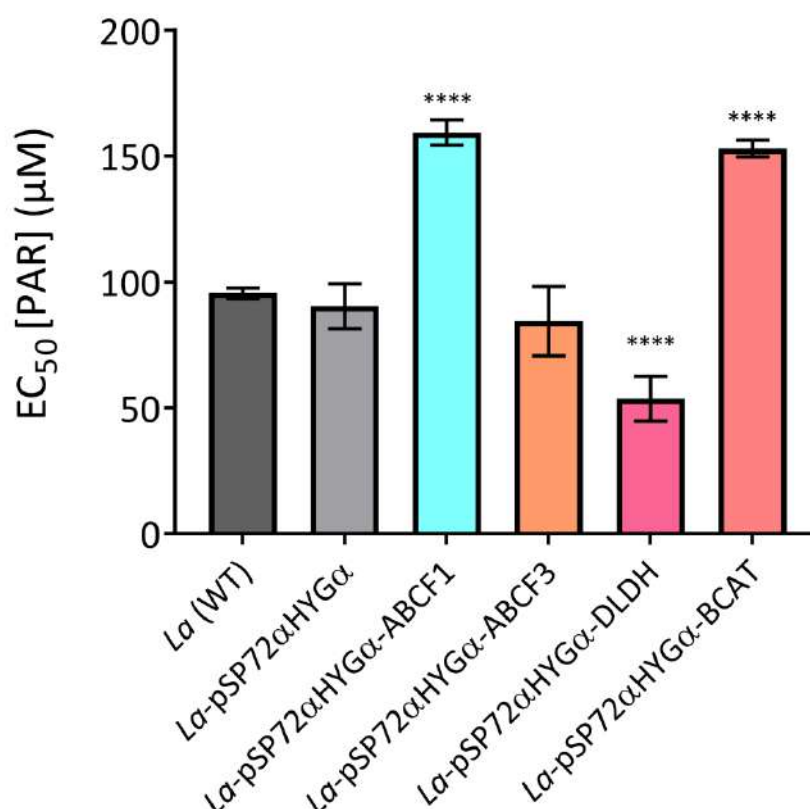


Figura 19. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota da linhagem *La* (WT) e das linhagens transfectantes superexpressoras dos genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*. Está representado a média e desvio padrão dos valores de EC₅₀ das linhagens indicadas após incubação com o fármaco por um período de 48 horas. **** ($p < 0,0001$) em comparação com a linhagem *La* (WT) e *La*-pSP72αHYGα utilizando o teste “One way ANOVA” do software GraphPad Prism 7.

5.6. Avaliação da suscetibilidade à PAR das linhagens selvagem e mutantes para os genes *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis*

Uma vez caracterizado o genótipo dos clones das linhagens mutantes dos genes *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis*, a suscetibilidade *in vitro* à PAR foi determinada na forma promastigota utilizando o teste do MTT. Os valores de EC₅₀ obtidos das linhagens *La*-Cas9, *La*-dKO-ABCF1, *La*-sKO-ABCF2 e *La*-sKO-ABCF3 não apresentaram diferença significativa quando comparados com a linhagem *La* (WT) (Tabela 5 e Fig. 20). Para a linhagem *La*-dKO-ABCF2, o valor de EC₅₀ foi cerca de duas vezes menor que as linhagens *La* (WT) e a *La*-Cas9 (Tabela 5 e Fig. 20), sugerindo que a ausência da proteína ABCF2 (Fig. 16C) pode afetar a suscetibilidade à PAR em *L. (L.) amazonensis*. As linhagens *La*-sKO-ABCF1, *La*-dKO-ABCF1, *La*-sKO-ABCF3 e *La*-dKO-ABCF3 apresentaram valores de EC₅₀ maiores do que as linhagens *La* (WT) e *La*-Cas9, entretanto estes valores não foram

maiores do que 1,5 vezes o EC_{50} das linhagens controle (*La* (WT) e *La*-Cas9) (Tabela 5 e Fig. 20). Estes resultados indicaram que as linhagens que mantiveram uma única cópia do gene *ABCF1* ou *ABCF3* (Fig. 15 e 17) não apresentaram variação significativa nos valores de EC_{50} .

Tabela 5. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e mutantes para os genes *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis*.

Linhagem	$EC_{50} \pm DP$ (μM)	(n) ¹
<i>La</i> (WT)	91,73 $\pm$ 6,34	5
<i>La</i> -Cas9	88,31 $\pm$ 7,56	5
<i>La</i> -sKO-ABCF1	121,76 $\pm$ 12,14	5
<i>La</i> -dKO-ABCF1	108,24 $\pm$ 8,11	5
<i>La</i> -sKO-ABCF2	93,46 $\pm$ 1,31	5
<i>La</i> -dKO-ABCF2	51,30 $\pm$ 6,34	5
<i>La</i> -sKO-ABCF3	115,74 $\pm$ 6,34	5
<i>La</i> -dKO-ABCF3	120,12 $\pm$ 10,84	5

¹ número de experimentos independentes realizados em triplicata.

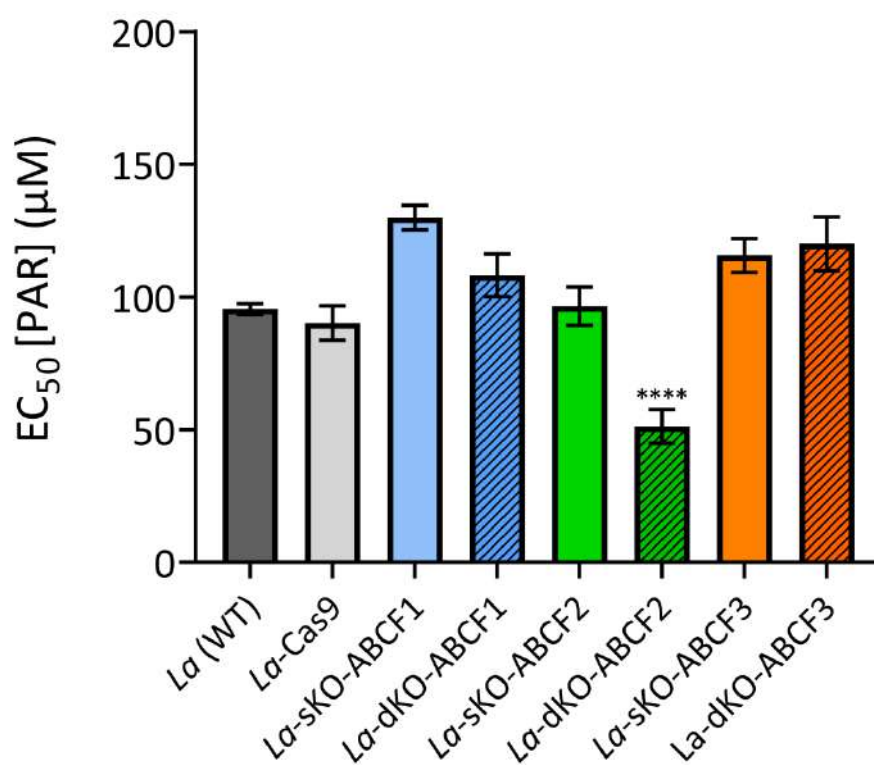


Figura 20. Suscetibilidade à PAR na forma promastigota das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e mutantes para os genes *ABCFs*. Está representado a média e desvio padrão dos valores de

EC₅₀ das linhagens indicadas. **** ($p < 0,0001$) em comparação com as linhagens *La* (WT) e *La-Cas9*, utilizando o teste “One way ANOVA” no programa GraphPad Prism 7.

5.7. Infectividade e crescimento *in vitro* de amastigotas intracelulares das linhagens *La* (WT), *La-Cas9* e mutantes dos genes *ABCFs*

Foi avaliado ainda a capacidade de infecção e replicação de amastigotas intracelulares das linhagens transgênicas em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c, após um período de 48 h e 72 h (Fig. 21). A linhagem *La-Cas9* apresentou uma porcentagem de macrófagos infectados similar, sem diferença significativa, quando comparada com a linhagem *La* (WT). O mesmo foi observado em relação à média de amastigotas por macrófago infectado; nenhuma diferença significativa foi observada entre estas duas linhagens (Tabela 6, Tabela 7, Fig. 21). As linhagens *La-sKO-ABCF1* e *La-dKO-ABCF1*, apresentaram uma porcentagem maior de macrófagos infectados quando comparados com a linhagem *La* (WT) após um período de infecção de 48h e 72h (Tabela 6, Tabela 7, Fig. 21 A e C). Estas linhagens mutantes apresentaram um número maior de amastigotas por macrófago, após infecção de 48h e 72h (Tabela 6, Tabela 7, Fig. 21 B e D).

Tabela 6. Porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago infectado das linhagens *La* (WT), *La-Cas9* e mutantes para o gene *ABCF1* após 48 horas.

Linhagem	Macrófagos infectados (%)	Amastigotas/ macrófago infectado	(n) ¹
<i>La</i> (WT)	48 ± 8	2,97 ± 0,94	2
<i>La-Cas9</i>	36 ± 7	3,48 ± 0,55	2
<i>La-sKO-ABCF1</i>	74 ± 14	4,62 ± 1,79	2
<i>La-dKO-ABCF1</i>	77 ± 10	6,05 ± 1,53	2

¹ número de experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 7. Porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago infectado das linhagens *La* (WT), *La-Cas9* e mutantes para o gene *ABCF1* após 72h.

Linhagem	Macrófagos infectados (%)	Amastigotas/ macrófago infectado	(n) ¹
<i>La</i> (WT)	38 ± 10	4,02 ± 0,95	2
<i>La-Cas9</i>	42 ± 16	4,53 ± 1,64	2
<i>La-sKO-ABCF1</i>	70 ± 11	5,73 ± 1,50	2

La- dKO-ABCF1 87 ± 3 $7,02 \pm 0,96$

2

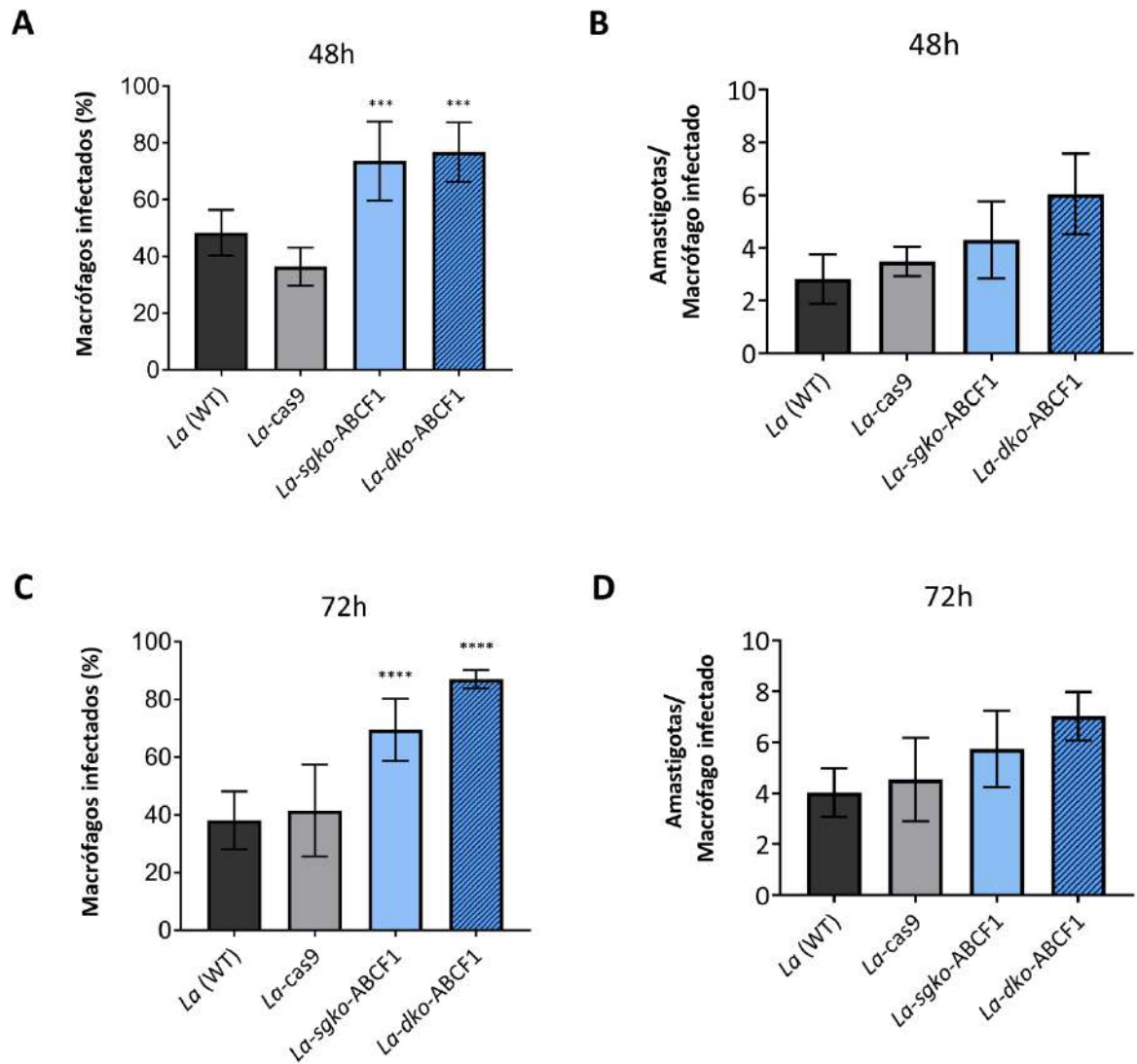
¹ número de experimentos independentes realizados em triplicata.

Figura 21. Porcentagem de infecção e número de amastigotas por macrófago infectado das linhagens *La* (WT), *La*-Cas9 e mutantes para os genes *ABCF1* de *L. (L.) amazonensis* em 48h (A, B) e 72h (C, D). *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) em comparação com a linhagem *La* (WT) e *La*-Cas9 utilizando o teste “One way ANOVA” do programa GraphPad Prism 7.

6. Discussão

Os tratamentos disponíveis para leishmaniose são poucos e sua maioria é utilizada há algum tempo. Estes tratamentos possuem alta toxicidade, variações nas eficácias, dificuldade na adesão ao tratamento devido aos fármacos administrados por via parenteral, custos financeiros altos, relato de resistência emergente aos medicamentos e falta de acesso em áreas regionais (Zulfiqar, Shelper et al. 2017). Os principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses no Brasil são os antimoniais pentavalentes (Pentostam® e Glucantime®), a anfotericina B e a pentamidina (Uliana, Trinconi et al. 2018).

A PAR é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro que já foi demonstrado como um agente oral efetivo para muitos agentes infecciosos (Davidson, den Boer et al. 2009), é um fármaco potencial para o uso no tratamento da leishmaniose tegumentar. Além de apresentar boa eficácia clínica no tratamento da leishmaniose visceral, é um fármaco de baixo custo e o seu período de tratamento é curto, o que diminui as chances dos parasitos se tornarem resistentes. No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de ação e resistência à PAR em *Leishmania*. Neste trabalho foi investigado o papel das proteínas ABCFs na resistência e suscetibilidade à PAR *in vitro* da forma promastigota de *L. (L.) amazonensis* utilizando técnicas de genética molecular. As proteínas ABCF já foram implicadas na resistência aos macrolídeos em procariotos, grupo de antibióticos inibidores da síntese proteica (Kerr 2006). Também foi demonstrado que as proteínas ABCF de procariotos protegem o ribossomo bacteriano da ação de antibióticos através do deslocamento destes do ribossomo (Sharkey, Edwards et al. 2016). Estes estudos sugeriram a possibilidade do possível envolvimento destas proteínas na resistência à PAR em *Leishmania*. Buscas em bancos de dados do genoma indicaram a presença de três genes (*ABCF1*, *ABCF2* e *ABCF3*), localizados respectivamente nos cromossomos 3, 19 e 32 de *L. (L.) mexicana* segundo o TriTrypDB (Aslett, Aurrecoechea et al. 2010). As três cópias dos genes *ABCFs* são conservadas em outras espécies de *Leishmania*, além de outros tripanossomatídeos, *Drosophila melanogaster* e *H. sapiens*, sugerindo a importância destas proteínas no metabolismo celular, particularmente na síntese proteica (Coelho and Cotrim 2018). Sabe-se que o ribossomo é um potencial alvo da PAR (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017).

O alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis* mostrou que proteína ABCF1 possui 30% de identidade com a ABCF2 e 24% com a ABCF3, e entre as proteínas ABCF2 e ABCF3 a identidade é de 33%. A relativa baixa

porcentagem de identidade entre elas indica que estas proteínas provavelmente devem exercer papéis distintos na célula. Em *S. cerevisiae*, 5 cópias dos genes *ABCFs* estão presentes no genoma, e as respectivas proteínas codificadas exercem funções distintas (Belfield and Tuite 1993, Decottignies and Goffeau 1997, Chakraborty 2001, Dong, Lai et al. 2005, Murina, Kasari et al. 2019). Dentre elas, a proteína ARB1, essencial neste organismo (Dong, Lai et al. 2005), tem identidade de cerca de 29% a 40% com as proteínas *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis*, sendo mais similar com a proteína *ABCF2*. Diferentemente em *L. (L.) amazonensis*, foi possível obter mutantes nulos para o gene *ABCF2*.

Os alinhamentos das proteínas *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis* com seus respectivo ortólogos de *H. sapiens* mostrou identidade de 28% à 47%. A proteína *ABCF1* de *H. sapiens* está envolvida no início da tradução e promove a precisão translacional, além de participar de um mecanismo alternativo de início da tradução (Ero, Kumar et al. 2019, Ousalem, Singh et al. 2019). Ainda pouco se conhece sobre a função específica das proteínas *ABCFs*, mas é provável que exerçam funções similares em *Leishmania*.

Após a análise *in silico* das sequências proteicas, foram geradas construções episomais no vetor de expressão em *Leishmania* pSP72 α HYG α (El Fadili, Messier et al. 2005, Coelho, Leprohon et al. 2012), contendo os genes *ABCF1* e *ABCF3*, além dos genes *BCAT* e *DLDH* previamente envolvidos na resistência à PAR em *L. (L.) infantum* (Rastrojo, Garcia-Hernandez et al. 2018).

Posteriormente, para a geração de mutantes nulos foi necessário padronizar para a espécie *L. (L.) amazonensis* a tecnologia de CRISPR/Cas9 descrita por Beneke et al. (2017). É importante ressaltar que esta metodologia descrita por Beneke et al. (2017), já foi utilizada em algumas espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* (Martel, Beneke et al. 2017, Adai, Kröber-Boncardo et al. 2020, Bea, Kröber-Boncardo et al. 2020, Burge, Damianou et al. 2020). No entanto, até a redação desta dissertação de Mestrado, este protocolo ainda não havia sido validado em *L. (L.) amazonensis*, conforme descrito neste estudo.

Para testar esta ferramenta e a sua padronização, foi utilizado como alvo inicial o gene *MT* para a geração de uma linhagem com um dos alelos deletado (*La-sKO-MT*). Este gene codifica o transportador de MF (*MT*) e é responsável pelo fenótipo de resistência à MF quando mutado ou deletado (Perez-Victoria, Gamarro et al. 2003, Perez-Victoria, Sanchez-Canete et al. 2006, Coelho, Trinconi et al. 2014). Conforme esperado, observou-se que a linhagem *La-sKO-MT* apresentou um valor de EC₅₀ significativamente maior que a linhagem

selvagem e/ou a linhagem expressora da proteína da enzima Cas9 (*La*-Cas9). Com o sucesso na obtenção deste mutante, assim como dos mutantes para os alelos dos genes *ABCFs*, pode-se concluir que a padronização do protocolo descrito por Beneke et al. (2017) foi validada neste estudo para a espécie *L. (L.) amazonensis*.

Uma vez validado o protocolo de CRISPR/Cas9, foi a vez de obter os mutantes para os genes *ABCFs*. Primeiramente, obtivemos apenas linhagens mutantes para um dos alelos de cada um dos genes *ABCFs* (*La*-sKO-*ABCF1*, *La*-sKO-*ABCF2* e *La*-sKO-*ABCF3*). Após os parasitos serem selecionados em presença dos respectivos antibióticos de seleção, foram selecionados clones referentes às linhagens geradas. Após uma segunda transfecção, foram obtidos mutantes para os genes *ABCF1* e *ABCF3* contendo os genes marcadores de resistência *PUR*O e *BLAST*, curiosamente, estes parasitos continham ainda uma cópia do gene selvagem (*La*-dKO-*ABCF1* e *La*-dKO-*ABCF3*). Para o gene *ABCF2* foi possível gerar um mutante nulo. Os protozoários *Leishmania* spp. são capazes de alterar o número de cópias dos seus genes, fenômeno que constitui uma grande fonte de adaptabilidade do parasito (Dujardin, Mannaert et al. 2014). Também podem variar o número de cópias de cromossomos, mecanismo compensatório utilizado como resposta à mudanças de ambientes (Sterkers, Crobu et al. 2014, Dumetz, Imamura et al. 2017) ou ainda gerar o aparecimento de elementos extracromossomais que contêm o gene alvo, inviabilizando a geração do mutante nulo (Duncan, Jones et al. 2017). Estes fenômenos podem ter ocorrido durante a tentativa de geração dos mutantes nulos, tanto em uma única transfecção quanto em duas transfecções, para os genes *ABCF1* e *ABCF3*. Estes resultados indicam a essencialidade dos genes *ABCF1* e *ABCF3*.

Uma vez selecionadas as linhagens detentoras dos plasmídeos com os genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*, e caracterizados os genótipos das linhagens mutantes dos genes *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis*, foi investigado se havia alteração no crescimento *in vitro* destas linhagens. Além disso, foi investigado a suscetibilidade *in vitro* à PAR na forma promastigota utilizando o teste MTT.

O crescimento *in vitro* de promastigotas das linhagens *La*-pSP72αHYGα e os superexpressores dos genes *ABCF1*, *ABCF3*, *DLDH* e *BCAT*, não apresentaram variação significativa no crescimento quando comparados com a linhagem *La* (WT). As linhagens *La*-Cas9, mutantes dos genes *ABCFs*, também não apresentaram diferença significativa quando comparadas com as linhagens *La*-Cas9 e *La* (WT). Portanto, a superexpressão ou mutação nos alelos destes genes não afetou o crescimento dos promastigotas.

O superexpressor do gene *ABCF1* apresentou um valor de EC_{50} de cerca de 1,7 vezes maior que a linhagem *La*-pSP72 α HYG α e a *La* (WT). Os valores de EC_{50} dos parasitos superexpressores do gene *ABCF3* não apresentaram diferença significativa quando comparados com os valores de EC_{50} das linhagens *La*-pSP72 α HYG α e *La* (WT).

No trabalho realizado por Rastrojo, García-Hernández et al. (2018), primeiramente foi investigado o transcriptoma de uma linhagem de *L. (L.) infantum* resistente à PAR e observou-se que os transcritos dos genes *DLDH* e *BCAT* estavam aumentados quando comparados à linhagem selvagem. Após esta observação, estes genes foram clonados no plasmídeo pLEXSY e superexpressos em *L. (L.) infantum*. Ambos os superexpressores obtidos mostraram fenótipo de resistência à PAR. Nos nossos experimentos, a linhagem superexpressora para o gene *BCAT* apresentou um valor de EC_{50} de cerca de 1,6 vezes maior que a linhagem *La*-pSP72 α HYG α ou a *La* (WT). Este fenótipo de resistência foi maior do que o encontrado em *L. (L.) infantum*, que apresentou um valor de EC_{50} de cerca de 1,4 vezes maior (Rastrojo, García-Hernández et al. 2018). O valor de EC_{50} da linhagem superexpressora do gene *DLDH* foi quase metade das linhagens controle [*La*-pSP72 α HYG α e *La* (WT)], enquanto naquele estudo, o valor de EC_{50} foi cerca de duas vezes maior. A diferença dos fenótipos de resistência à PAR obtidos neste estudo, comparados com o estudo citado, pode ser explicado pelas espécies diferentes de *Leishmania* ou ainda devido a diferença de concentração de antibiótico de seleção. Para a seleção dos superexpressores dos genes *BCAT* e *DLDH*, foi utilizado 64 μ g/mL de higromicina B, enquanto no trabalho realizado por Rastrojo, García-Hernández et al. (2018), foi utilizado 100 μ g/mL deste antibiótico.

Na avaliação da suscetibilidade à PAR das linhagens mutantes para os genes *ABCFs* de *L. (L.) amazonensis*, os valores de EC_{50} obtidos das linhagens *La*-Cas9 e *La*-sKO-*ABCF2* não apresentaram diferença significativa quando comparadas à *La* (WT). Para a linhagem *La*-dKO-*ABCF2*, o valor de EC_{50} foi a metade da linhagem selvagem, sugerindo que a ausência da proteína *ABCF2* pode afetar a suscetibilidade à PAR em *L. (L.) amazonensis*. As linhagens *La*-sKO-*ABCF1*, *La*-dKO-*ABCF1*, *La*-sKO-*ABCF3* e *La*-dKO-*ABCF3* apresentaram valores de EC_{50} maiores do que a linhagem *La* (WT) e a *La*-Cas9, entretanto nenhum destes valores foram maiores que 1,3 vezes o valor de EC_{50} das linhagens controle.

O superexpressor do gene *ABCF1* que confere resistência à PAR *in vitro*, possui em sua sequência proteica um domínio de superhélice ou *coiled coil* que pode estar envolvido em diversas funções, por exemplo, na sustentação estrutural de organelas, reparo e replicação

do material genético, transporte de vesículas, dentre outras (Truebestein and Leonard 2016, Ero, Kumar et al. 2019, Ousalem, Singh et al. 2019). A superexpressão desse gene parece proteger o ribossomo através do deslocamento do fármaco, promovendo o fenótipo de resistência à PAR. As proteínas ABCF que conferem resistência à antibióticos que conferem resistência aos inibidores do alongamento da tradução (como a PAR) são capazes de fazer a dissociação do antibiótico no ribossomo (Sharkey, Edwards et al. 2016, Ero, Kumar et al. 2019, Ousalem, Singh et al. 2019). A PAR se prende no ribossomo no sítio P, local onde ocorre a interação do ribossomo com o tRNA, interferindo na fidelidade traducional (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017). A proteína ABCF ligada à uma molécula de ATP, consegue se ligar no sítio E, se inserindo no sítio *peptidyl transferase center* (PTC) e no *nascent peptide exit tunnel* (NPET) gerando mudança estrutural da organela e fazendo com que a ligação do fármaco com o ribossomo seja interrompida (Ero, Kumar et al. 2019, Ousalem, Singh et al. 2019). Nessa mesma linha de raciocínio, o mutante nulo do gene *ABCF2* apresentou maior suscetibilidade à PAR, sugerindo que o ribossomo está sem essa possível via de proteção contra o fármaco. Para a confirmação destes achados, ainda seria necessário a geração da linhagem superexpressora deste gene, assim como determinar a localização desta proteína.

Foi avaliado ainda a capacidade de infecção e replicação de amastigotas intracelulares das linhagens transgênicas em macrófagos derivados de medula óssea. As linhagens *La*-sKO-ABCF1 e *La*-dKO-ABCF1, apresentaram uma porcentagem maior de macrófagos infectados quando comparados com a *La* (WT) após um período de infecção de 48h e 72h. Estas linhagens mutantes apresentaram ainda um número maior de amastigotas por macrófago. Outros estudos ainda são necessários para confirmar esses achados, mas estes dados sugerem que a dosagem proteica da proteína pode afetar a infectividade e a replicação de amastigotas intracelulares.

7. Conclusão

Através do estudo da avaliação da atividade da PAR *in vitro* dos superexpressores e knockouts gênicos das proteínas ABCFs de *L. (L.) amazonensis*, pode-se concluir:

- Os genes que codificam as proteínas ABCFs de *Leishmania* são conservados em número e sequência quando comparados com seus respectivos ortólogos de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos.
- A superexpressão ou mutante dos alelos dos genes ABCFs não afetaram o crescimento *in vitro* dos promastigotas.
- A superexpressão do gene *ABCF1* conferiu resistência à PAR *in vitro* nas formas promastigotas.
- Os genes *ABCF1* e *ABCF3* indicam ser essenciais.
- A ausência da proteína ABCF2 aumentou a suscetibilidade à PAR em *L. (L.) amazonensis*.

8. Referências

- Adaui, V., C. Kröber-Boncardo, C. Brinker, H. Zirpel, J. Sellau, J. Arévalo, J. C. Dujardin and J. Clos (2020). "Application of CRISPR/Cas9-Based Reverse Genetics in *Leishmania braziliensis*: Conserved Roles for HSP100 and HSP23." Genes (Basel) **11**(10).
- Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley and D. L. Sacks (2009). "Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector." Science **324**(5924): 265-268.
- Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin and M. den Boer (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.
- Araujo-Santos, J. M., A. Parodi-Talice, S. Castanys and F. Gamarro (2005). "The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*." Biochem Biophys Res Commun **330**(1): 349-355.
- Aslett, M., C. Aurrecoechea, M. Berriman, J. Brestelli, B. P. Brunk, M. Carrington, D. P. Depledge, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, M. J. Gardner, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, C. Hertz-Fowler, R. Houston, F. Innamorato, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. Kraemer, W. Li, F. J. Logan, J. A. Miller, S. Mitra, P. J. Myler, V. Nayak, C. Pennington, I. Phan, D. F. Pinney, G. Ramasamy, M. B. Rogers, D. S. Roos, C. Ross, D. Sivam, D. F. Smith, G. Srinivasamoorthy, C. J. Stoeckert, Jr., S. Subramanian, R. Thibodeau, A. Tivey, C. Treatman, G. Velarde and H. Wang (2010). "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D457-462.
- Bassett, A. and J. L. Liu (2014). "CRISPR/Cas9 mediated genome engineering in *Drosophila*." Methods **69**(2): 128-136.
- Bates, P. A. (2018). "Revising *Leishmania*'s life cycle." Nat Microbiol **3**(5): 529-530.
- Bates, P. A. and L. Tetley (1993). "*Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH." Exp Parasitol **76**(4): 412-423.
- Batista, M. F., C. A. Nájera, I. Meneghelli and D. Bahia (2020). "The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival." Front Cell Dev Biol **8**: 396.
- Bea, A., C. Kröber-Boncardo, M. Sandhu, C. Brinker and J. Clos (2020). "The *Leishmania donovani* SENP Protease Is Required for SUMO Processing but Not for Viability." Genes (Basel) **11**(10).
- Belfield, G. P. and M. F. Tuite (1993). "Translation elongation factor 3: a fungus-specific translation factor?" Mol Microbiol **9**(3): 411-418.
- Beneke, T., R. Madden, L. Makin, J. Valli, J. Sunter and E. Gluenz (2017). "A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids." R Soc Open Sci **4**(5): 170095.
- Bhandari, V., S. Sundar, J. C. Dujardin and P. Salotra (2014). "Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother **58**(5): 2580-2585.
- Bhattacharya, A., P. Leprohon, S. Bigot, P. K. Padmanabhan, A. Mukherjee, G. Roy, H. Gingras, A. Mestdagh, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2019). "Coupling chemical mutagenesis to next generation sequencing for the identification of drug resistance mutations in *Leishmania*." Nat Commun **10**(1): 5627.

- Bray, P. G., M. P. Barrett, S. A. Ward and H. P. de Koning (2003). "Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future." Trends Parasitol **19**(5): 232-239.
- Burge, R. J., A. Damianou, A. J. Wilkinson, B. Rodenko and J. C. Mottram (2020). "Leishmania differentiation requires ubiquitin conjugation mediated by a UBC2-UEV1 E2 complex." PLoS Pathog **16**(10): e1008784.
- Burza, S., S. L. Croft and M. Boelaert (2018). "Leishmaniasis." Lancet **392**(10151): 951-970.
- Callahan, H. L. and S. M. Beverley (1991). "Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*." J Biol Chem **266**(28): 18427-18430.
- Cavalcante-Costa, V. S., M. Costa-Reginaldo, T. Queiroz-Oliveira, A. C. S. Oliveira, N. F. Couto, D. O. Dos Anjos, J. Lima-Santos, L. O. Andrade, M. F. Horta and T. Castro-Gomes (2019). "Leishmania amazonensis hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts." J Cell Sci **132**(6).
- Chakraborty, K. (2001). "Translational regulation by ABC systems." Res Microbiol **152**(3-4): 391-399.
- Chakravarty, J. and S. Sundar (2019). "Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis." Expert Opin Pharmacother **20**(10): 1251-1265.
- Chawla, B., A. Jhingran, A. Panigrahi, K. D. Stuart and R. Madhubala (2011). "Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*." PLoS One **6**(10): e26660.
- Chrusciak-Talhari, A., R. Dietze, C. Chrusciak Talhari, R. M. da Silva, E. P. Gadelha Yamashita, G. de Oliveira Penna, P. R. Lima Machado and S. Talhari (2011). "Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil." Am J Trop Med Hyg **84**(2): 255-260.
- Clayton, C. (2019). "Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription." Open Biol **9**(6): 190072.
- Clayton, C. E. (2016). "Gene expression in Kinetoplastids." Curr Opin Microbiol **32**: 46-51.
- Coelho, A. C., S. M. Beverley and P. C. Cotrim (2003). "Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 83-90.
- Coelho, A. C., S. Boisvert, A. Mukherjee, P. Leprohon, J. Corbeil and M. Ouellette (2012). "Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing." PLoS Negl Trop Dis **6**(2): e1512.
- Coelho, A. C. and P. C. Cotrim (2018). The Role of ABC Transporters in Drug-Resistant *Leishmania*. Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments. A. Ponte-Sucre and M. Padrón-Nieves. Cham, Springer International Publishing: 247-272.
- Coelho, A. C., P. Leprohon and M. Ouellette (2012). "Generation of *Leishmania* hybrids by whole genomic DNA transformation." PLoS Negl Trop Dis **6**(9): e1817.
- Coelho, A. C., C. T. Trinconi, C. H. Costa and S. R. Uliana (2014). "In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **8**(7): e2999.
- Coser, E. M., B. A. Ferreira, N. Branco, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2020). "Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*:

- Direct correlation between susceptibility in vitro and the treatment outcome in vivo." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **14**: 91-98.
- Coser, E. M., B. A. Ferreira, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2021). "Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of Leishmania species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil." Acta Trop **215**: 105806.
- Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.
- Davidson, R. N., M. den Boer and K. Ritmeijer (2009). "Paromomycin." Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(7): 653-660.
- Decottignies, A. and A. Goffeau (1997). "Complete inventory of the yeast ABC proteins." Nat Genet **15**(2): 137-145.
- Docampo, R. and G. Huang (2016). "Acidocalcisomes of eukaryotes." Curr Opin Cell Biol **41**: 66-72.
- Dong, J., R. Lai, J. L. Jennings, A. J. Link and A. G. Hinnebusch (2005). "The novel ATP-binding cassette protein ARB1 is a shuttling factor that stimulates 40S and 60S ribosome biogenesis." Mol Cell Biol **25**(22): 9859-9873.
- Dorlo, T. P., P. P. van Thiel, A. D. Huitema, R. J. Keizer, H. J. de Vries, J. H. Beijnen and P. J. de Vries (2008). "Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients." Antimicrob Agents Chemother **52**(8): 2855-2860.
- Dujardin, J. C., A. Mannaert, C. Durrant and J. A. Cotton (2014). "Mosaic aneuploidy in Leishmania: the perspective of whole genome sequencing." Trends Parasitol **30**(12): 554-555.
- Dumetz, F., H. Imamura, M. Sanders, V. Seblova, J. Myskova, P. Pescher, M. Vanaerschot, C. J. Meehan, B. Cuypers, G. De Muylder, G. F. Späth, G. Bussotti, J. R. Vermeesch, M. Berriman, J. A. Cotton, P. Volf, J. C. Dujardin and M. A. Domagalska (2017). "Modulation of Aneuploidy in Leishmania donovani during Adaptation to Different In Vitro and In Vivo Environments and Its Impact on Gene Expression." mBio **8**(3).
- Duncan, S. M., N. G. Jones and J. C. Mottram (2017). "Recent advances in Leishmania reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite." Mol Biochem Parasitol **216**: 30-38.
- El Fadili, A., C. Kundig and M. Ouellette (2002). "Characterization of the folylpolyglutamate synthetase gene and polyglutamylation of folates in the protozoan parasite Leishmania." Mol Biochem Parasitol **124**(1-2): 63-71.
- El Fadili, K., N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopoulou, D. Legare and M. Ouellette (2005). "Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 1988-1993.
- Ero, R., V. Kumar, W. Su and Y. G. Gao (2019). "Ribosome protection by ABC-F proteins-Molecular mechanism and potential drug design." Protein Sci **28**(4): 684-693.
- Esch, K. J. and C. A. Petersen (2013). "Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals." Clin Microbiol Rev **26**(1): 58-85.
- Fagundes-Silva, G. A., G. A. Romero, E. Cupolillo, E. P. Yamashita, A. Gomes-Silva, J. A. Guerra and A. M. Da-Cruz (2015). "Leishmania (Viannia) naiffi: rare enough to be neglected?" Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(6): 797-800.
- Fernandez, M. M., E. L. Malchiodi and I. D. Algranati (2011). "Differential effects of paromomycin on ribosomes of Leishmania mexicana and mammalian cells." Antimicrob Agents Chemother **55**(1): 86-93.

- Fong, D., M. M. Chan, R. Rodriguez, L. J. Gately, J. D. Berman and M. Grogl (1994). "Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene." Am J Trop Med Hyg **51**(6): 758-766.
- Gadelha, E. P. N., R. Ramasawmy, B. da Costa Oliveira, N. Morais Rocha, J. A. de Oliveira Guerra, G. Allan Villa Rouco da Silva, T. Gabrielle Ramos de Mesquita, C. Chrusciak Talhari Cortez and A. Chrusciak Talhari (2018). "An open label randomized clinical trial comparing the safety and effectiveness of one, two or three weekly pentamidine isethionate doses (seven milligrams per kilogram) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region." PLoS Negl Trop Dis **12**(10): e0006850.
- Gazanion, E., C. Fernandez-Prada, B. Papadopoulou, P. Leprohon and M. Ouellette (2016). "Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(21): E3012-3021.
- Gottesman, M. M. and I. Pastan (1993). "Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter." Annu Rev Biochem **62**: 385-427.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell and P. J. Myler (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-442.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. *et al.* Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. **Gene**, 77, n. 1, p. 61-68, Apr 15 1989.
- Jha, S. N., N. K. Singh and T. K. Jha (1991). "Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial." J Assoc Physicians India **39**(4): 314-316.
- Jha, T. K., S. Sundar, C. P. Thakur, P. Bachmann, J. Karbwang, C. Fischer, A. Voss and J. Berman (1999). "Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med **341**(24): 1795-1800.
- Jhingran, A., B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett and R. Madhubala (2009). "Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **164**(2): 111-117.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn and S. M. Beverley (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-1094.

- Kasari, V., A. A. Pochopien, T. Margus, V. Murina, K. Turnbull, Y. Zhou, T. Nissan, M. Graf, J. Nováček, G. C. Atkinson, M. J. O. Johansson, D. N. Wilson and V. Hauryliuk (2019). "A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ABCF protein New1 in translation termination/recycling." *Nucleic Acids Res* **47**(16): 8807-8820.
- Kerr, I. D. (2004). "Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition." *Biochem Biophys Res Commun* **315**(1): 166-173.
- Kerr, S. F. (2006). "Molecular trees of trypanosomes incongruent with fossil records of hosts." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**(1): 25-30.
- Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." *Clin Dermatol* **17**(3): 279-289.
- Koressaar, T. and M. Remm (2007). "Enhancements and modifications of primer design program Primer3." *Bioinformatics* **23**(10): 1289-1291.
- Kulshrestha, A., R. Singh, D. Kumar, N. S. Negi and P. Salotra (2011). "Antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* are susceptible to paromomycin and sitamaquine." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(6): 2916-2921.
- Lainson, R. and J. J. Shaw (1987). Evolution, classification and geographical distribution. . *The Leishmaniasis in Biology and Medicine.* . W. Peters and R. Killick-Kendrick. London, Academic Press. **1**: 120.
- Leprohon, P., D. Legare, I. Girard, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2006). "Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites." *Eukaryot Cell* **5**(10): 1713-1725.
- Li, Z., I. Lee, E. Moradi, N. J. Hung, A. W. Johnson and E. M. Marcotte (2009). "Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics." *PLoS Biol* **7**(10): e1000213.
- Lux, H., N. Heise, T. Klenner, D. Hart and F. R. Opperdoes (2000). "Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*." *Mol Biochem Parasitol* **111**(1): 1-14.
- Machado, P. R., J. Ampuero, L. H. Guimaraes, L. Villasboas, A. T. Rocha, A. Schriefer, R. S. Sousa, A. Talhari, G. Penna and E. M. Carvalho (2010). "Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial." *PLoS Negl Trop Dis* **4**(12): e912.
- Martel, D., T. Beneke, E. Gluenz, G. F. Späth and N. Rachidi (2017). "Characterisation of Casein Kinase 1.1 in *Leishmania donovani* Using the CRISPR Cas9 Toolkit." *Biomed Res Int* **2017**: 4635605.
- Marton, M. J., C. R. Vazquez de Aldana, H. Qiu, K. Chakraborty and A. G. Hinnebusch (1997). "Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2alpha kinase GCN2." *Mol Cell Biol* **17**(8): 4474-4489.
- Maslov, D. A., F. R. Opperdoes, A. Y. Kostygov, H. Hashimi, J. Lukeš and V. Yurchenko (2019). "Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution." *Parasitology* **146**(1): 1-27.
- Maurice, T. C., C. E. Mazzucco, C. S. Ramanathan, B. M. Ryan, G. A. Warr and J. W. Puziss (1998). "A highly conserved intraspecies homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor-3 encoded by the HEF3 gene." *Yeast* **14**(12): 1105-1113.
- Michaeli, S. (2011). "Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome." *Future Microbiol* **6**(4): 459-474.
- Murina, V., M. Kasari, H. Takada, M. Hinnu, C. K. Saha, J. W. Grimshaw, T. Seki, M. Reith, M. Putrinš, T. Tenson, H. Strahl, V. Hauryliuk and G. C. Atkinson (2019). "ABCF ATPases Involved in Protein Synthesis, Ribosome Assembly and Antibiotic

- Resistance: Structural and Functional Diversification across the Tree of Life." J Mol Biol **431**(18): 3568-3590.
- Musa, A., E. Khalil, A. Hailu, J. Olobo, M. Balasegaram, R. Omollo, T. Edwards, J. Rashid, J. Mbui, B. Musa, A. A. Abuzaid, O. Ahmed, A. Fadlalla, A. El-Hassan, M. Mueller, G. Mucee, S. Njoroge, V. Manduku, G. Mutuma, L. Apadet, H. Lodenyo, D. Mutea, G. Kirigi, S. Yifru, G. Mengistu, Z. Hurissa, W. Hailu, T. Weldegebreal, H. Tafes, Y. Mekonnen, E. Makonnen, S. Ndegwa, P. Sagaki, R. Kimutai, J. Kesusu, R. Owiti, S. Ellis and M. Wasunna (2012). "Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial." PLoS Negl Trop Dis **6**(6): e1674.
- Nicholas, K. B., Nicholas Jr H. B., Deerfield D.W (1997). "GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation." Embnew News **4**:14.
- Oliveira, C. C., H. G. Lacerda, D. R. Martins, J. D. Barbosa, G. R. Monteiro, J. W. Queiroz, J. M. Sousa, M. F. Ximenes and S. M. Jeronimo (2004). "Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface." Acta Trop **90**(2): 155-162.
- Opperdoes, F. R. and P. A. Michels (1993). "The glycosomes of the Kinetoplastida." Biochimie **75**(3-4): 231-234.
- Ouellette, M., F. Fase-Fowler and P. Borst (1990). "The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene." Embo J **9**(4): 1027-1033.
- Ousalem, F., S. Singh, O. Chesneau, J. F. Hunt and G. Boël (2019). "ABC-F proteins in mRNA translation and antibiotic resistance." Res Microbiol **170**(8): 435-447.
- Pace, D. (2014). "Leishmaniasis." J Infect **69 Suppl 1**: S10-18.
- Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith and M. Berriman (2007). "Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease." Nat Genet **39**(7): 839-847.
- Perez-Victoria, F. J., S. Castanys and F. Gamarro (2003). "*Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward Translocation of the Drug." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2397-2403.
- Perez-Victoria, F. J., F. Gamarro, M. Ouellette and S. Castanys (2003). "Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance." J Biol Chem **278**(50): 49965-49971.
- Perez-Victoria, F. J., M. P. Sanchez-Canete, S. Castanys and F. Gamarro (2006). "Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites." J Biol Chem **281**(33): 23766-23775.
- Rakotomanga, M., M. Saint-Pierre-Chazalet and P. M. Loiseau (2005). "Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2677-2686.
- Rastrojo, A., R. Garcia-Hernandez, P. Vargas, E. Camacho, L. Corvo, H. Imamura, J. C. Dujardin, S. Castanys, B. Aguado, F. Gamarro and J. M. Requena (2018). "Genomic

- and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **8**(2): 246-264.
- Rastrojo, A., R. García-Hernández, P. Vargas, E. Camacho, L. Corvo, H. Imamura, J. C. Dujardin, S. Castanys, B. Aguado, F. Gamarro and J. M. Requena (2018). "Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **8**(2): 246-264.
- Ready, P. D. (2013). "Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents." *Annu Rev Entomol* **58**: 227-250.
- Real, F., R. O. Vidal, M. F. Carazzolle, J. M. Mondego, G. G. Costa, R. H. Herai, M. Wurtele, L. M. de Carvalho, E. F. RC, R. A. Mortara, C. L. Barbieri, P. Mieczkowski, J. F. da Silveira, M. R. Briones, G. A. Pereira and D. Bahia (2013). "The Genome Sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional Annotation and Extended Analysis of Gene Models." *DNA Res* **20**(6): 567-581.
- Reithinger, R., J. C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander and S. Brooker (2007). "Cutaneous leishmaniasis." *Lancet Infect Dis* **7**(9): 581-596.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandbaken, M. G., J. A. Lupisella, B. DiDomenico and K. Chakraborty (1990). "Protein synthesis in yeast. Structural and functional analysis of the gene encoding elongation factor 3." *J Biol Chem* **265**(26): 15838-15844.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sasikumar, A. N. and T. G. Kinzy (2014). "Mutations in the chromodomain-like insertion of translation elongation factor 3 compromise protein synthesis through reduced ATPase activity." *J Biol Chem* **289**(8): 4853-4860.
- Sattlegger, E. and A. G. Hinnebusch (2000). "Separate domains in GCN1 for binding protein kinase GCN2 and ribosomes are required for GCN2 activation in amino acid-starved cells." *Embo j* **19**(23): 6622-6633.
- Shalev-Benami, M., Y. Zhang, H. Rozenberg, Y. Nobe, M. Taoka, D. Matzov, E. Zimmerman, A. Bashan, T. Isobe, C. L. Jaffe, A. Yonath and G. Skiniotis (2017). "Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin." *Nat Commun* **8**(1): 1589.
- Sharkey, L. K., T. A. Edwards and A. J. O'Neill (2016). "ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. LID - 10.1128/mBio.01975-15 [doi] LID - e01975-15 [pii]." (2150-7511 (Electronic)).
- Sterkers, Y., L. Crobu, L. Lachaud, M. Pagès and P. Bastien (2014). "Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics." *Trends Parasitol* **30**(9): 429-435.
- Steverding, D. (2017). "The history of leishmaniasis." *Parasit Vectors* **10**(1): 82.
- Sundar, S. (2001). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis." *Trop Med Int Health* **6**(11): 849-854.
- Sundar, S. and J. Chakravarty (2013). "Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy." *Expert Opin Pharmacother* **14**(1): 53-63.
- Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, S. K. Bhattacharya and M. Rai (2006). "Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **100 Suppl 1**: S26-33.
- Sundar, S., K. Pai, R. Kumar, K. Pathak-Tripathi, A. A. Gam, M. Ray and R. T. Kenney (2001). "Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India." *Am J Trop Med Hyg* **65**(3): 193-196.

- Sundar, S., M. Rai, J. Chakravarty, D. Agarwal, N. Agrawal, M. Vaillant, P. Olliaro and H. W. Murray (2008). "New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine." Clin Infect Dis **47**(8): 1000-1006.
- Sundar, S., P. K. Sinha, M. Rai, D. K. Verma, K. Nawin, S. Alam, J. Chakravarty, M. Vaillant, N. Verma, K. Pandey, P. Kumari, C. S. Lal, R. Arora, B. Sharma, S. Ellis, N. Strub-Wourgaft, M. Balasegaram, P. Olliaro, P. Das and F. Modabber (2011). "Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial." Lancet **377**(9764): 477-486.
- Thakur, C. P. (1984). "Epidemiological, clinical and therapeutic features of Bihar kala-azar (including post kala-azar dermal leishmaniasis)." Trans R Soc Trop Med Hyg **78**(3): 391-398.
- Truebestein, L. and T. A. Leonard (2016). "Coiled-coils: The long and short of it." Bioessays **38**(9): 903-916.
- Tyzack, J. K., X. Wang, G. J. Belsham and C. G. Proud (2000). "ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner." J Biol Chem **275**(44): 34131-34139.
- Uliana, S. R. (2012). Leishmania e Leishmanioses. Parasitologia Contemporânea. G. Koogan. Rio de Janeiro: 47-56.
- Uliana, S. R. B., C. T. Trinconi and A. C. Coelho (2018). "Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges." Parasitology **145**(4): 464-480.
- Vazquez de Aldana, C. R., M. J. Marton and A. G. Hinnebusch (1995). "GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells." Embo j **14**(13): 3184-3199.
- Zauli, R. C., J. K. Yokoyama-Yasunaka, D. C. Miguel, A. S. Moura, L. Pereira, I. A. da Silva, Jr., L. G. Lemes, M. L. Dorta, M. A. de Oliveira, A. N. Pitaluga, E. A. Ishikawa, J. C. Rodrigues, Y. M. Traub-Cseko, A. T. Bijovsky, F. Ribeiro-Dias and S. R. Uliana (2012). "A dysflagellar mutant of Leishmania (Viannia) braziliensis isolated from a cutaneous leishmaniasis patient." Parasit Vectors **5**: 11.
- Zulfiqar, B., T. B. Shelper and V. M. Avery (2017). "Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development." Drug Discov Today **22**(10): 1516-1531.

9. Anexos

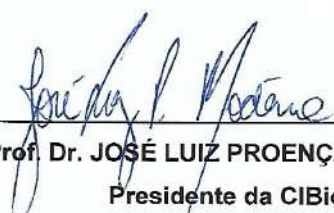
9.1. Certificado de aprovação de uso de Organismos Geneticamente Modificados pela CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio



INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto CIBio/IB Nº. 2016/Tipo 2-01 – **Salmonela entérica: caracterização fenotípica, molecular e uso biotecnológico de mutantes**, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Marcelo Brocchi, em cooperação com o sub-projeto “Investigação do papel das proteínas ABC na resistência à paromomicina em *Leishmania amazonensis*.”, da pós-graduanda **Tábata Rodrigues Costa**, orientada do Prof. Dr. **Adriano Cappellazzo Coelho**, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente. O professor responsável se compromete a incluir os novos alunos no próximo relatório anual CIBio - IB/UNICAMP em dezembro 2019.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,
19 de novembro de 2019.



Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PROENÇA MÓDENA
Presidente da CIBio
Instituto de Biologia – UNICAMP

9.2. Certificado de aprovação de uso de animais pela CEUA/UNICAMP



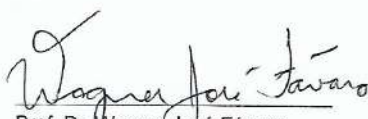
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Investigação do papel das proteínas ABC na resistência à paromomicina em Leishmania amazonensis**, registrada com o nº **5427-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Tábata Rodrigues Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de **14/11/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/02/2020 a 28/02/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 28/02/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	150
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 23.00 Gramas
Sexo:	150 Fêmeas
Origem:	CEMIB UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **24 de janeiro de 2020**.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 90 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

9.3. Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha coautoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Investigação do papel das proteínas ABC (subfamília F) na resistência à paromomicina em *Leishmania amazonensis***, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de julho de 2021

Assinatura:  _____

Nome do(a) autor(a): Tábata Rodrigues Costa

RG n.º 47.643.683-7

Assinatura:  _____

Nome do(a) orientador(a): Adriano Cappellazzo Coelho

RG n.º 26.111.655-1