



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Ingrid Mendes Paschoal

Avaliação da manutenção da resistência ao dano no DNA da *Leishmania amazonensis* superexpressora do gene *lamap* armazenada a - 80°C

Rio de Janeiro

2023

Ingrid Mendes Paschoal

Avaliação da manutenção da resistência ao dano no DNA da *Leishmania amazonensis* superexpressora do gene *lamap* armazenada a - 80°C

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P279 Paschoal, Ingrid Mendes.
Avaliação da manutenção da resistência ao dano no DNA da *Leishmania amazonensis* superexpressora do gene lamap armazenada a - 80°C / Ingrid Mendes Paschoal. – 2023.
56 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Leishmania amazonensis* – Microbiologia – Teses. 2. Reparo do DNA – Genética – Teses. 3. Estresse oxidativo – Genética – Teses. I. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. II. Bello, Alexandre Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU: 593.161:577.21

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura

06/10/2023

Data

Ingrid Mendes Paschoal

**Avaliação da manutenção da resistência ao dano no DNA da *Leishmania amazonensis*
superexpressora do gene *lamap* armazenada a - 80°C**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:
Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 06 de outubro de 2023.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Fabrícia Lima Fontes-Dantas

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes- UERJ

Prof.^a Dra. Cintia Xavier de Mello

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização dele.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Zambi e aos meus guias espirituais por me permitirem chegar aonde cheguei. Saravá!

À minha família por todo amor e apoio. Minha mãe Luana, meu pai Adilson, minha irmã Natassja e minha madastra Vanize, essa vitória também é para vocês!

Ao meu namorado, Pablo, por toda força, amor e carinho que me mantiveram de pé e firme para chegar até aqui. Você é luz!

Ao meu melhor amigo, parceiro de profissão, irmão de fé, Bruno Moraes por estar comigo em meio a todas as loucuras que a vida nos proporciona. Obrigada por dividir tudo isso comigo!

À minha amiga-esposa, Taissa Damasceno pelo grande prazer que é não só dividir o lar, como também a vida com você! Sempre com muitas risadas e reality shows duvidosos!

Aos professores, Dra. Silvia Amaral, Dr. Alexandre Bello, e Msc. Erika Veríssimo por todo conhecimento compartilhado e pela paciência, não estaria aqui se não fosse pela orientação e sabedoria de vocês!

As minhas colegas de bancada, em especial: Andreia Brito, Larissa Siqueira e Rosi Freire pelas diversas dicas e salvações durante os experimentos, vocês são ótimas!

Aos meus amigos da Parasito e da vida, por serem incríveis e me proporcionarem diversas alegrias que me permitem ser uma pessoa mais feliz a cada dia que passa.

Aos meus irmãos de fé da Seara Espiritualista Falangeiros de Aruanda, por todo o ensinamento que venho conquistando sobre a Umbanda e por serem responsáveis pelo meu desenvolvimento espiritual. Em especial, Cristiana, Pablo, Nayse e Helenna, anjos na minha vida!

À UERJ por virar minha segunda casa e permitir conquistar esse título tão sonhado.

A todos aqueles que vibram pela minha vitória e me permitem crescer, tem um pouco de cada um de vocês aqui.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.483664/2020-00.

Orí eni ní um 'ni j' oba.

RESUMO

PASCHOAL, Ingrid Mendes. **Avaliação da manutenção da resistência ao dano no DNA da *Leishmania amazonensis* superexpressora do gene *lamap* armazenada a - 80°C.** 2023. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Protozoários do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos das Leishmanioses, sendo pertencentes às principais Doenças Tropicais Negligenciadas e Endêmicas no Brasil. Para a eliminação de microrganismos intracelulares, tais como *Leishmania* spp, as células imunes produzem espécies reativas do oxigênio (ROS) levando a danos no DNA do parasito com formação de sítios abásicos AP (apurínicos/apirimidínicos). Parasitos como a *Leishmania* apresentam mecanismos de reparo de DNA, incluindo a síntese de enzimas AP Endonuclease. O *lamap* é um gene de AP Endonuclease de *Leishmania amazonensis*, considerado importante fator de virulência, associado a capacidade de sobrevivência do parasito ao estresse oxidativo e possível alvo terapêutico. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a cepa de *L. amazonensis* superexpressora do gene *lamap* criopreservada a -80°C por 3 anos manteria a viabilidade celular frente a danos oxidativos. No ensaio de resposta da *Leishmania (L.) amazonensis* frente ao agente lesivo menadiona, foi observado que tanto a cepa selvagem (JOSEFA) quanto a cepa superexpressora do gene *lamap* (JOSEFA LAMAP) apresentaram viabilidade celular reduzida na concentração 100µM de menadiona ($p < 0.0001$). E a PCR confirmou a perda do plasmídeo na cepa JOSEFA LAMAP. Essa perda do plasmídeo pode estar associada a alteração de temperatura de armazenamento do estoque da cepa, além da troca de antibiótico do meio de cultivo. Os resultados desse trabalho mostram a importância do controle das variáveis em um estudo. Processos como estocagem, manutenção e manipulação de células devem ter metodologias cuidadosas, já que são fatores críticos, principalmente ao nível molecular.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; AP Endonuclease; *lamap*; Reparo de DNA; Leishmaniose.

ABSTRACT

PASCHOAL, Ingrid Mendes. *Evaluation of the maintenance of damage resistance in Leishmania amazonensis DNA overexpressing the lamap gene stored at -80°C*. 2023. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Protozoa of the genus *Leishmania* are etiological agents of Leishmaniasis, belonging to the main Neglected Tropical Diseases and Endemic in Brazil. For the intracellular microorganisms elimination, such as *Leishmania spp*, immune cells produce reactive oxygen species (ROS) leading to damage to the parasite's DNA with the formation of AP abasic sites (apurinic/apyrimidine). Parasites such as *Leishmania* have DNA repair mechanisms, including the synthesis of AP Endonuclease enzymes. *Lamap* is an AP Endonuclease gene from *Leishmania amazonensis*, considered an important virulence factor, associated with the parasite's ability to survive oxidative stress and a possible therapeutic target. The main goal of this work was to evaluate whether the strain of *L. amazonensis* overexpressing the *lamap* gene cryopreserved at -80°C for 3 years would maintain cell viability against oxidative damage. In the *Leishmania (L.) amazonensis* response assay against the harmful agent menadione, it was observed that wild strain (JOSEFA) and the overexpressing *lamap* gene strain (JOSEFA LAMAP) showed reduced cell viability at 100µM menadione concentration ($p < 0.0001$). PCR confirmed the plasmid loss of the transfected strain. This plasmid loss may be associated with changes in the storage temperature of the strain stock, in addition to changing the antibiotic in the culture medium. The results of this work show the importance of controlling variables in a study. Processes such as storage, maintenance and manipulation of cells must have careful methodologies, as they are critical factors, especially at the molecular level.

Keywords: *Leishmania amazonensis*; AP Endonuclease; *lamap*; DNA repair; Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Apresentação do gênero <i>Leishmania</i>	14
Figura 2 –	Formas da <i>Leishmania</i> e suas organelas.....	15
Figura 3 –	Apresentação das etapas do ciclo biológico do protozoário do gênero <i>Leishmania</i> em seus hospedeiros e reservatórios.....	16
Figura 4 –	Mapas dos status de endemicidade de Leishmaniose no mundo.....	18
Figura 5 –	Números de casos de Leishmaniose no Brasil entre 1980-2021.....	19
Figura 6 –	Formas de manifestações clínicas das Leishmanioses.....	20
Figura 7 –	Exemplos de agentes causadores de dano ao DNA, suas principais lesões e os reparos de DNA relacionados a cada tipo de dano.....	25
Figura 8 –	Etapas do mecanismo do reparo de excisão de base.....	29
Figura 9 –	Redução do tretazólio amarelo (MTT) em cristais de formazan de coloração roxa	35
Figura 10 –	Formas promastigotas pós-tratamento com menadiona.....	41
Figura 11 –	Gel de agarose a 1% corado com SYBR Safe e corrido em tampão TAE.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Curvas de crescimento de promastigotas da cepa JOSEFA LAMAP e cepa JOSEFA com menadiona.....	39
Gráfico 2 –	Comparação dos números de promastigotas entre as cepas JOSEFA e JOSEFA LAMAP.....	40
Gráfico 3 –	Densidade óptica das cepas JOSEFA LAMAP e JOSEFA.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Apurínica/Apirimidínica
APE1	AP Endonuclease 1
APN1	Ap Endonuclease Nei 1
BER	Base Excision Repair
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Complementary DNA
DHT	5,6-Di-Hidrotimina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	desoxirriboNucleotídeos fosfatado
D.O.	Densidade Óptica
dRPase	Desoxirribofosfodiesterase
DSB	Double-Strand Break
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EndoIII	Endonuclease III
EndoIV	Endonuclease IV
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas do Nitrogênio
ExoIII	Exonuclease III
GILPs	Glicoinositol-fosfolípides
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IFN- γ	Interferon Gama
LAMP-1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LC	Leishmaniose Cutânea
LCM	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LPG	Lipofosfoglicano
MD	Menadiona
MMR	Mismatch Repair
MMS	Metil Metano Sulfonato
MTG	Metilpurina Glicosilase

MTT	3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide
MTX	Metotrexato
MYH	MutY Homologue
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NER	Nucleotide Excision Repair
NEIL1	Nei Like Glycosylase 1
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NTH1	Nth Like DNA Glycosylase 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKC	Proteína Kinase C
PSG	Promastigote Secretory Gel
PRX	Peroxirredoxina
PTKs	Proteínas Tirosina-Quinases
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive oxygen species
SFB	Soro Fetal Bovino
SMUG1	Single-strand selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase
SUS	Sistema Único de Saúde
SSB	Single-Strand Break
TAE	Tris Acetado EDTA
TDG	Timina DNA Glicosilase
TNF- α	Tumour Necrosis Factor α
TR	Tripanotiona/tripantionia Redutase
TXN	Tioredoxina
UNG	Uracil-DNA glycosilase
UV	Ultravioleta
VAMP-1	Vesicle Associated Membrane Protein 3
VAMP-8	Vesicle Associated Membrane Protein 8

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Sb ⁵⁺	Antimônio pentavalente
GP63	Metaloprotease
C3b	Componente 3 b do complemento
C3bi	Componente 2 b do complemento inativo
C3	Componente 3 do complemento
C1R	Receptor do Componente 1 do complemento
C3R	Receptor do Componente 3 do complemento
pH	Potencial Hidrogeniônico
O ₂ ⁻	Superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO	Hidroxila
OCl ⁻	Hipoclorito
ONOO ⁻	Peroxinitrito
NO	Óxido Nítrico
T[SH] ₂	Tripationa
N	Nitrogênio
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Mg ²⁺	Magnésio Bivalente
kDa	Kilodalton
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
ml	Miligrama
μM	Micromolar
μl	Microlitro
rpm	Rotações por minuto
p <	p menor que

SUMÁRIO

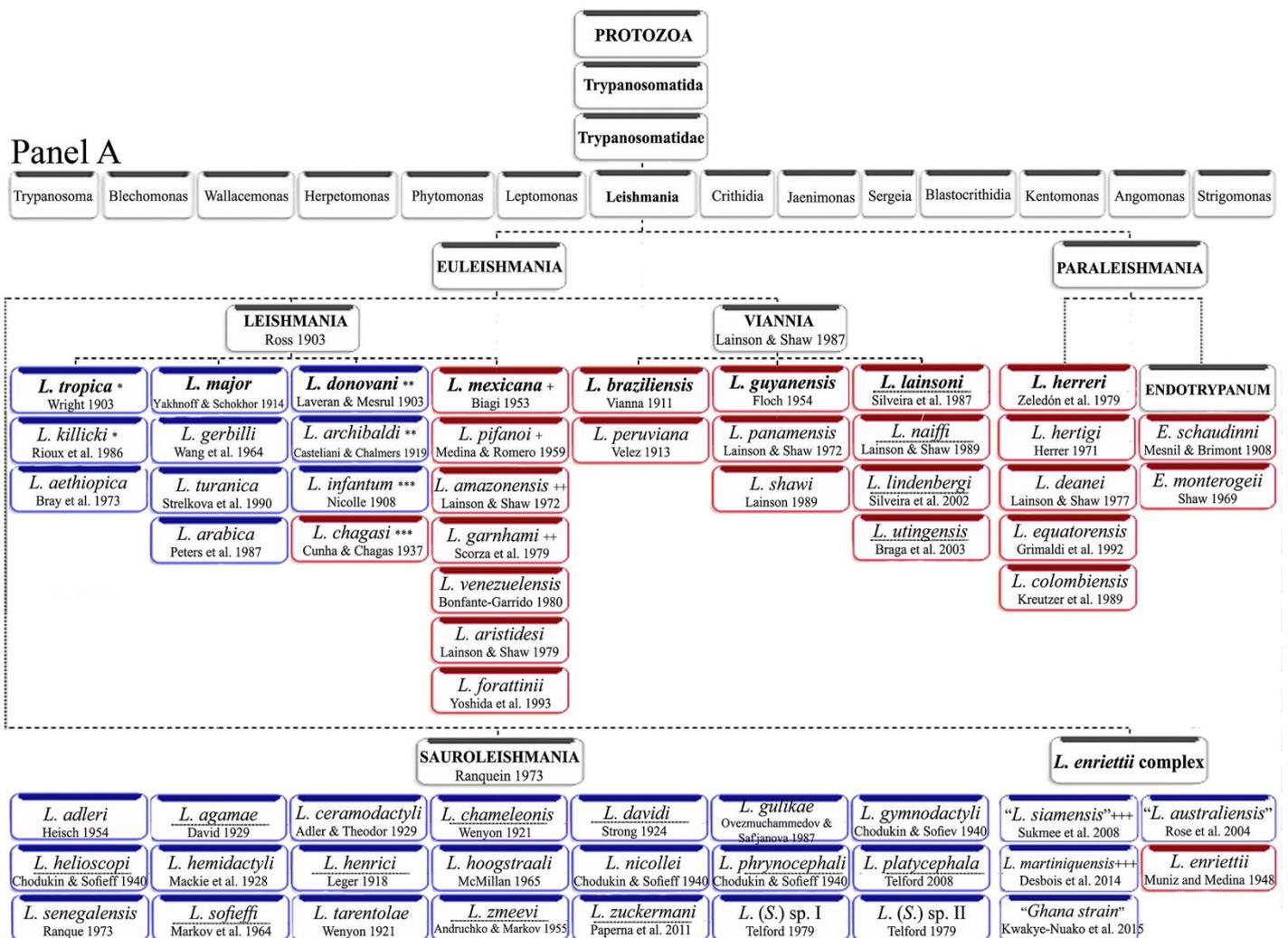
	INTRODUÇÃO	16
1	OBJETIVO	33
1.1	Objetivo geral	33
1.2	Objetivos específicos	33
2	MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1	Parasitas	34
2.2	Indutor de ROS	34
2.3	Cultivo de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> com o agente lesivo menadiona	34
2.4	Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT	35
2.5	Extração de DNA	36
2.6	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Qualitativa	36
2.7	Eletroforese de DNA em gel de agarose	37
2.8	Análise Estatística	37
3	RESULTADOS	38
3.1	Resposta da <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> frente ao agente lesivo menadiona	38
3.2	Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT	42
3.3	Eletroforese dos produtos da PCR Qualitativa para a avaliação da presença do plasmídeo pXG-'GFP lamap⁺	42
4	DISCUSSÃO	44
	CONCLUSÕES	49
	PERSPECTIVAS	49
	REFERÊNCIAS	50

INTRODUÇÃO

a) Gênero *Leishmania*:

Os protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), pertencentes a classe Kinetoplastea (Honigberg, 1963), ordem Trypanosomatida (Kent, 1880) e família Trypanosomatidae (Doflein, 1901) são responsáveis por causar um grupo de doenças denominadas Leishmanioses. Existem mais de 50 espécies de *Leishmania* na natureza, onde aproximadamente 20 delas são patogênicas ao homem. As espécies são divididas em 5 subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complexo *L. enrietti* e *Paraleishmania* (Figura 1) (Akhoundi *et al.*, 2016; OMS, 2023; Subramanian & Sarkar, 2018).

Figura 1 - Apresentação do gênero *Leishmania*



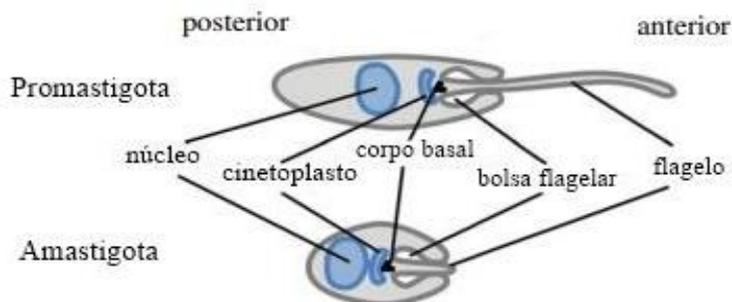
Nota: Desde sua classe, ordem, família e seus subgêneros. Além de todas as espécies presentes em cada um desses grupos.

Fonte: Akhoundi *et al.*, 2016).

No Brasil, 8 dessas espécies são encontradas: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Brasil, 2022; Lainson, 2010).

A morfologia do protozoário é dividida em duas formas celulares: amastigota, apresentando formato arredondado com flagelo internalizado e promastigota, forma alongada de flagelo livre. Suas principais organelas celulares são núcleo, mitocôndria, aparelho de Golgi e flagelo. Além disso, apresentam uma importante organela característica dos parasitos da classe Kinetoplastea, chamada cinetoplasto – uma espécie de DNA mitocondrial condensado-, posicionado anteriormente ao núcleo (Sunter & Gull, 2017). A figura 2 ilustra as morfologias anteriormente descritas.

Figura 2 - Formas de *Leishmania* e suas organelas



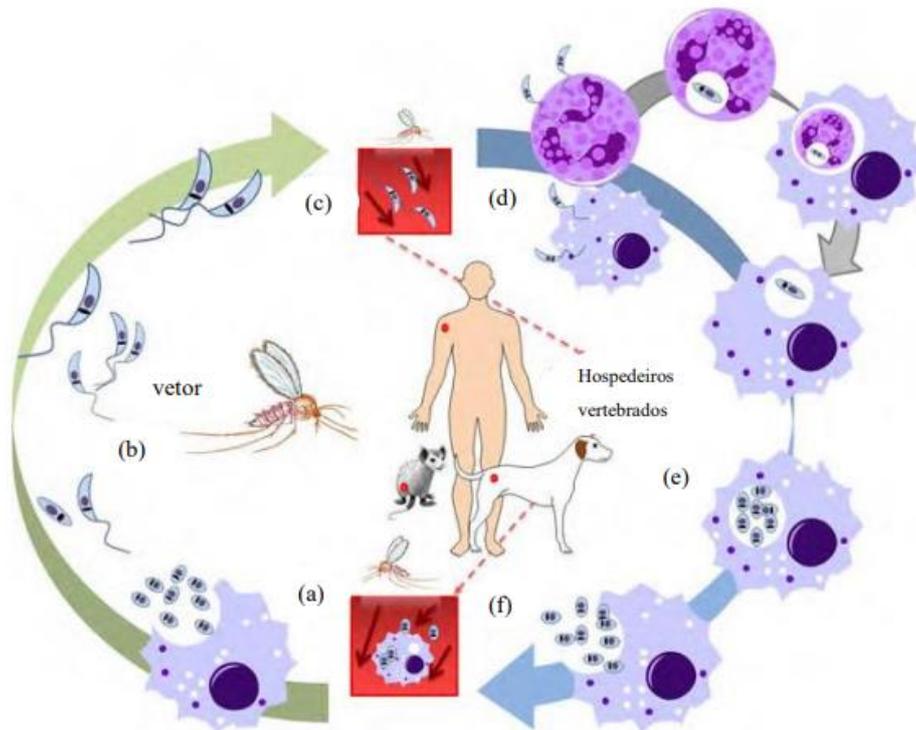
Nota: Forma promastigota, alongada de flagelo livre; amastigota, arredondada com flagelo internalizado e suas principais organelas: núcleo, cinetoplasto, corpo basal, bolsa flagelar e flagelo.

Fonte: Adaptado de Sunter & Gull, 2017.

b) Ciclo Biológico:

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo heteroxeno, onde uma parte do seu desenvolvimento é realizada em um hospedeiro invertebrado, o inseto flebotomíneo, e a outra em um hospedeiro vertebrado, grupo que inclui diversas espécies de mamíferos, como o homem e o cão, além dos reservatórios silvestres como gambá, tamanduá, preguiças e roedores. O inseto vetor, flebotomíneos hematófagos da Ordem Diptera, Família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, apresentam 6 gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Chinius*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*. No Brasil, a principal espécie envolvida na transmissão é a *Lutzomyia longipalpis* (Akhoundi *et al.*, 2016; Brasil, 2022; Willenbrink & Elston, 2018). O ciclo biológico é apresentado na figura 3.

Figura 3 - Apresentação das etapas do ciclo biológico do protozoário do gênero *Leishmania* em seus hospedeiros e reservatórios



Legenda: (a) fêmeas de flebotomíneos ingerem as formas amastigotas da *Leishmania* durante o repasto sanguíneo em hospedeiro infectado; (b) amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas no intestino do inseto, se dividem por divisão binária e se transformam em promastigotas metacíclicas, pelo processo de metaciclogênese; (c) promastigotas metacíclicas migram para o aparelho bucal do inseto e são regurgitadas em um novo hospedeiro vertebrado no momento de um novo repasto sanguíneo; (d) promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e voltam a se diferenciar em amastigotas; (e) as amastigotas se multiplicam intracelularmente e, após apoptose da célula infectada, infectam novas células do hospedeiro; (f) as formas amastigotas são adquiridas pelo vetor durante um novo repasto sanguíneo, continuando assim o ciclo de transmissão.

Fonte: Silva, 2022.

c) As Leishmanioses:

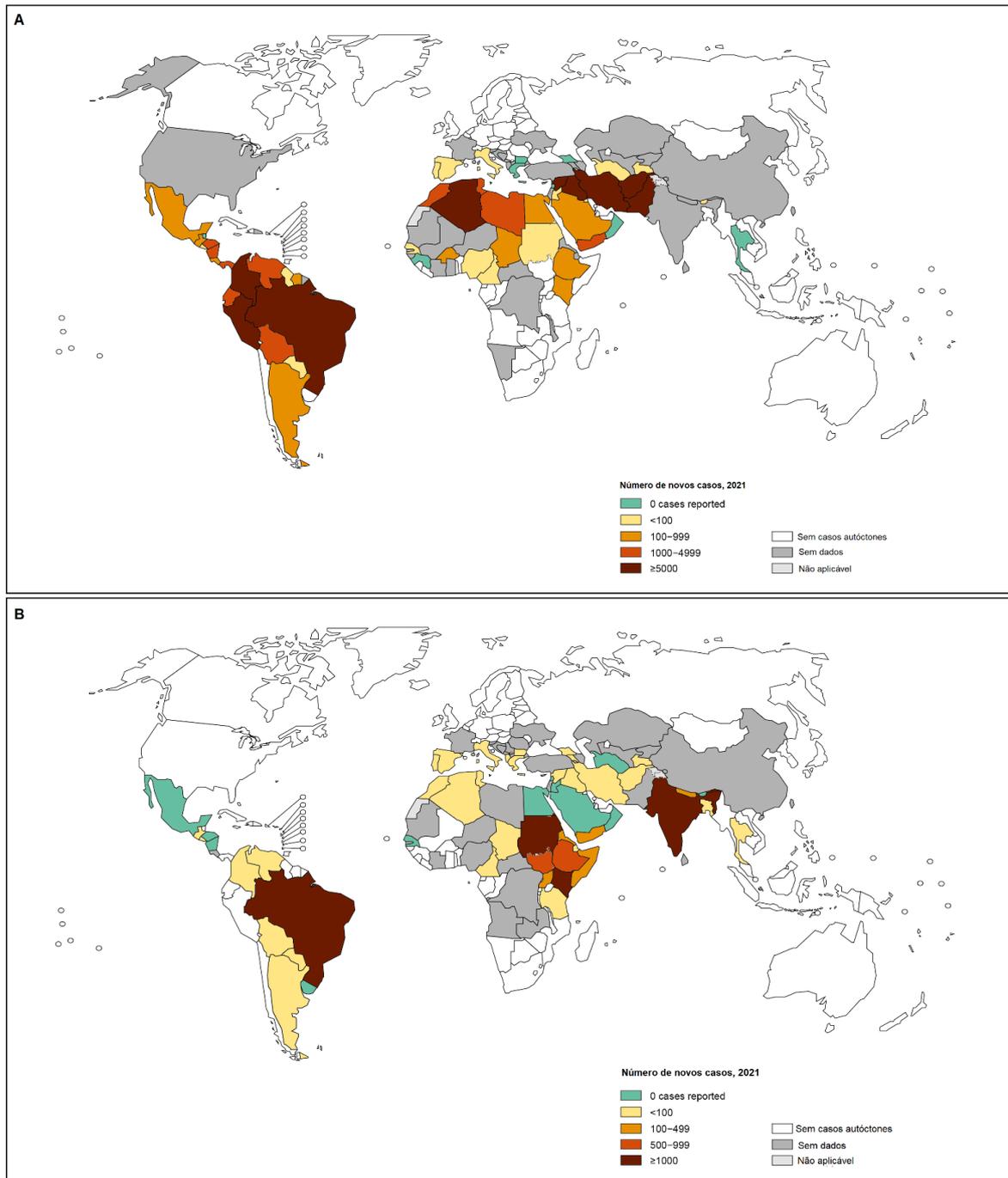
As leishmanioses são um conjunto de doenças que integram o grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas. Constituem um problema de Saúde Pública, estando presentes em mais de 90 países, sendo encontradas em todos os continentes (exceto na Austrália e Antártica). No Velho Mundo, atualmente conhecido como Hemisfério Oriental, as leishmanioses são encontradas em algumas áreas da Ásia, Oriente Médio, África (especialmente na região tropical e norte) e no sul da Europa. No Novo Mundo, Hemisfério Ocidental, são encontradas em áreas do México, América Central e América do Sul (CDC, 2020).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que ocorram de 700 mil a 1 milhão de novos casos anualmente. Cerca de 200 mil casos de Leishmaniose

Cutânea (LC) são reportados à OMS por ano, mas a estimativa da organização é que ocorram de fato 600 mil a 1 milhão de casos. Já para a Leishmaniose Visceral (LV), os números variam de 50 mil a 90 mil casos por ano. É possível observar na figura 4A o status de endemidade de LC no mundo e na figura 4B o status de endemidade de LV no mundo (OMS, 2023).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, ocorrem em média 21.000 casos/ano de LC e 3.500 casos/ano de LV (Brasil, 2022). Na figura 5A é apresentado um gráfico do número de casos dos anos de 1980-2021 de LV, enquanto na figura 5B temos os dados da LV no mesmo período (Brasil, 2023).

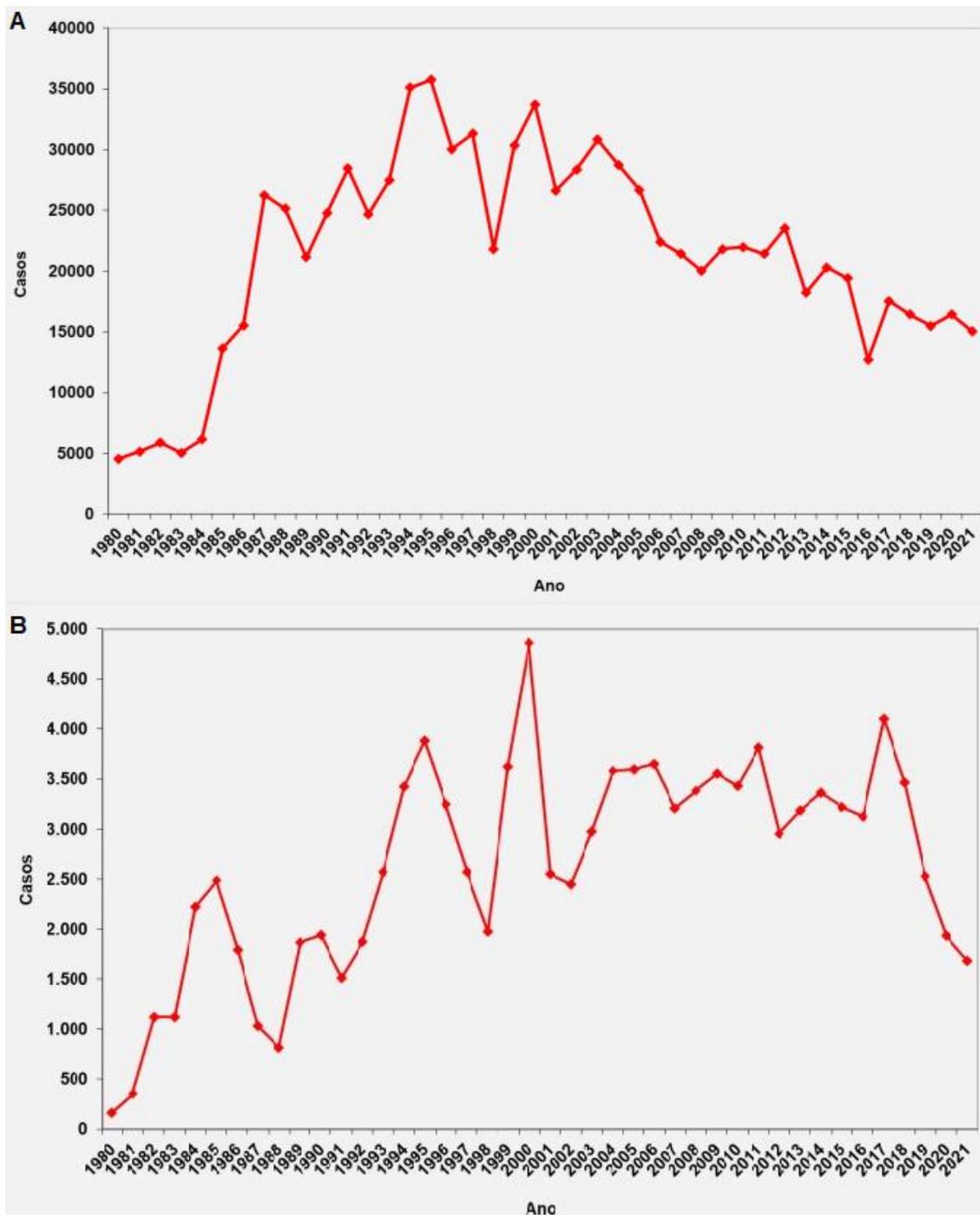
Figura 4 - Mapas dos status de endemicidade de Leishmaniose no mundo



Nota: Mostrando os países endêmicos para Leishmanioses onde a cor apresentada em cada um deles é relacionada ao número de novos casos no ano de 2021, apontada na legenda da imagem. **A)** Status de endemicidade de Leishmaniose Cutânea. **B)** Status de endemicidade de Leishmaniose Visceral.

Fonte: OMS, 2023.

Figura 5 - Números de casos de Leishmaniose no Brasil entre 1980-2021



Nota: Ambos os gráficos apresentam os números de casos reportados ao ano ao longo de 41 anos no Brasil. **A)** Número de casos de Leishmaniose Cutânea. **B)** Número de casos de Leishmaniose Visceral.

Fonte: Ministério da Saúde, Brasil, 2023.

As Leishmanioses são divididas em 3 principais formas: Leishmaniose Cutânea (LC), condição mais comum da doença. Normalmente produz lesões com aparência de úlceras, com bordas elevadas, fundo granuloso e indolor, nas partes do corpo expostas à picada do vetor,

como rosto, braços e pernas. Podem ser lesões únicas ou chegar a centenas delas. Na figura 6A é apresentada uma lesão característica; Leishmaniose Mucocutânea (LMC), as lesões são muito sérias, podendo levar à comprometimento parcial ou total das mucosas do nariz, boca, garganta e tecidos adjacentes, tendo como consequência deformidades faciais, como observado na figura 6B. A principal espécie causadora dessas duas formas no Brasil é a *L. (V.) braziliensis*; A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como cala-azar, é a forma mais grave da doença, caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. Caso não seja diagnosticada e tratada brevemente, pode levar ao óbito em 95% dos casos. A espécie que causa a infecção no nosso país é a *L. (L.) chagasi*. A figura 6C apresenta um caso característico de LV (Brasil, 2022; Mokni, 2019).

Figura 6 - Formas de manifestações clínicas das Leishmanioses



Legenda: **A)** Úlcera característica de LC (Fonte: OMS, 2020). **B)** Deformidade causada pelo comprometimento de mucosa por infecção de LMC (Fonte: OMS, 2020). **C)** Paciente infantil apresentando sinais de LV como extrema magreza e hepatoesplenomegalia.

Fonte: OMS, 2020.

O diagnóstico de LC e LMC é realizado pela análise microscópica dos exames parasitológicos, seja por demonstração direta do parasito, através dos procedimentos de escarificação da borda da lesão, biópsia com impressão do fragmento cutâneo em lâmina por aposição e punção aspirativa. Ou meios indiretos, como isolamento em meios de cultivo, onde os fragmentos cutâneos ou de mucosa obtidos por biópsia são inoculados em meios de cultivo. Também é possível realizar a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, em português) método extremamente sensível, utilizado principalmente nos centros de referências (Handler *et al.*, 2015; Mokni, 2019). O diagnóstico laboratorial é de grande importância, devido algumas doenças fazerem diagnóstico diferencial com a LC, como, por exemplo, sífilis, hanseníase e tuberculose. Além de ajudar nas informações epidemiológicas, que auxiliam no controle da doença (Brasil, 2022).

O diagnóstico de LV pode ser imunológico, através de pesquisa de anticorpos contra *Leishmania* por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), testes rápidos

imunocromatográficos ou Ensaio Imunoenzimático (ELISA, do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), técnicas disponíveis no SUS. Além dos exames parasitológicos, que buscam a presença de formas amastigotas em material aspirado de medula óssea por exame direto ou indireto, como isolamento em meio de cultura e PCR (Brasil, 2022; Van griensven & Diro, 2019).

O tratamento das leishmanioses é complexo, já que a maior parte dos medicamentos disponíveis são muito tóxicos, como os de primeira linha, o antimônio pentavalente (Sb^{5+}), e de segunda linha, pentamidina e anfotericina B. A miltefosina, agente antineoplásico, apresentou ótima eficiência no tratamento, mas tem limitações como efeito teratogênico. No SUS, estão disponíveis para LC os antimoniais pentavalentes, Anfotericina B Lipossomal e Miltefosina. Para a LV, os antimoniais pentavalentes e Anfotericina B Lipossomal. Ainda não há vacina contra a infecção por *Leishmania* para humanos. No Brasil, há a comercialização de uma vacina anti-leishmaniose visceral canina. Contudo, não existem estudos que comprovem a efetividade dessa vacina para a redução da incidência da leishmaniose visceral em humanos. Por esse motivo, o seu uso está restrito à proteção individual dos cães e não como uma ferramenta de saúde pública. (Brasil, 2022; Ghorbani & Farhoudi, 2017; Handler *et al.*, 2015; Van griensven & Diro, 2019).

d) Mecanismos de sobrevivência em *Leishmania spp.*:

O desenvolvimento do parasito e o sucesso da infecção estão associados a mecanismos de sobrevivência que permitem o protozoário escapar da ação do sistema imune evitando sua eliminação. Alguns dos principais mecanismos já estudados estão descritos a seguir.

d.a) Metaciclologênese reversa no vetor:

O estabelecimento de uma infecção no vetor leva cerca de 7 a 14 dias. E isso depende de fatores como a interação entre o parasito-vetor e a produção de PSG, um tipo de gel secretado por promastigotas, para que ocorra a regurgitação delas no hospedeiro antes do próximo repasto sanguíneo. Entretanto, é possível que a maior parte das promastigotas permaneçam no vetor. Descobriu-se então, que a *Leishmania* pode apresentar uma metaciclologênese reversa, o que levaria a um novo processo de replicação, assim o vetor ao realizar múltiplos repastos sanguíneos, aumentaria a capacidade de transmissão do parasito aos suscetíveis hospedeiros (Bates, 2018; Serafim *et al.*, 2018).

d.b) Sobrevivência das formas promastigotas no meio extracelular:

Assim que o protozoário é inoculado na pele do hospedeiro, imediatamente os fatores de patogenicidade da *Leishmania* iniciam um processo para garantir sua sobrevivência no ambiente. Primeiramente, a glicoproteína de membrana GP63, consegue degradar a matriz

extracelular a nível subcutâneo, o que facilitaria a movimentação do parasito. Essa proteína também é capaz de clivar o componente C3b em C3bi, levando a inativação da C3 do complemento, o que impede a ligação dos outros componentes do complemento, inibindo a formação do complexo de ataque a membrana, importante processo do sistema imune de eliminação de patógenos. Apesar disso, permite a opsonização do protozoário, ao se ligar aos receptores C1R e C3R do complemento, promovendo a fagocitose e a internalização nos macrófagos para sua multiplicação (Atayde *et al.*, 2016; Podinovskaia & Descoteaux, 2015; Séguin & Descoteaux, 2016).

d.c) Resistência a fagocitose pelo neutrófilo:

Algumas espécies de *Leishmania* ao serem fagocitadas pelos neutrófilos podem conseguir escapar do mecanismo de morte celular induzida pelas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês Neutrophil Extracellular Traps), que liberam uma rede composta por DNA associado a histonas e proteínas granulares/citoplasmáticas ao meio extracelular, com objetivo de capturar o microrganismo e eliminá-lo. A glicoproteína de membrana lipofosfoglicano (LPG), agiria como uma barreira física que protegeria as promastigotas da ação microbicida dos NETs. Além disso a enzima 3'-Nucleotidase/Nuclease, presente na membrana e associada à nutrição do parasito, ao clivar os NETs pode gerar adenosina e possivelmente aumentar sua infecção de macrófagos, evento observado em estudo com *L. amazonensis*. A adenosina está documentada na literatura como um agente anti-inflamatório que inativa os mecanismos de morte dos macrófagos (Freitas-Mesquita *et al.*, 2019; Gabriel *et al.*, 2010; Guimarães-Costa *et al.*, 2014).

d.d) Fagocitose e Formação do fagolisossomo no macrófago:

O contato entre o protozoário e o macrófago pode se dar primeiramente pelo reconhecimento do flagelo, além da interação com alguns receptores do complemento, de manose, de fibronectina e Fc γ . Essa interação vai gerar diferentes respostas de acordo com cada tipo de receptor ativado (Podinovskaia & Descoteaux, 2015; Sarwar *et al.*, 2017).

A ativação dos receptores vai levar a uma mudança do citoesqueleto do macrófago gerando protuberâncias que englobam o antígeno, formando um fagossomo. Esse vai se ligar ao lisossomo formando assim um fagolisossomo. Essa estrutura contém um ambiente extremamente ácido (pH menor que 4,5) que apresenta enzimas hidrolíticas como proteases, lisozimas, lipases e NADPH oxidase, responsável pela produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs) através da explosão oxidativa (Rosales & Uribe-querol, 2017).

A explosão oxidativa é uma consequência do aumento do consumo de oxigênio causado pela fagocitose. Com a ativação do macrófago, há aumento das concentrações de citocinas como IFN- γ e TNF- α que aumentam a atividade da NADPH oxidase e com isso a produção de EROs, como o radical superóxido (O_2^-). A produção de O_2^- leva à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO), hipoclorito (OCl^-), e peroxinitrito ($ONOO^-$). O aumento de NO e NO- metabólito ocorre devido a ativação de iNOS (óxido nítrico-sintase induzida), importante enzima catalisadora de produção de NO. A L-Arginina atua como um doador de nitrogênio de NO, que se converte espontaneamente em nitrito e nitrato (Van assche *et al.*, 2011).

As formas promastigotas podem conseguir retardar a formação do fagolisossomo através da ação da LPG, levando ao atraso do recrutamento da proteína lisossomal LAMP-1, associada a maturação do fagolisossomo, interferindo na biogênese dessa estrutura. Ela também interfere na acidificação do fagossomo ao interromper os microdomínios lipídicos, inibindo a formação do complexo da NADPH oxidase. Também regula a expressão de iNOS, nos macrófagos. A GP63 cliva importantes proteínas como VAMP3, VAMP8 e Sinaptotagmina-11, o que modula a composição e função do fagossomo (Atayde *et al.*, 2016; Vieira *et al.* 2019).

A formação do fagolisossomo, que deveria ser um mecanismo de eliminação, acaba sendo um fator importante para a diferenciação de forma evolutiva. O aumento da temperatura e a diminuição de pH promovem o ambiente ideal para transformação de promastigota em amastigota. Além disso, a absorção de ferro está associada a geração de EROs, que nesse caso atuaria como fator de sinalização para a diferenciação do protozoário (Mittra *et al.*, 2013; Podinovskaia & Descoteaux, 2015).

d.e) Proteína de membrana Glicoinositol-fosfolípides (GILPs):

As formas amastigotas têm como principais proteínas de membrana as glicoinositol-fosfolípides (GILPs), onde seu mecanismo pode estar associado a capacidade de ativar vias de sinalização através de Proteínas Tirosina-Quinase (PTKs) que possuem importante papel nas funções intracelulares. Apesar disso, não há ativação da Proteína Quinase C (PKC), responsável pela ativação da explosão oxidativa e produção de óxido nítrico (NO) (Alves *et al.*, 2014; Assis, 2012). As amastigotas também apresentam alta atividade Glutational Peroxidase, enzima superóxido dismutase que degrada os produtos tóxicos produzidos pelos macrófagos (Basu & Ray, 2005).

d.f) Resistência a explosão oxidativa:

Outro artifício utilizado pela *Leishmania* contra a explosão respiratória é a ação de um conjunto de enzimas com efeito antioxidante. É conhecido como sistema

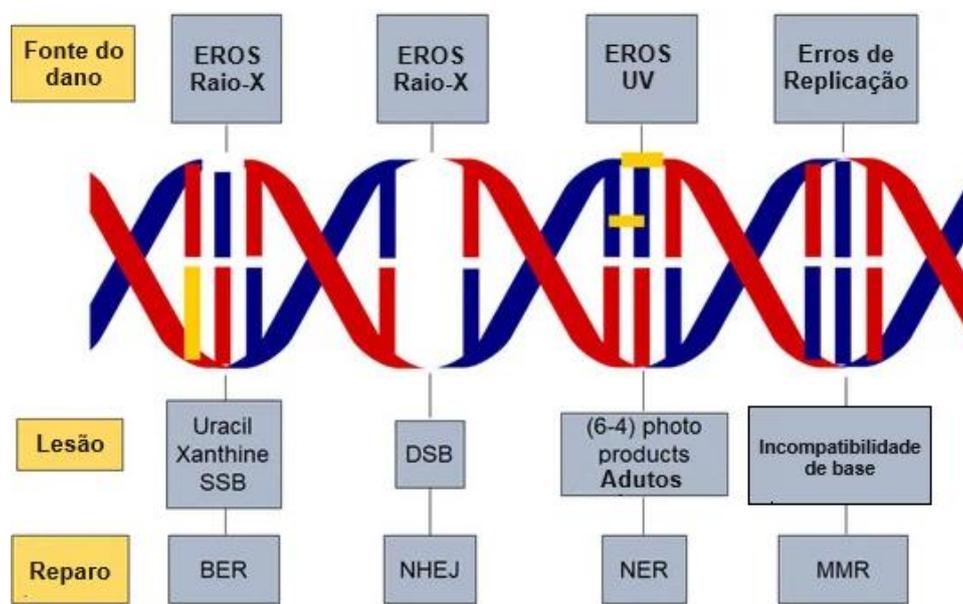
Tripanotiona/tripanotiona redutase (TR), onde o potencial de redução está associado ao conjugado de glutatona, conhecido como tripanotiona T[SH]₂ que atua como principal tiol da célula. Ela vai agir como agente redutor frente a H₂O₂, ONOO⁻ e NO, sendo convertida por oxidação em T[S]₂ que é novamente reduzida em T[SH]₂ pela atividade da NADPH dependente de TR. O NO interage com tióis e Fe²⁺ para formar complexos de dinitrosil ferro e a T[SH]₂ então intercepta os complexos de ferro produzidos. Para a eliminação de H₂O₂, a T[SH]₂ associada a proteína Tioiredoxina (TXN) e Peroxirredoxina (PRX) reduzem ONOO⁻ e H₂O₂, permitindo a sobrevivência do parasito (Sarwar *et al.*, 2017; Van assche *et al.*, 2011).

Embora o protozoário apresente vários mecanismos eficientes de resistência, às ações potentes de EROs e ERNs podem ainda assim causar danos ao seu DNA, ocorrendo desde mutações e até mesmo quebras das fitas. Logo, seria imprescindível um mecanismo de reparo de DNA. A existência de enzimas AP-Endonucleases, responsáveis por reparar sítios abásicos (AP, apurínica/apirimidínica), ocasionados principalmente pela geração de espécies reativas, apresentam importante papel na atuação do mecanismo de reparo de DNA.

e) Mecanismos de danos ao DNA:

O DNA é uma macromolécula suscetível a uma série de modificações químicas que podem levar desde mutações até morte celular. Essas modificações podem ser causadas por danos classificados em dois tipos: exógenos e endógenos. Como exemplo de danos exógenos, temos a radiação ionizante, radiação ultravioleta e agentes alquilantes. Já os danos endógenos incluem principalmente oxidação de bases, gerados por espécies reativas de oxigênio, esses exemplos estão ilustrados na figura 7 (Chatterjee & Walker, 2017).

Figura 7 - Exemplos de agentes causadores de dano ao DNA, suas principais lesões e os reparos de DNA relacionados a cada tipo de dano



Fonte: Adaptado de Alhmoud *et al.*, 2020.

e.a) Danos Exógenos:

e.a.a) Radiação Ionizante:

A radiação ionizante induz quebras de fita simples (SSB, do inglês Single-Strand Break), oxidação das porções de açúcar que podem levar parcialmente à formação de SSB, oxidação/redução de base e até mesmo perda. Múltiplas ionizações resultam em diferentes locais danificados, causando SSB, bases oxidadas de purina ou pirimidina ou quebras de fita dupla (DSB, do inglês Double-Strand Break). Também podem gerar ligações cruzadas de proteínas e lesões de DNA agrupadas, características responsáveis pela toxicidade de radiação ionizante (Sage & Shikazono, 2017).

Esses danos podem induzir a morte celular, mutações genéticas e carcinogênese. Além disso, indiretamente também são capazes de gerar EROs, que irão interagir com DNA e proteínas do organismo, causando lesões como 8-oxo-guanina, timina glicol e formamidopirimidinas que correspondem até 65% do tipo de dano gerado por esse fator (Chatterjee & Walker, 2017; Vignard; Mirey & Salles, 2013).

e.a.b) Radiação Ultravioleta:

A radiação ultravioleta induz efeitos deletérios em todos os organismos vivos, desde bactérias até humanos. A radiação UV-A (315-400 nm) e UV-B (280-315 nm) estão mais relacionadas aos efeitos sobre os organismos, já que a radiação UV-C (<280 nm) é absorvida pela atmosfera. Os efeitos adversos são atribuídos a pequena quantidade de UV-B absorvida

pelo DNA. UV-A pode produzir fotorreações secundárias de fotoprodutos de DNA existentes ou danificá-lo por meio de reações de fotossensibilização indiretas. Os fótons absorvidos podem levar à formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e outros radicais livres. As principais lesões são formações de dímeros-ciclobutano de pirimidina, 6-4-fotoprodutos (6-4PPs, adutos de pirimidina) e seus isômeros de valência Dewar, que têm como consequência a interferência da transcrição de DNA e sua replicação, gerando uma leitura incorreta do código genético, causando mutações e até mesmo morte celular (Cadet & Wagner, 2013; Sinha & Häder, 2002).

e.a.c) Agentes Alquilantes:

Os agentes alquilantes modificam covalentemente o DNA sendo mutagênicos e citotóxicos. Eles agem transferindo um alquil, cloroetil ou, no caso de compostos de platina, um grupo da platina, ao DNA em reações químicas conhecidas como substituições nucleofílicas. Os principais alvos da alquilação são nitrogênio, oxigênio e fosfatos. O átomo N^7 da guanina é particularmente suscetível a essa reação. Outros átomos nas bases de purina e pirimidina de DNA, como os N^1 e N^3 átomos de adenina, o N^3 de citosina, e o O^6 da guanina, também podem sofrer modificações. Adutos de RNA e ligações cruzadas de DNA-proteína também podem ser formados e contribuir para a citotoxicidade desses agentes. Essas lesões podem levar a metilação do DNA (Bordin *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2018).

e.b) Danos Endógenos:

e.b.a) Oxidação de bases:

Os danos oxidativos são os principais tipos de danos endógenos ao DNA. Ocorrem por geração de EROs e ERNs que são produtos formados pela respiração celular, processos catabólicos, anabólicos, metabolismo peroxissomal e da resposta do sistema imune. Estimam-se que ocorram aproximadamente 100 tipos de lesões oxidativas de bases e modificações de desoxirribose. A oxidação pode levar a transversão de bases e se ocorrer nas duas fitas do DNA, pode levar à quebra. Alguns exemplos de produtos dessas modificações são: 8-oxo-dG, Fapy-dG, 8-oxo-dA, FapydA, dGh, dSp, e timidina glicol. Também pode induzir lesão no DNA mitocondrial, gerando quebra de fita e degradação. Cerca de 2.300 quebras de fita simples ocorrem por hora em células de mamíferos (Chatterjee & Walker, 2017; Srinivas *et al.*, 2019).

Os danos por EROs podem gerar produtos conhecidos como sítios abásicos ou sítios apurínicos/apirimidínicos. Esses produtos também estão associados a outros fatores como ação de agentes alquilantes e até mesmo mecanismo fisiológico como hidrólise espontânea de bases nitrogenadas, sendo esse último responsável pela formação de cerca de 10.000 sítios AP por célula/dia. Essa hidrólise promove a desaminação das bases, transformando citosina (C), adenina (A), guanina (G) e 05-metil citosina (5mC) em uracila (U), hipoxantina, xantina e

timina (T), respectivamente. A partir desse mecanismo, há a formação de um sítio abásico por ação enzimática, onde uma enzima glicosilase retira a base desaminada (Chatterjee & Walker, 2017; Liu *et al.*, 2019).

Independentemente do tipo de dano causado, o acúmulo de sítios AP pode ser mutagênico e citotóxico, então são necessários mecanismos de reparo de bases para evitar maiores consequências por essas alterações (Abe & Sasaki, 2016).

f) Mecanismos de Reparo de DNA:

No núcleo, danos de DNA em uma única fita são reparados pelos seguintes mecanismos: reparo de excisão de base (BER, do inglês Base Excision Repair), onde há recuperação de uma base que foi danificada por oxidação, alquilação, hidrólise ou desaminação; reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês Nucleotide Excision Repair), que é uma correção de lesões no DNA de fita dupla (por exemplo, dímeros de pirimidina); reparo de incompatibilidade (MMR, do inglês Mismatch Repair), que é a remoção de nucleotídeos não-emparelhados. Já as quebras de dupla fita do DNA são reparadas por dois mecanismos diferentes: junção de extremidade não homóloga (NHEJ, do inglês Non-Homologous End Joining) e recombinação homóloga (Zinovkina, 2018). Neste trabalho iremos focar no mecanismo de reparo de excisão de base.

f.a) Reparo de excisão de base (BER):

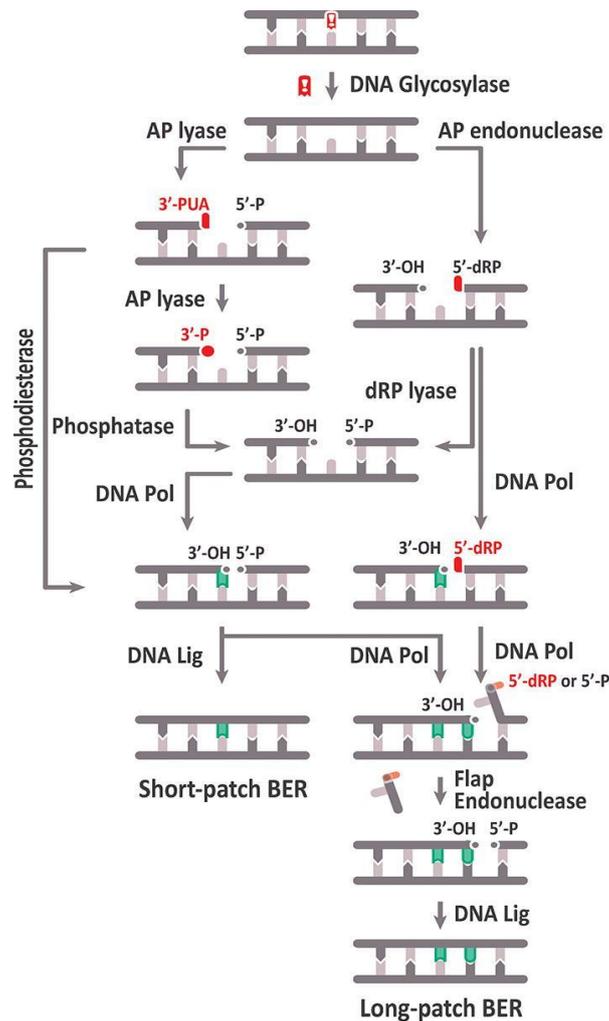
O mecanismo BER é uma via de reparo fundamental na maioria dos organismos vivos. Ela é especializada em corrigir lesões não-volumosas de base única causadas por pequenas modificações químicas, incluindo oxidação, alquilação e danos por desaminação. Para iniciar o processo, uma glicosilase específica reconhece a lesão e elimina a base danificada. Embora cada glicosilase tenha uma estrutura distinta e especificidade de substrato, todas compartilham um modo comum de reconhecimento de danos: Primeiramente, retirando a base afetada da hélice do DNA, facilitando a detecção de uma modificação de base, catalisando a clivagem de uma ligação N-glicosídica, liberando uma base livre e criando um sítio abásico. As glicosilases de DNA podem ser monofuncionais ou bifuncionais (Lee & Kang, 2019; Mullins *et al.*, 2019; Van der veen & Tang, 2015).

As glicosilases monofuncionais possuem apenas a atividade de glicosilase, que inclui UNG (Uracil-DNA glicosilase), SMUG1 (inglês, Single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase), MBD4 (do inglês methyl-CpG binding domain 4), TDG (timina DNA glicosilase), MYH (do inglês, MutY homologue), MPG (metilpurina glicosilase). Em contraste, as glicosilases bifuncionais têm uma atividade intrínseca 3'AP liase que acompanha a atividade da glicosilase, que inclui OGG1 (do inglês, 8-Oxoguanine glycosylase), NTH1 (do

inglês, Nth Like DNA Glycosylase 1, semelhante à endonuclease III) e NEIL1 (do inglês, Nei like glycosylase 1, semelhante a endonuclease de tipo VIII) (Lee & Kang, 2019; Mullins *et al.*, 2019; Van der veen & Tang, 2015).

Os processos que seguem a glicosilase são comuns independentemente da sua identidade. A remoção de base gera um sítio AP na fita do DNA, que é então processado por uma AP-Endonuclease ou AP-liase, que cliva o DNA na região 5' ou região 3' do sítio abásico, respectivamente. A AP-endonuclease gera um 3'-hidroxil e um 5'-2-desoxirribose-5'-fosfato (5'-dRP) e a AP-liase um aldeído 3'- α , β -insaturado (através β -eliminação) ou 3'-fosfato (por γ -eliminação) e um 5'-fosfato. É necessário a remoção dos resíduos 5'-fosfato-desoxirribose. Essa etapa é realizada pela enzima DNA desoxirribo-fosfodiesterase (dRpase). Quando ocorre a ação da AP Endonuclease, neste ponto, o reparo pode ser concluído por correção curta (SP) ou correção longa (LP). No primeiro, a 5' dRP é removida por uma liase de 5' dRP para criar uma única lacuna de nucleotídeos, que é resintetizada por uma DNA polimerase e o corte é selado por uma DNA ligase para completar o reparo. No segundo, a síntese de deslocamento de 2 a 14 nucleotídeos forma uma aba de 5' dRP na extremidade. A aba é então clivada pela endonuclease e, aí sim uma DNA ligase completa o reparo. Na figura 8 é possível observar cada etapa descrita (Daley, Zakaria & Ramotar, 2010; Lee & Kang, 2019; Mullins *et al.*, 2019; Van der veen & Tang, 2015).

Figura 8 - Etapas do mecanismo do reparo de excisão de base



Nota: Desde a identificação da base alterada pela glicosilase, a ação da AP-liase ou AP-endonuclease ao clivar o sítio abásico e complementação da fita pela DNA polimerase e DNA ligase

Fonte: Roldán-arjona; Ariza & Córdoba-cañero, 2019.

f.b) AP Endonucleases:

As enzimas conhecidas como AP Endonuclease têm um papel fundamental no mecanismo BER. Elas são responsáveis por reconhecer a presença de um sítio AP, catalisando a clivagem hidrolítica da ligação fosfodiéster 5' desse sítio. Isso as difere das glicosilase/liases que produzem cortes no sítio abásico ligado a uma extremidade 3'. As AP Endonucleases são de classe II, sendo classificadas em duas famílias: A primeira é composta pela endonuclease IV de *Escherichia coli* (*E. coli*) (endoIV) e pela AP homóloga Endonuclease 1 (Apn1) de *Saccharomyces cerevisiae*. A segunda inclui exonuclease III de *E. coli* (exoIII) e APE1 humana (Charret *et al.*, 2012; Krwawicz *et al.*, 2007).

A Endo IV, codificada pelo gene *nfo*, é Mg^{2+} -dependente e reconhece e cliva DNA da mesma maneira que Exo III. É capaz de reconhecer um conjunto de pirimidinas oxidadas clivando a ligação fosfodiéster 5' para a base danificada (Souza *et al.*, 2006). Estudos

mostraram que em ensaios com deleção dos genes *xth* e *nfo* geraram mutantes sensíveis ao metil metano sulfonato (MMS), peróxido de hidrogênio, t-butil hidroperóxido e bleomicina, uma droga antitumoral. Mutantes *nfo* são sensíveis ao MMS como também à bleomicina (Cunningham *et al.*, 1986). Também apresenta a capacidade de remover a extremidade 3' que bloqueia a atividade da DNA polimerase, caracterizando atividade de 3'-diesterase, onde sua indução parece ser importante para o reparo de lesões oxidativas no DNA que são refratárias ao processamento da Exonuclease III (Levin & Demple, 1996).

A proteína APNI é um homólogo da endonuclease IV de *Escherichia coli*, que atua na reparação de alguns danos oxidativos e alquilados na levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Em estudo com cepas mutantes para o gene, essas apresentavam elevada frequência de mutação espontânea indicando que sua atividade de reparo está envolvida com a estabilidade genética em eucariotos (Ramotar *et al.*, 1991).

A proteína exonuclease III, codificada pelo gene *xth* é responsável por 90% da atividade AP endonucleolítica encontrada em *E. coli*. É Mg^{2+} -dependente. Esta enzima reconhece e cliva a ligação fosfodiéster 5' de sítio AP, deixando um terminal 3'-hidroxila. O produto 5' desoxirribose 5'-fosfato pode ser posteriormente clivado por uma desoxirribofosfodiesterase (dRPase) para gerar uma única lacuna no DNA. Esta lacuna pode ser reparada de forma eficiente por DNA polimerase I e DNA ligase. Além disso, durante o reparo do DNA, a eliminação de bases oxidadas por DNA N-glicosilases também constituem uma fonte de sítios AP, que também são substratos de Exo III. Apresenta também atividade 3'-fosfomonoesterase e ribonuclease H (Mol *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2006). Os mutantes *xthA* de *E. coli* são extremamente sensíveis a H_2O_2 (Demple; Halbrook & Linn, 1983).

A principal contribuição para a clivagem do sítio AP em células de mamíferos é fornecida pela AP Endonuclease 1 (APE1), uma enzima monomérica de tamanho 35 500 Da, responsável pelo reparo de mais de 95% dos danos, que gera uma quebra de cadeia simples no DNA com geração de 3'hidroxil e 5'deoxirribose fosfato (5'dRP). É uma enzima da mesma família da EXO III (*E. coli*), além de Exo A (*Streptococcus pneumoniae*), Rrp1 (*Drosophila melanogaster*), Arp (*Arabidopsis thaliana*), Apn2 (*Saccharomyces cerevisiae*), APEX (camundongo), BAP1 (bovino), rAPE (rato) e chAPE1 (hamster). Ela constitui o fator redox (Ref1), sendo esta função exibida independente da participação no reparo do DNA (Dyrkheeva; Lebedeva & Lavrik, 2016).

Endonuclease III (EndoIII), o produto do gene *nth* de *E. coli*, é uma proteína monomérica de 23 kDa, que contém um cluster Fe – S. A enzima possui atividade de glicosilase e de AP endonuclease. Estudos anteriores mostraram que ela reconhece timinas e citosinas

modificadas, incluindo 5,6-di-hidrotimina (DHT), 5,6-di-hidroxi-5,6-di-hidrotimina (timina glicol, Tg), 5-hidroxi-5,6-di-hidrotimina, 5,6-di-hidrouracil e 5,6-di-hidroxi-5,6-dihidrouracil (uracil glicol). A 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) é uma forma prevalente de modificação de DNA que aparece sob condições de estresse oxidativo, e é uma lesão altamente mutagênica que pode parear incorretamente com a adenina. Mutantes *nth* são muito sensíveis a H₂O₂ (Cunningham & Weiss, 1985).

f.b.a) AP-Endonuclease em Tripanossomatídeos:

Protozoários da classe Kinetoplastea são capazes de sobreviver a ambiente de elevado estresse oxidativo, o que indica que eles devem apresentar mecanismos de reparo de DNA. Ainda há muito o que se descobrir e estudar sobre mecanismo de reparo de DNA e atividade AP-Endonuclease em tripanossomatídeos. Em estudo pioneiro, Pérez e colaboradores (1999) conseguiram identificar em clones de cDNA de isolados de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major* enzimas com característica de AP-Endonuclease semelhantes a EXO III. O gene de *L. major* que codifica a proteína isolada com função de AP endonuclease foi chamado de *lmap*. O gene homólogo em *T. cruzi* recebeu a denominação de *tcap*, ambas enzimas apresentaram atividade conferindo resistência a agentes alquilantes e oxidativos em cepas de *E. coli* mutantes nas atividades de Exo III e Endo IV (Pérez *et al.*, 1999).

Gallego e colaboradores (2005) conduziram um estudo com ensaio de superexpressão da enzima de AP Endonuclease em *L. major*. Esses parasitos apresentaram um aumento da resistência ao peróxido de hidrogênio e ao metotrexato (MTX) quando comparada às células controle. Além disso, a fragmentação do DNA causada pelo MTX foi evitada em células com superexpressão de *lmap* (Gallego *et al.*, 2005).

Charret e colaboradores (2012) identificaram o gene da endonuclease AP de *Trypanosoma brucei* e ao realizarem um ensaio de deleção do gene, os parasitos tornaram-se hipersensível a lesões de DNA induzidas por diferentes agentes como metotrexato e fleomicina (Charret *et al.*, 2012).

Um integrante do nosso grupo, em 2013, desenvolveu seu trabalho de conclusão de curso onde foi identificado o gene de AP Endonuclease de *L. (L) braziliensis* que produzia resistência à menadiona em cepas mutantes de *E. coli* (Silva, 2013).

Já em 2016, o grupo publicou um trabalho com a identificação do gene de AP Endonuclease de *L. amazonensis*, que foi denominado *lamap* e como a expressão desse gene em cepas mutantes de *E. coli* respondia frente à agentes lesivos de DNA. As cepas expressando o gene *lamap* apresentaram maior sobrevivência frente a menadiona (MD) e aminofluoreno em

comparação às cepas triplo mutantes, sugerindo a participação da enzima no mecanismo BER (Verissimo-villela *et al.*, 2016).

Também em 2016, uma integrante do grupo, apresentou sua tese de doutorado, onde os resultados dos ensaios funcionais realizados permitiram deduzir a participação da AP Endonuclease na manutenção da sobrevivência dos parasitos, já que a cepa superexpressora de *lamap* apresentou menor susceptibilidade ao agente oxidativo MD em comparação com as cepas controle, bem como ocorreram diferenças na expressão gênica de *lamap* após o tratamento com drogas lesivas ao DNA e em amastigotas (Oliveira, 2016).

Para complementar os dados do grupo, esse trabalho foi elaborado para continuar e aprimorar o estudo do funcionamento da AP Endonuclease de *L. amazonensis*.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Avaliar a manutenção da resistência ao dano no DNA da *Leishmania amazonensis* superexpressora do gene *lamap* após 3 anos de congelamento a - 80°C.

1.2 Objetivos específicos

- a) Observar o crescimento *in vitro* das formas promastigotas submetidas ao tratamento com menadiona;
- b) Verificar a viabilidade celular de promastigotas após 30 minutos de cultura sob estresse oxidativo;
- c) Investigar a presença do plasmídeo contendo o gene *lamap*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Parasitos

Formas promastigotas selvagens ou transfectadas com plasmídeo pXG-'GFP *lamap*⁺ (JOSEFA LAMAP) de *L. amazonensis* (cepa JOSEFA) que estavam em estoque na FIOCRUZ por 3 anos em -196°C, foram trazidas para UERJ e mantidas congeladas por 3 anos a -80°C. As células foram congeladas em solução criopreservadora com 10% de glicerol + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) nas seguintes etapas: 30 minutos a 4°C na geladeira, 1 hora -20°C no freezer e posteriormente armazenado a -80°C. As células foram descongeladas à temperatura ambiente e passadas para meio Schneider's (Sigma-Aldrich, EUA), complementado com gentamicina (10 µg/ml) e de 20% de SFB. As promastigotas foram mantidas em cultura contendo 10⁷ parasitos/mL a 27°C em incubadora BOD (Forma Scientific, EUA) e em meio Schneider's e de 10% de SFB (Cultilab, Brasil). Adicionalmente, as culturas de JOSEFA LAMAP receberam geneticina (8µg/ml).

2.2 Indutor de ROS

A menadiona (MD) ou vitamina K₃ é uma naftoquinona sintética (1,4-naftoquinona com um grupo metil na posição 2 (2-metil-1,4-naftoquinona). Pode ser usada como um agente indutor de lesão oxidativa, ao gerar espécies reativas de oxigênio através do ciclo redox fútil. Ela atua como agente redutor, então é utilizado cloreto de cobre (CuCl₂), um agente oxidante como substrato para otimizar as condições da reação (Sigma-Aldrich, 2023).

2.3 Cultivo de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com o agente lesivo menadiona

Promastigotas das cepas JOSEFA e JOSEFA LAMAP inicialmente com volume de 4 x 10⁵/ml foram cultivadas com meio Scheneider's suplementado com 10% de SFB e submetidos

a concentrações distintas de menadiona (0; 12,5 μ M; 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M) por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz em placa de 24 poços. As triplicatas foram incubadas (BOD, Forma Scientific, EUA) a 27°C. O crescimento dos parasitos foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer diariamente durante 4 dias.

Para a análise de morfologia celular, no final do experimento, uma alíquota da cultura de células foi colocada na lâmina e corada pelo Panótico (Laborclin, BR), de acordo com as instruções do fabricante com posterior visualização em microscópio de luz (Olympus, Japão) e as imagens capturadas no aumento de 100x.

2.4 Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT

No último dia de cultura, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por redução do MTT. Que consiste na avaliação da atividade mitocondrial da célula, através da redução do MTT que é amarelo (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA) em cristais de formazan de coloração roxa, vide figura 9. Foi utilizado 200 μ l da cultura de *Leishmania* e 22 μ l de MTT incubado em placa de 96 poços por 3h em estufa a 37°C/5% CO₂ (Sanyo, Japão).

Figura 9 - Redução do tetrazólio amarelo (MTT) em cristais de formazan de coloração roxa



Fonte: Magalhães, Tha & Leme, 2018.

Os cristais insolúveis de formazan foram dissolvidos usando 80 μ l de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Dinâmica Química, BR) e a solução colorida resultante foi quantificada pela medição da sua absorbância em 570 nanômetros no espectrofotômetro para microplacas (Biotek, EUA) com auxílio do software GEN5.02.

2.5 Extração de DNA

Para a confirmação da presença do plasmídeo na cepa de *L. amazonensis* transfectada, por meio da PCR qualitativa, primeiramente foi realizada a extração de DNA genômico pelo método em membrana de sílica (Kit DNeasy Blood & Tissue, Qiagen, ALE). Esse método permite a adsorção específica de DNA à membrana de sílica e a remoção ideal de contaminantes e inibidores de enzimas, além de sua purificação não requer extração de fenol, clorofórmio ou precipitação de álcool, evitando o contato com essas substâncias nocivas à saúde.

Para o primeiro passo de lise celular, as culturas foram transferidas para tubos cônicos de 15ml (Falcon®) e centrifugadas a 3000 rpm (Eppendorf®, ALE) por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 200µl de PBS e transferidos para microtubos de 2ml. Neles foram adicionados 20 µl de proteínase K, 200 µl de tampão AL e foi misturado em vórtex (Fisher Scientific, EUA) e incubado a 56°C (SevenLabor, BR) por 10 min. No próximo passo, foram adicionados 200 µl de etanol e vortexado em seguida. O componente foi transferido para microtubos de 2 ml com coluna de sílica e centrifugado a 8000 rpm (Eppendorf® 5415 C, ALE) por 1 minuto. A coluna foi transferida para novo microtubo e o outro com o sobrenadante descartado. Foi adicionado 500 µl de tampão AW1 e centrifugado a 8000rpm por 1 minuto, novamente o microtubo e seu sobrenadante foram descartados e a coluna de sílica mudada para novo microtubo. Foram adicionados 500 µl de tampão AW2 por 3 minutos a 14000 rpm. Foi descartado e mais uma vez a coluna é movida para novo microtubo e o anterior descartado junto com seu sobrenadante. Para eluir o DNA foi adicionado 200 µl de tampão AE no centro da membrana da coluna. Foi incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e para finalizar centrifugado também por 1 minuto a 8000 rpm. A coluna de sílica foi descartada e o microtubo armazenado em freezer 20°C para a posterior realização da PCR (Quiagen, 2016).

2.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Qualitativa

As reações de PCR conduzidas com a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) foram realizadas em tampão de reação 10X PCR Buffer (Invitrogen, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Os mixes de reação foram ajustados a um volume total de 25 µL

por amostra e continham: 2.5 µL do tampão supracitado, 2.5 µl de de desoxirribonucleotídeos Fosfatado (dNTPs) (Invitrogen, EUA), 2.5 µl de primer senso (*gfp*-F: CCTGAAGTTCAT CTGCACCA) e 2.5 µl de primer anti-senso (*gfp*-R: TGTTCCTGCTGGTAGTGGTCG), 2.0 µl de MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 1 µL de DNA genômico. Foram empregados 0.5 µl da enzima polimerase além de H₂O MilliQ para completar 25 µL de volume final para cada reação. No termociclador (Applied biosystems, EUA), as etapas das reações de PCR para o alvo *gfp* compreendem um total de 30 ciclos, descritas a seguir.

A desnaturação inicial das moléculas de DNA foi realizada a 98°C por 2 minutos, no início das etapas de reações. A temperatura ideal para esse processo é 94°C por 1 minuto. O estágio de associação dos oligonucleotídeos às fitas de DNA molde (“annealing”) ocorreu a 65°C por 1 minuto e o período de polimerização a 72°C por 1 minuto. Ao final dos ciclos, sucede uma etapa adicional de polimerização com incubação a 72°C por 10 minutos.

2.7 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR Safe (10.000X concentrado, Invitrogen) em tampão TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0) com corrida a 90V por 90 minutos. Os resultados foram visualizados por meio de uma câmara escura com transiluminador de luz ultravioleta (High Performance UV Transiluminator UVP) (SPLabor, BR).

2.8 Análise estatística

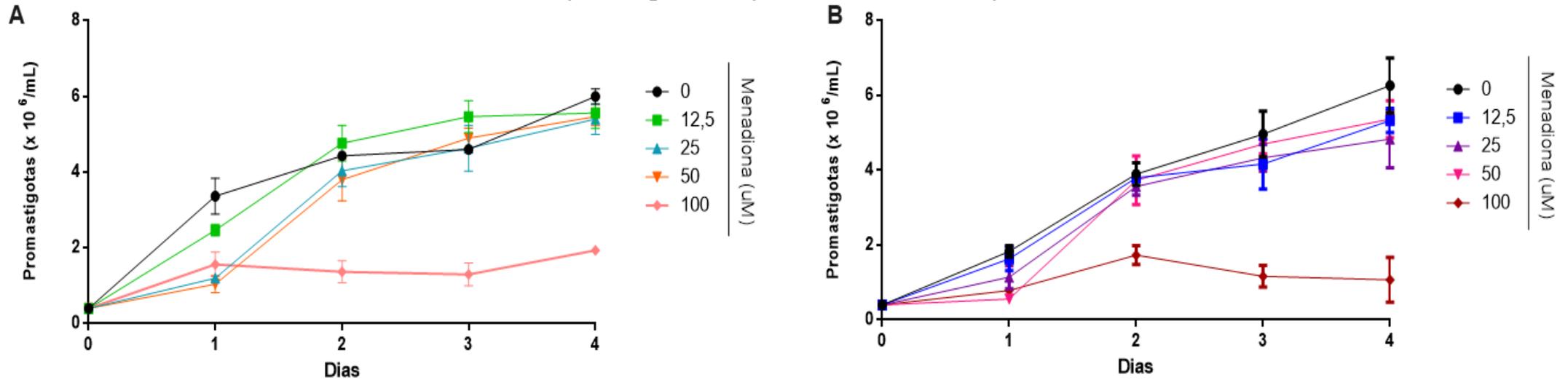
A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o teste Two-way anova (software GraphPad Prism 6.01) para a comparação do número de promastigotas de ambas as cepas, em cada concentração por dia de experimento. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Resposta das cepas de *Leishmania (L.) amazonensis* frente ao agente lesivo menadiona

Para analisar as cepas de *L. amazonensis* mantidas congeladas por 3 anos eram capazes de manter a resistência ao estresse oxidativo, as culturas de promastigotas foram desafiadas com menadiona e o crescimento acompanhado por 4 dias. Observamos que a cepa JOSEFA LAMAP cresceu na presença de menadiona até 50 μM , mas houve redução significativa do crescimento ($p < 0.0001$) com 100 μM de MD (Gráfico 1A). Resultado similar ocorreu com a cepa selvagem (Gráfico 1B). A comparação do crescimento em cada concentração entre as cepas foi analisada através do teste Two-way anova.

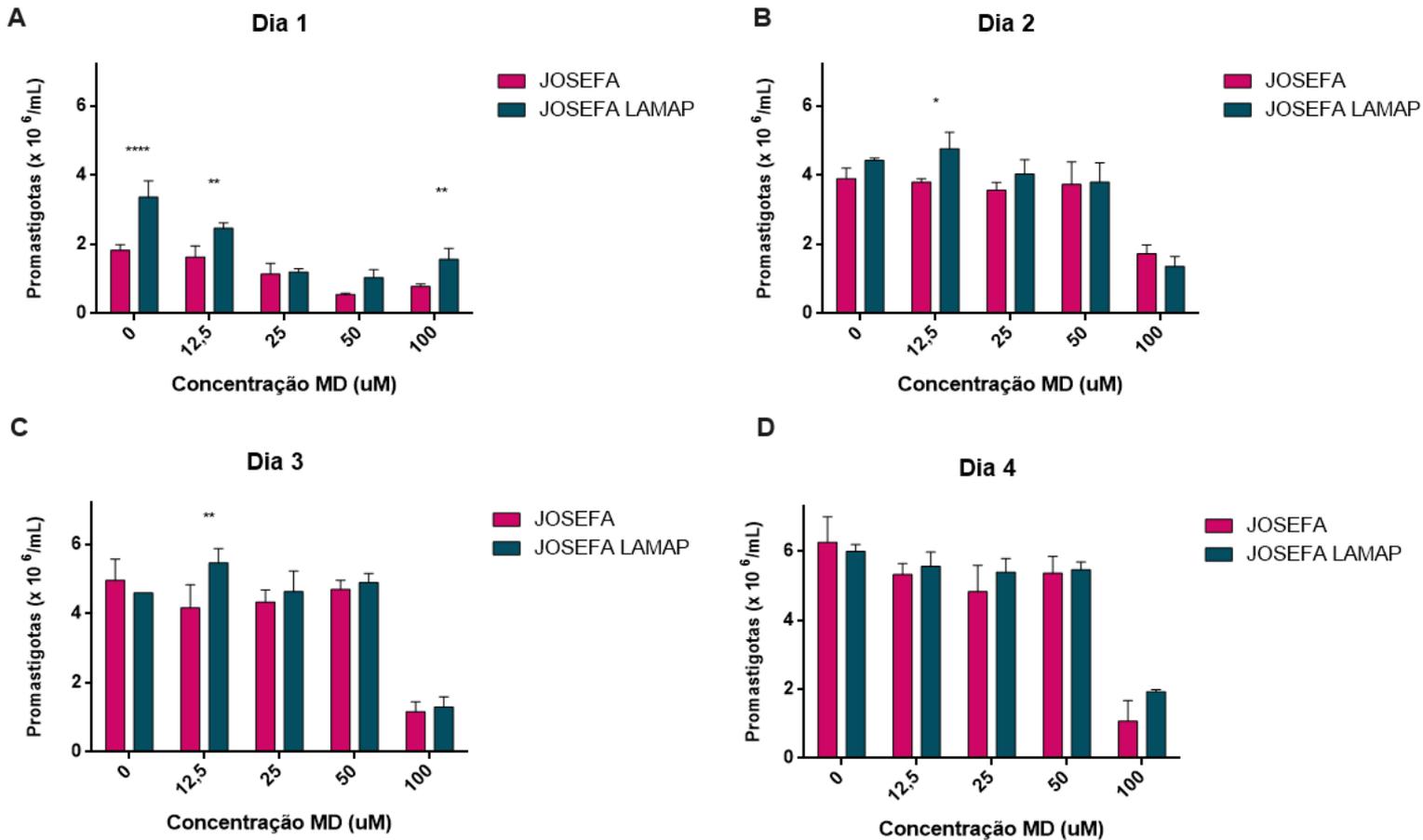
Gráfico 1 - Curvas de crescimento de promastigotas da cepa JOSEFA LAMAP e cepa JOSEFA com menadiona



Legenda: 10^5 promastigotas/mL foram incubadas na presença das concentrações indicadas de MD e o número de células foi contado diariamente. 1A refere-se a cepa JOSEFA LAMAP enquanto 1B a cepa JOSEFA.

Na comparação da quantidade de promastigotas por concentração entre as duas cepas, podemos observar que no dia 1 após o tratamento, a cepa JOSEFA LAMAP obteve maior crescimento em relação a cepa JOSEFA nas concentrações 0 ($p < 0.0001$), $12,5\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ ($p < 0.001$) de MD (Gráfico 2A). No dia 2 do tratamento, o crescimento da cepa JOSEFA LAMAP continuou sendo maior na concentração $12,5\mu\text{M}$ ($p < 0.02$) (Gráfico 2B) e no dia 3 também ($p < 0.01$) (Gráfico 2C).

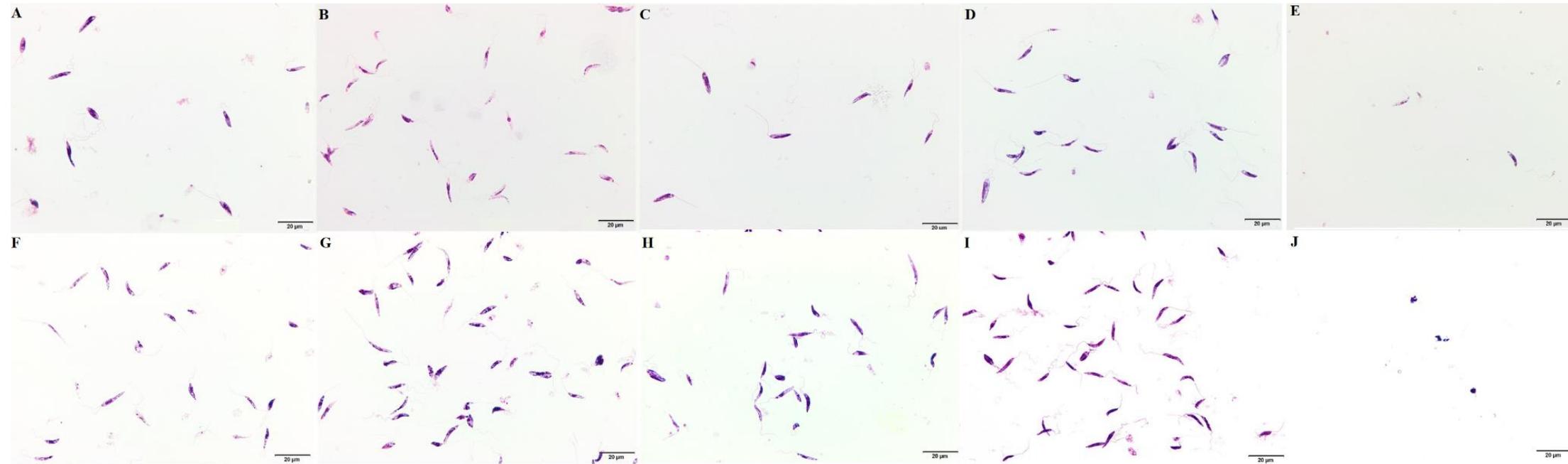
Gráfico 2 - Comparação dos números de promastigotas entre as cepas JOSEFA e JOSEFA LAMAP



Legenda: Números de promastigotas (x10⁶/ml) nas concentrações de menadiona a partir do primeiro dia pós-tratamento de cada uma das cepas. **5A)** Quantidade de promastigotas por concentração de MD no dia 1 após tratamento (**** p < 0.0001 e ** é p < 0.001). **5B)** Quantidade de promastigotas por concentração no dia 2 após tratamento (** p < 0.02). **5C)** Quantidade de promastigotas por concentração no dia 3 após tratamento (** p < 0.01). **5D)** Quantidade de promastigotas por concentração no dia 4 após tratamento, sem significância estatística.

Em relação à análise morfológica das formas promastigotas, observamos que a cepa JOSEFA LAMAP (figura 10A-10E) não apresentou alteração morfológica, ou seja, se apresentavam alongadas com seu flagelo livre. Na cepa JOSEFA (figura 10F-10J), apenas na concentração de 100µM (figura 10J) foi observado alteração morfológica, onde em alguns campos foram encontradas formas promastigotas pequenas e arredondadas.

Figura 10 - Formas promastigotas pós-tratamento com menadiona

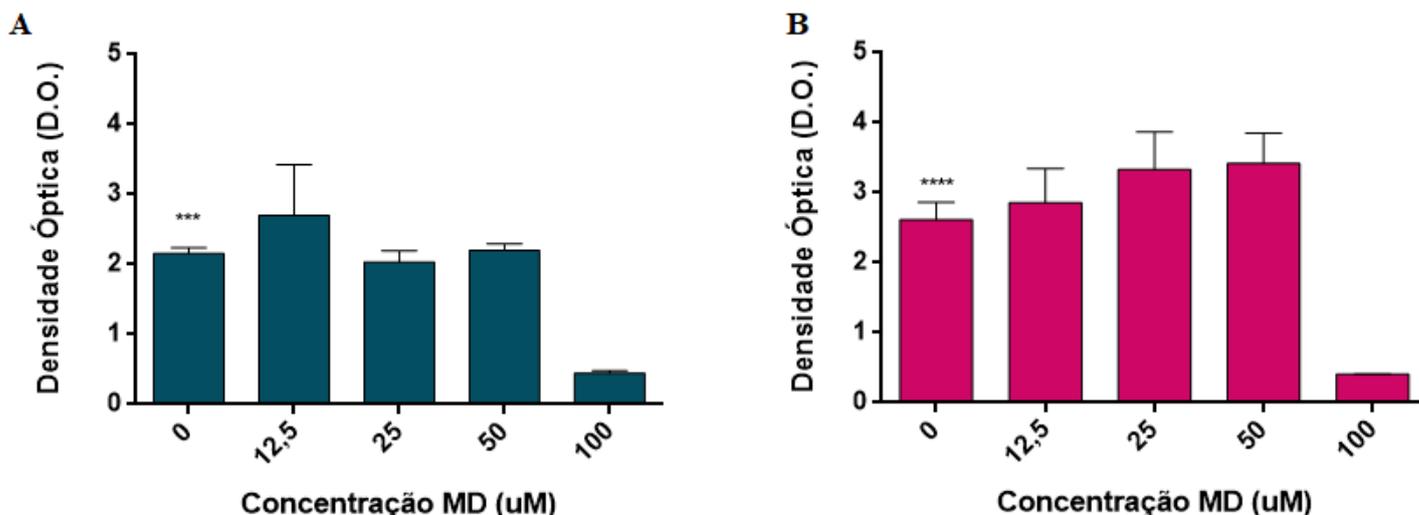


Legenda: Imagens capturadas (aumento de 100x) das promastigotas de ambas as cepas de *Leishmania* que foram tratadas com as concentrações de MD indicadas e coradas pelo panótico. **A** é a cepa JOSEFA LAMAP na concentração 0 de MD; **B** na concentração 12,5 μM de MD; **C** na concentração 25 μM de MD; **D** na concentração 50 μM de MD; **E** na concentração 100 μM de MD. Em nenhuma das concentrações de JOSEFA LAMAP houve alteração morfológica. **F** corresponde a cepa JOSEFA na concentração 0 de MD; **G** na concentração 12,5 μM de MD; **H** na concentração 25 μM de MD; **I** na concentração 50 μM de MD e **J** na concentração 100 μM de MD. Apenas na concentração 100 μM de MD foi observada alteração morfológica (Fonte: Autora, 2023).

3.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT

O ensaio de viabilidade celular por MTT avalia a atividade metabólica das células ao quantificar a redução do tetrazólio amarelo em cristais de formazan de coloração roxa. A densidade óptica (D.O.) de cada poço é lida pelo espectrofotômetro e interpretada por um software. A partir dos valores de D.O. que foram gerados pelo software, foram construídos gráficos para comparação e análise estatística. É possível observar que para ambas as cepas, JOSEFA LAMAP (gráfico 3A) e JOSEFA (gráfico 3B), a concentração de 100uM apresentou a menor D.O em relação às outras concentrações ($p < 0.0001$).

Gráfico 3 - Densidade óptica das cepas JOSEFA LAMAP e JOSEFA



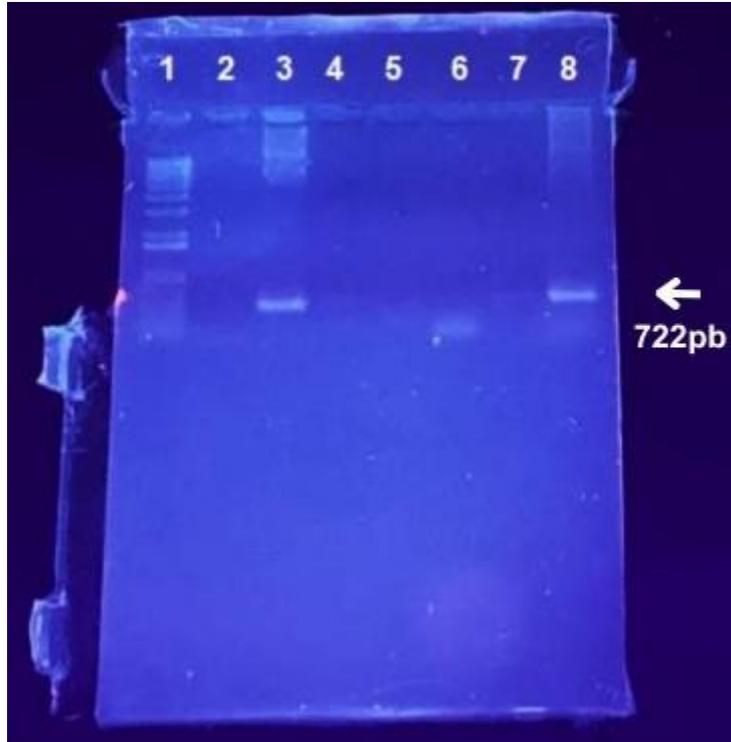
Legenda: Após o ensaio da redução do MTT, o espectrofotômetro gerou os valores de densidade óptica de cada cepa estudada nas concentrações de menadiona informadas. **3A)** Densidade Óptica por concentração de MD do ensaio de MTT da cepa JOSEFA LAMAP (***) $p < 0.0001$). **3B)** Gráfico de Densidade Óptica por concentração de MD do ensaio de MTT da cepa JOSEFA. (****) $p < 0.0001$.

3.3 Eletroforese dos produtos da PCR Qualitativa para a avaliação da presença do plasmídeo pXG-'GFP *lamap*⁺

A PCR qualitativa foi realizada para avaliar se o plasmídeo (pXG-'GFP *lamap*⁺) ainda estava presente na cultura. Na figura 11, é possível visualizar os produtos da PCR em gel de agarose a 1%. Os poços das amostras de DNA que estavam sendo analisadas apresentaram resultado negativo, ou seja, não houve amplificação do gene alvo *gfp*, onde nos controles

positivos têm-se a presença da banda de tamanho aproximado 722pb. Ainda é possível observar no poço 6, uma discreta banda de aproximadamente 600-650pb.

Figura 11 - Gel de agarose a 1% corado com SYBR Safe e corrido em tampão TAE



Legenda: Gel de agarose apresentando os resultados da amplificação do gene *gfp* e visualizado por meio de um transiluminador de luz UV. **Poço 1:** Marcador de peso molecular (1 Kb DNA plus Ladder); **Poço 2:** Controle negativo; **Poço 3:** Controle positivo (pXG-'GFP); **Poço 4:** Amostra de DNA extraída da cultura sem adição da genética; **Poço 5:** Amostra anterior diluída 10x; **Poço 6:** Amostra de DNA extraída da cultura com adição de genética; **Poço 7:** Amostra anterior diluída 10x e **Poço 8:** Controle positivo (pXG-'GFP *lamap*⁺) (Fonte: Autora, 2023).

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho buscava inicialmente avaliar a hipótese de que a superexpressão do gene poderia atribuir maior resistência ao protozoário frente a agentes causadores de danos lesivos ao DNA. No trabalho de Oliveira (2016) com metodologia similar à desenvolvida neste trabalho, a cepa selvagem e a cepa com superexpressão do gene *lamap* foram tratadas com diferentes concentrações de MD (0; 62.5 μ M; 125 μ M; 250 μ M; 500 μ M; 1000 μ M) por 1 hora. Após 48h, a cepa superexpressora do gene *lamap* apresentou sobrevida para concentração de 500 μ M, enquanto as culturas com as cepas controle (selvagem e vetor sem inserto) encontravam-se com parasitos viáveis apenas até a concentração de 250 μ M (Oliveira, 2016). Em nosso trabalho, ao realizar os testes para definir as concentrações de MD utilizadas, as cepas não apresentavam sobrevida a partir de 125 μ M de MD. Além de terem queda acentuada no crescimento a partir da concentração 100 μ M. Ou seja, apesar da exposição a MD ter sido por um tempo menor (30 min), as cepas estavam apresentando menor resistência em concentrações acima de 100 μ M.

Além disso, ainda no trabalho de Oliveira (2016), as formas promastigotas na concentração de 250 μ M apresentaram alteração morfológica, estando arredondadas e com presença de grânulos (Oliveira, 2016). No presente trabalho, foi observado alteração na concentração de 100 μ M, porém apenas na cepa JOSEFA. No trabalho de Mitra e colaboradores (2013), reduções no nível de expressão gênica de *lamap* em amostras de promastigotas tratadas com menadiona, poderiam estar associadas às alterações metabólicas e indução de alterações na fase biológica do parasito, condição dependente da regulação de ferro (Mitra *et al*, 2013). Porém, como nosso trabalho não avaliou os níveis de expressão gênica de *lamap* e nem de ferro, não podemos determinar a ligação da alteração morfológica com a ação do ferro. A alteração de morfologia pode ser também indicativa de morte celular, onde na apoptose o volume celular pode diminuir e há assimetria na membrana, mecanismo que pode ser encontrado em protozoários como a *Leishmania* (Proto, Coombs & Mottram, 2013).

Com relação ao ensaio de redução do MTT, foi observada uma grande redução do valor da D.O de ambas as cepas na concentração 100 μ M em comparação às outras concentrações. Porém, não foi possível determinar a citotoxicidade da MD, pois no ensaio não foi utilizado um controle positivo de toxicidade, por exemplo, o triton, sendo um erro de metodologia. No trabalho de Oztopcu-Vatan e colaboradores (2014) o ensaio por redução do MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade de células de carcinoma hepatocelular de camundongos, tratadas com concentrações distintas de menadiona, onde ela apresentou atividade citotóxica na concentração

25 μM e pode induzir dano ao DNA e apoptose (Oztopcu-Vatan *et al*, 2014). Assim como em outros trabalhos que reproduzem o ensaio de redução MTT, a utilização de um controle positivo de toxicidade é essencial para avaliação da citotoxicidade da molécula que está sendo testada.

Pelos nossos estoques estarem congelados já há algum tempo (desde 2016) e os resultados dos ensaios com a MD estarem muito discrepantes dos trabalhos realizados pelo nosso grupo, precisávamos confirmar se as cepas transfectadas apresentavam ainda o plasmídeo, e ao realizarmos o teste para confirmação, obtivemos o resultado de que elas tinham perdido este plasmídeo.

Desde a descoberta do DNA como material genético e sua estrutura, há o desenvolvimento de técnicas que buscam manipular e modificar geneticamente organismos, o que podemos chamar de Engenharia Genética. Uma das primeiras técnicas utilizadas, foi a de clonagem molecular, onde há inserção de um fragmento de DNA em um plasmídeo para produzir o DNA recombinante que pode se replicar dentro de uma célula hospedeira. A partir disso, há a produção de múltiplas cópias do fragmento de DNA incorporado na cultura e as células-filhas apresentarão esse fragmento em seu genoma (Pyne, Sukhija & Chou, 2011).

O desenvolvimento de microrganismos recombinantes apresenta problemas, principalmente relacionados à estabilidade do plasmídeo. A instabilidade é definida como a tendência das células recombinantes de perderem algumas propriedades moleculares por causa de alterações ou perdas do plasmídeo. A estabilidade plasmidial pode ser considerada como fator crítico na produção de proteínas recombinantes, uma vez que a expressão da proteína de interesse está condicionada à manutenção do plasmídeo na célula (Silva *et al*, 2009; Vitor, 2018).

Existem dois tipos de instabilidade plasmidial: a estrutural e a segregacional. A estrutural, é caracterizada por alterações da sequência de bases de um plasmídeo por inserções, deleções ou mutações pontuais. Isso pode ocorrer pela ação de mutagênicos ou espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. Também podem ocorrer erros da DNA polimerase ou insuficiência de mecanismos de reparo. Eventos de recombinação entre sequências no plasmídeo e sequências no cromossomo podem estar ligados a essas alterações. A expressão de genes também pode ser considerada um fator importante. Já na instabilidade segregacional, a perda plasmidial ocorre durante a divisão celular, resultando em uma célula-filha sem o plasmídeo. Os plasmídeos são considerados uma carga metabólica para as células, o que leva a uma preferência por células livres de plasmídeo durante o crescimento. Quanto mais essas células sem o plasmídeo crescem em uma população, mais difícil se torna a replicação do DNA recombinante (Friehs, 2004; Katayama, 2016; Vitor, 2018).

Ainda no trabalho de Vitor (2018), são citados alguns outros fatores que influenciam na estabilidade plasmidial, como temperatura e pressão seletiva com antibiótico. Com relação a manutenção de plasmídeos em baixas temperaturas, Nguyen e colaboradores (2018), conduziram um estudo para avaliar a estabilidade e integridade do plasmídeo a longo prazo, onde utilizaram células congeladas por 3 anos a -20°C e células que passaram por método de aceleração de condições de envelhecimento a 65°C por 20 dias. Seus resultados mostraram que o plasmídeo contendo informações de DNA armazenado em condições controladas de -20°C , poderia possuir estabilidade de DNA por pelo menos 3 anos, e o plasmídeo poderia ser protegido da degradação mesmo sob condições elevadas de temperatura de até 65°C por 20 dias, o que é equivalente a aproximadamente 20 anos de armazenamento de DNA a -20°C (Nguyen *et al.*, 2018). Porém, não foram encontrados estudos de avaliação de estabilidade a longo prazo em condições reais e em temperaturas mais baixas, como -80°C e -150°C .

A literatura também não possui material suficiente em relação a preservação de espécie de *Leishmania*, principalmente em como os métodos podem afetar em níveis moleculares. Na revisão bibliográfica de Sola e colaboradores (2012), que expõe as questões de conservação e viabilidade na manutenção de microrganismos, é relatado que a manutenção em temperaturas ultrabaixas (-150°C a -196°C em containeres de nitrogênio líquido) é mais eficiente que em temperaturas baixas (-20°C a -80°C em freezers), já que nesses últimos podem ocorrer variações de temperatura do equipamento, enquanto em sistema de nitrogênio líquido é constante (Sola *et al.*, 2012). No trabalho de Pires & Cupolillo (2010), foi avaliado a eficiência dos métodos de criopreservação de 8 espécies de *Leishmania*, incluindo a *L. (L.) amazonensis*, que apresentou viabilidade ao ser preservada diretamente a 196°C independentemente do método de descongelamento, e quando o esquema de congelamento foi $0^{\circ}\text{C}/-70^{\circ}\text{C}/-196^{\circ}\text{C}$ e $-20^{\circ}\text{C}/-70^{\circ}\text{C}/-196^{\circ}\text{C}$ sua viabilidade foi melhor quando descongelada a $37^{\circ}\text{C}/3\text{min}$. (Pires & Cupolillo, 2010).

Na revisão de Black e colaboradores (2023), é explorado o que é considerado instabilidade do genoma e causa consequências graves para outros eucariontes, para a *Leishmania* pode fornecer substratos selecionáveis para catalisar alterações da expressão gênica necessárias para modificar o número de cópias do gene frente a alterações ambientais. Replicação não ortodoxa do DNA, reparo de DNA, fatores de estresse de replicação e repetições de DNA são reconhecidos no protozoário como contribuintes para esta instabilidade intrínseca, mas como a *Leishmania* regula a plasticidade do genoma ainda não está elucidado (Black *et al.*, 2023). Essa capacidade de instabilidade genômica da *Leishmania* pode ter contribuído para a perda do plasmídeo.

As cepas transfectadas de nosso trabalho estavam desde 2016 armazenadas em nitrogênio líquido na FIOCRUZ, mas quando vieram para nosso laboratório em 2020, foram transferidas para o freezer -80°C. O método de descongelamento foi à temperatura ambiente. É possível que essa variação de temperatura de armazenamento e descongelamento pôde causar alterações moleculares tanto no protozoário quanto na estabilidade do plasmídeo.

Com relação a utilização de antibióticos para aumentar a estabilidade do plasmídeo, são inseridos genes que conferem resistência ao antibiótico no plasmídeo, seguido da adição do antibiótico correspondente ao meio de cultivo, permitindo a pressão seletiva das células com plasmídeo. Porém, em condições de cultura intensiva (alta densidade celular e/ou cultivo contínuo) o uso de antibióticos pode se tornar menos eficiente devido à diluição ou inativação do antibiótico (Baneyx, 1999).

Em 2016, quando as leishmanias foram transfectadas, o meio Schneider's era complementado com estreptomicina e penicilina (5µg/mL e 5U/mL respectivamente) e ainda havia a adição do antibiótico seletivo geneticina (8 µg/ml). Atualmente, esse meio é suplementado com gentamicina (10 µg/ml), que também é um aminoglicosídeo seletivo de estrutura semelhante a geneticina, então em um primeiro momento foi considerada a possibilidade de que esse antibiótico estaria fazendo pressão seletiva. Ao voltar com a adição de geneticina nesse meio, percebemos que a cultura não estava se multiplicando, além de apresentar algumas anormalidades na morfologia da promastigota. Ao analisarmos as especificações do produto do fabricante (Sigma-Aldrich, EUA) além de atuar no ribossomo 70S, a geneticina tem como espectro da ação antimicrobiana selecionar células transfectadas de modo estável com um construto de promotor iNOS e gene de resistência à neomicina, mostrando atividade contra protozoários e helmintos.

As cepas *Leishmania* teriam sido inicialmente selecionadas por algumas passagens sem geneticina (G418) após o descongelamento, o que seria crítico para a estabilidade dos episomos, resultando na perda destes na maior parte da população celular (Casagrande *et al.*, 2005). Cabe outrossim ressaltar que dados na literatura indicam que concentrações deste antibiótico até 64 vezes maiores, seriam fundamentais para melhor expressão de genes neste gênero de parasitos. Provavelmente, envolvendo a seleção de subpopulações com maiores números de cópias plasmidiais (Callahan *et al*, 1992; Coburn *et al*, 1991).

A presença de uma banda em um dos poços analisados com tamanho aproximado 600-650pb, pode indicar uma amplificação parcial do gene *gfp* e alguma deleção no mesmo, representando plasmídeos em baixo número de cópias. Porém, não é possível confirmar essa informação sem a realização de sequenciamento ou outras análises mais refinadas.

Outro detalhe a ser pontuado é que após a extração do DNA, não foi realizada a quantificação do mesmo. Isso é um ponto crítico, pois não foi definido a quantidade de DNA presente nas amostras, não dando a certeza se algum DNA foi analisado na PCR.

Os resultados desse trabalho mostram a importância do controle das variáveis em um estudo. Processos como estocagem, manutenção e manipulação de células devem ter metodologias cuidadosas, já que são fatores críticos, principalmente à nível molecular.

CONCLUSÕES

Após 3 anos de congelamento da cepa JOSEFA LAMAP nas condições testadas (com 10% glicerol e armazenamento em freezer -80°C), as promastigotas não foram capazes de manter a resistência ao estresse oxidativo induzido pela menadiona, a partir da concentração de 100 µM, apresentando uma redução significativa no seu número ao longo dos dias de experimento. Houve uma redução na viabilidade celular de ambas as cepas a partir da concentração de 100 µM. O plasmídeo não foi identificado pela análise por PCR qualitativo, indicando a perda dele.

PERSPECTIVA

- ✓ Refazer a transfecção de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com o gene *lamap*;
- ✓ Produzir uma cepa nocaute para o gene *lamap* de *L. (L.) amazonensis*;
- ✓ Avaliar a capacidade das cepas de resistir ao estresse oxidativo induzido por pró-oxidantes
- ✓ Testar a capacidade infectante das cepas *L. (L.) amazonensis* transfectadas e nocaute para macrófagos murinos.

REFERÊNCIAS

- ABE, Y. S. & SASAKI, S. (2016). DNA cleavage at the AP site via β -elimination mediated by the AP site-binding ligands. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(4), 910–914. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.016>
- AKHOUNDI, M., KUHLS, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P. & SERENO, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 10, Issue 3). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- ALVES, C. R., ALMEIDA, M. S. DE, SILVA, F. DE S., ACÁCIO, B., PEREIRA, S., LUIZ, R. & PEREIRA, A. (2014). Componentes de Superfície do Parasito e o Papel na Interação Parasito-Hospedeiro. *Editora FIOCRUZ*. <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0009>
- ASSIS, R. R. (2012). Glicoconjugados (GIPLs e LPGs) de *Leishmania braziliensis* e *L. infantum*: Modulação do Sistema Imune Inato e variações na estrutura de carboidratos [Dissertação]. Fundação Oswaldo Cruz.
- ATAYDE, V. D., HASSANI, K., FILHO, A. DA S. L., BORGES, A. R., ADHIKARI, A., MARTEL, C. & OLIVIER, M. (2016). Leishmania exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. In *Cellular Immunology* (Vol. 309, pp. 7–18). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.07.013>
- BANEYX, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology*, 411–421.
- BASU, M. K. & RAY, M. (2005). Macrophage and leishmania: An unacceptable coexistence. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 31, Issue 3, pp. 145–154). <https://doi.org/10.1080/10408410591005101>
- BATES, P. A. (2018). Revising Leishmania's life cycle. In *Nature Microbiology* (Vol. 3, Issue 5, pp. 529–530). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Visceral. Brasil, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 11 jul. 2023.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Tegumentar. Brasil, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 11 jul. 2023.
- BENNETT, R. A. O. & DEMPLE, B. (2013). DNA Base Excision Repair Pathways. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (pp. 603–608). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00618-6>
- BLACK, J. A., REIS-CUNHA, J. L., CRUZ, A. K. & TOSI, L. R. O. (2023). Life in plastic, it's fantastic! How Leishmania exploit genome instability to shape gene expression. In *Frontiers in*

Cellular and Infection Microbiology (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1102462>

- BORDIN, D. L., LIMA, M., LENZ, G., SAFFI, J., MEIRA, L. B., MÉSANGE, P., SOARES, D. G., LARSEN, A. K., ESCARGUEIL, A. E. & HENRIQUES, J. A. P. (2013). DNA alkylation damage and autophagy induction. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 753, Issue 2, pp. 91–99). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.001>
- CADET, J. & WAGNER, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012559>
- CALLAHAN, H. L., & BEVERLEY, S. M. (1992). A member of the aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(34), 24165–24168. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35743-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35743-0)
- CASAGRANDE, L., RUIZ, J. C., BEVERLEY, S. M., & CRUZ, A. K. (2005). Identification of a DNA fragment that increases mitotic stability of episomal linear DNAs in *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, 35(9), 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.04.004>
- CDC. CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Leishmaniasis: Epidemiology & Risk Factors. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>. Acesso em 20 mar. 2023
- CHARRET, K. S., REQUENA, C. E., CASTILLO-ACOSTA, V. M., RUIZ-PÉREZ, L. M., GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. & VIDAL, A. E. (2012). Trypanosoma brucei AP endonuclease 1 has a major role in the repair of abasic sites and protection against DNA-damaging agents. *DNA Repair*, 11(1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.10.006>
- CHATTERJEE, N. & WALKER, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* (Vol. 58, Issue 5, pp. 235–263). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- COBURN, C. M., OTTEMAN, K. M., MCNEELY, T., TURCO, S. J., & BEVERLEY, S. M. (1991). Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46(1), 169–179. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90210-W](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90210-W)
- CUNNINGHAM, R. P., SAPORITO, S. M., SPITZER, S. G. & WEISS, B. (1986). Endonuclease IV (nfo) Mutant of *Escherichia coli*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 168, Issue 3).
- CUNNINGHAM, R. P. & WEISS, B. (1985). Endonuclease III (nth) mutants of *Escherichia coli* (apurinic sites/thymine glycol-DNA glycosylase). In *Genetics* (Vol. 82).
- DALEY, J. M., ZAKARIA, C., & RAMOTAR, D. (2010). The endonuclease IV family of apurinic/aprimidinic endonucleases. In *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 705, Issue 3, pp. 217–227). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.07.003>
- DEMPLE, B., HALBROOK, J. & LINN, S. (1983). *Escherichia coli* xth Mutants Are Hypersensitive to Hydrogen Peroxide. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 153, Issue 2).

- DYRKHEEVA, N. S., LEBEDEVA, N. A. & LAVRIK, O. I. (2016). AP endonuclease 1 as a key enzyme in repair of apurinic/apyrimidinic sites. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 81, Issue 9, pp. 951–967). Maik Nauka Publishing / Springer SBM.
<https://doi.org/10.1134/S0006297916090042>
- FREITAS-MESQUITA, A. L., DICK, C. F., DOS-SANTOS, A. L. A., NASCIMENTO, M. T. C., ROCHAEL, N. C., SARAIVA, E. M. & MEYER-FERNANDES, J. R. (2019). Cloning, expression and purification of 3'-nucleotidase/nuclease, an enzyme responsible for the *Leishmania* escape from neutrophil extracellular traps. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 229, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.02.004>
- FRIEHS, K. (2004). Plasmid Copy Number and Plasmid Stability. *Adv Biochem Engin/Biotechno*, 86, 47–82. <https://doi.org/10.1007/b12440>
- GABRIEL, C., MCMASTER, W. R., GIRARD, D. & DESCOTEAUX, A. (2010). *Leishmania donovani* Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4319–4327. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000893>
- GALLEGO, C., ESTÉVEZ, A. M., FÁREZ, E., RUIZ-PÉREZ, L. M. & GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. (2005). Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 141(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.03.002>
- GHORBANI, M. & FARHOUDI, R. (2017). Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 12, pp. 25–40). Dove Medical Press Ltd.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>
- GUIMARÃES-COSTA, A. B., DESOUZA-VIEIRA, T. S., PALETTA-SILVA, R., FREITAS-MESQUITA, A. L., MEYER-FERNANDES, J. R. & SARAIVA, E. M. (2014). 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, 82(4), 1732–1740.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01232-13>
- HANDLER, M. Z., PATEL, P. A., KAPILA, R., AL-QUBATI, Y. & SCHWARTZ, R. A. (2015). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. In *Journal of the American Academy of Dermatology* (Vol. 73, Issue 6, pp. 911–926). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.014>
- KATAYAMA, K. Y. (2016). Avaliação do sistema de estabilização plasmidial toxina-antitoxina para a produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. Universidade de São Paulo.
- KRWAWICZ, J., ARCZEWSKA, K. D., SPEINA, E., MACIEJEWSKA, A. & GRZESIUK, E. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. www.actabp.pl
- LAINSON, R. (2010). The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2).
<https://doi.org/10.5123/s2176-62232010000200002>

- LEE, T. H., & KANG, T. H. (2019). DNA oxidation and excision repair pathways. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 23). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms20236092>
- LEVIN, J. D., & DEMPSEY, B. (1996). In vitro detection of endonuclease IV-specific DNA damage formed by bleomycin in vivo. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 24, Issue 5).
- ALHMOUD, J. F., WOOLLEY, J.F., MOUSTAFA, A.E. A., MALKI, M. I. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers*, v. 12, n. 4, p. 1050, 23 abr. 2020.
<https://doi.org/10.3390/cancers12041050>
- LIU, Z. J., CUESTA, S. M., VAN DELFT, P. & BALASUBRAMANIAN, S. (2019). Sequencing abasic sites in DNA at single-nucleotide resolution. *Nature Chemistry*, 11(7), 629–637.
<https://doi.org/10.1038/s41557-019-0279-9>
- MAGALHÃES, W. L. E., THÁ, E. L. & LEME, D. M. (2018). Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Embrapa.
- MITTRA B., CORTEZ M., HAYDOCK A., RAMASAMY G., MYLER P.J., ANDREWS N.W. (2013). Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels. *J. Exp. Med.* 210: 401–416.
- MOKNI, M. (2019). Cutaneous leishmaniasis. In *Annales de Dermatologie et de Venereologie* (Vol. 146, Issue 3, pp. 232–246). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2019.02.002>
- MOL, C. D., KUO, C.-F., THAYER, M. M., CUNNINGHAM, R. P. & TAINER, J. A. (1995). Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III. *Nature*, 374, 381–386.
- MULLINS, E. A., RODRIGUEZ, A. A., BRADLEY, N. P. & EICHMAN, B. F. (2019). Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 44, Issue 9, pp. 765–781). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.04.006>
- NGUYEN, H. H., PARK, J., PARK, S. J., LEE, C. S., HWANG, S., SHIN, Y. B., HA, T. H. & KIM, M. (2018). Long-term stability and integrity of plasmid-based DNA data storage. *Polymers*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/polym10010028>
- OLIVEIRA, M. Y. K. de. (2016). AP endonuclease de *Leishmania sp*: implicações funcionais e estruturais. Tese. Fundação Oswaldo Cruz.
- OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis. 2023. Disponível em:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 11 jul. 2023.
- OZTOPCU-VATAN, P., SAYITOGLU, M., GUNINDI, M., & INAN, E. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of menadione on rat hepatocellular carcinoma cells. *Cytotechnology*, 67(6), 1003–1009. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9739-7>

- PÉREZ, J., GALLEGU, C., BERNIER-VILLAMOR, V., CAMACHO, A., GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. & RUIZ-PÉREZ, L. M. (1999). Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the Trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 27, Issue 3).
- PIRES, S. & CUPOLILLO, E. (2012). Comparison of efficiency of different cryopreservation protocols for *Leishmania spp.* storage.
- PODINOVSKAIA, M. & DESCOTEAUX, A. (2015). Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. In *Future Microbiology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 111–129). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>.
- PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 58–66, 3 dez. 2012. <https://10.1038/nrmicro2929>
- PYNE, M., SUKHIJA, K. & CHOU, C. P. (2011). Genetic Engineering. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 2, pp. 81–91). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00089-1>
- QIAGEN. Quick-Start Protocol: DNeasy Blood & Tissue Kit., 04/2016, 2 p.
- RAMOTAR, D., POPOFF, S. C., GRALLA, E. B. & DEMPLE, B. (1991). Cellular Role of Yeast Apnl Apurinic Endonuclease/3'-Diesterase: Repair of Oxidative and Alkylation DNA Damage and Control of Spontaneous Mutation The APNI gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the major apurinic/aprimidinic endonuclease and 3'-repair DNA diesterase in yeast cell extracts. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*.
- ROLDÁN-ARJONA, T., ARIZA, R. R. & CÓRDOBA-CAÑERO, D. (2019). DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01055>
- ROSALES, C. & URIBE-QUEROL, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. In *BioMed Research International* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
- ROSS, R. (1903). FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. *BMJ*, 2(2239), 1401–1401. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2239.1401>
- SAGE, E. & SHIKAZONO, N. (2017). Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 107, pp. 125–135). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008>
- SARWAR, H. S., AKHTAR, S., SOHAIL, M. F., NAVEED, Z., RAFAY, M., NADHMAN, A., YASINZAI, M. & SHAHNAZ, G. (2017). Redox biology of *Leishmania* and macrophage targeted nanoparticles for therapy. In *Nanomedicine* (Vol. 12, Issue 14, pp. 1713–1725). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0049>

- SÉGUIN, O. & DESCOTEAUX, A. (2016). Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cellular Immunology*, 309, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.08.004>
- SERAFIM, T. D., COUTINHO-ABREU, I. V., OLIVEIRA, F., MENESES, C., KAMHAWI, S. & VALENZUELA, J. G. (2018). Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, 3(5), 548–555. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>
- SIGMA ALDRICH (EUA). Menadione: Ações bioquímicas/fisiológicas. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/m5625>. Acesso em: 13 jul. 2023.
- SILVA, Flávia Benine da Rocha. Introdução: Leishmanioses e Flebotomíneos. In: SILVA, Flávia Benine da Rocha. Avaliação da atratividade de hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) infectado com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* para *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). 2022. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/164bb468-c162-45e4-ab2a-6695c0e57764/content>. Acesso em: 5 out. 2023.
- SILVA, F., PASSARINHA, L., SOUSA, F., QUEIROZ, J. A. & DOMINGUES, F. C. (2009). Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19. <https://doi.org/10.4014/jmb.0805.329>
- SILVA, C. A. V. (2013). Clonagem do gene da AP-Endonuclease de *Leishmania braziliensis* (Ibrap) e ensaios de complementação funcional em cepas de *Escherichia coli* desafiadas com menadiona [TCC]. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- SILVA, M. F. L. da. Novel insights into parasite dynamics for leishmaniasis treatment. [S. l.]: Research Outreach, 2021. Disponível em: <https://researchoutreach.org/articles/novel-insights-parasite-dynamics-leishmaniasis-treatment/>. Acesso em: 1 jul. 2023.
- SINHA, R. P. & HÄDER, D. P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 1(4), 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
- SOLA, M. C., OLIVEIRA, A. P. DE, FEISTEL, J. C. & REZENDE E MINAFRA, S. (2012). MANUTENÇÃO DE MICRORGANISMOS: CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14), 1398–1418.
- SOUZA, L. L., EDUARDO, I. R., PÁDULA, M. & LEITÃO, A. C. (2006). Endonuclease IV and Exonuclease III are involved in the repair and mutagenesis of DNA lesions induced by UVB in *Escherichia coli*. *Mutagenesis*, 21(2), 125–130. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel006>
- SRINIVAS, U. S., TAN, B. W. Q., VELLAYAPPAN, B. A. & JEYASEKHARAN, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. In *Redox Biology* (Vol. 25). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- SUBRAMANIAN, A. & SARKAR, R. R. (2018). Perspectives on Leishmania Species and Stage-specific Adaptive Mechanisms. In *Trends in Parasitology* (Vol. 34, Issue 12, pp. 1068–1081). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.09.004>

- SUNTER, J. & GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, v. 7, n. 9, p. 170165, 13 set. 2017.
- VAN ASSCHE, T., DESCHACHT, M., DA LUZ, R. A. I., MAES, L. & COS, P. (2011). Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 51, Issue 2, pp. 337–351). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011>
- VAN DER VEEN, S. & TANG, C. M. (2015). The BER necessities: The repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 83–94). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3391>
- VAN GRIENSVEN, J. & DIRO, E. (2019). Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 33, Issue 1, pp. 79–99). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>
- VERISSIMO-VILLELA, E., OLIVEIRA, M. Y. K., REIS, A. B. DE B. DOS, ALBANO, R. M., DA-CRUZ, A. M. & BELLO, A. R. (2016). Functional complementation of Leishmania (Leishmania) amazonensis AP endonuclease gene (lamap) in Escherichia coli mutant strains challenged with DNA damage agents. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(5), 349–354. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150412>
- VIEIRA, T. DA S., DUQUE, G. A., ORY, K., GONTIJO, C. M., SOARES, R. P. & DESCOTEAUX, A. (2019). Leishmania braziliensis: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00319>
- VIGNARD, J., MIREY, G. & SALLES, B. (2013). Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up. In *Radiotherapy and Oncology* (Vol. 108, Issue 3, pp. 362–369). <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>
- WILLENBRINK, T. J. & ELSTON, D. M. (2018). What's Eating You? Sand Flies. *CUTIS*, 101(2), 103–106.
- YU, Y., WANG, P., CUI, Y. & WANG, Y. (2018). Chemical Analysis of DNA Damage. In *Analytical Chemistry* (Vol. 90, Issue 1, pp. 556–576). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04247>
- ZINOVKINA, L. A. (2018). Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 83, Issue 3, pp. 233–249). Pleiades journals. <https://doi.org/10.1134/S0006297918030045>