

JOICE DE MELO AGRIPINO

**TRANSCRIPTOMA DUAL DO EFEITO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE
ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS NA INFECÇÃO *IN VITRO* E
ESTUDOS DE HISTONAS DEACETILASES DE *L. braziliensis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A279t
2022 Agripino, Joice de Melo, 1993-
Transcriptoma dual do efeito leishmanicida de inibidores de
enzimas modificadoras de histonas na infecção *in vitro* e estudos
de histonas deacetilases de *L. braziliensis* / Joice de Melo
Agripino. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (128 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 76-85.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.685>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Transcriptoma. 2. Inibidores enzimáticos. 3. Proteínas. 4.
Leishmania braziliensis. I. Fietto, Juliana Lopes Rangel, 1971-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.8845

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

JOICE DE MELO AGRIPINO

TRANSCRIPTOMA DUAL DO EFEITO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS NA INFECÇÃO *IN VITRO* E ESTUDOS DE HISTONAS DEACETILASES DE *L. braziliensis*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2022.

Assentimento:



Joice de Melo Agripino
Autora



Juliana Lopes Rangel Fietto
Orientadora

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, Joel
(in memoriam) e Maria.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora por terem me conduzido até aqui. Parte deste trabalho foi desenvolvida durante a pandemia da Covid-19, em meio a todos os desafios que este período trouxe. Estar viva e poder defender este trabalho inunda o meu coração de gratidão.

Agradeço aos meus pais, Joel e Maria, por me nutrirem ao longo da vida com todo amor, apoio e por terem me ensinado as coisas mais importantes que me trouxeram até aqui: a bondade, a honestidade e a fé na vida. Ao meu pai, que enquanto estive fisicamente presente, por me lembrar de olhar a vida com serenidade. À minha mãe por ser a minha fortaleza de amor.

À minha irmã, às minhas tias e toda minha família que de alguma forma contribuiu para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao Miguel, que chegou em nossas vidas no primeiro dia deste ano, trazendo luz, vida nova, uma imensidão de esperança aos nossos corações e um gracioso par de covinhas.

Ao Rafael, meu grande amigo e companheiro nesta vida, por me acolher com o seu amor e sempre acreditar em mim.

Aos meus grandes amores de quatro patas Bentinho, Snoop, Safira e Maia.

À minha orientadora, Juliana, por acreditar e confiar a mim este projeto. Por ser uma orientadora amiga, companheira e acolhedora. Tenho muito orgulho em dizer que fui orientada por uma mulher, professora e pesquisadora como você.

Aos meus parceiros de bancada, cafés e dos memoráveis Pagodões no Duplex, os queridos Apyrados, Nancy, Walmir, Isadora, Raissa, Tati, Jackson, Anna Cláudia, Luciana, João, Letícia, Larissa, Lethícia, Victor, Marcelo e Marcel. À Edlêla, minha IC e companheira na reta final por toda ajuda, parceria e dedicação.

A todos os colegas do LIMA e LBBs, Mônica, Gabi, Flávia, Juliana; aos colegas de outros grupos de pesquisa, Renato, Sabrina e Adriana. Aos nossos técnicos, Sr. Valdir (*in memoriam*) e Dayse, por toda a colaboração e disponibilidade. Ao secretário da pós-graduação, Eduardo, por sua gentileza e sempre se dispor a me ajudar.

Agradeço de forma especial às minhas *Friends* Amanda, Fernanda, Nancy e Tarsi. Dividir esta caminhada com vocês tornou tudo mais fácil. A amizade que tenho com cada uma de vocês é um presente em minha vida.

Ao professor Tiago Mendes por toda orientação e boa vontade de sempre ensinar e contribuir com este trabalho e para a minha formação.

Ao Matheus Bastos pela primeira oportunidade de integrar um projeto de pesquisa e por toda parceria, colaboração e amizade.

Ao professor Luciano Fietto por contribuir diretamente para a realização deste trabalho.

A todos os professores e pesquisadores que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho; que defendem e lutam pela ciência e pela educação pública de qualidade que me trouxe até aqui.

Aos professores e pesquisadores pela disponibilidade em compor esta banca.

À Universidade Federal de Viçosa e ao BIOAGRO por toda infraestrutura.

Ao NIT-UFV por todo suporte e auxílio na redação e depósito de patente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos muito obrigada!

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

“This Project has received funding from the European Union’s Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 602080”.

“Quero fazer a minha parte no mundo de forma verdadeira e honesta, Anne... acrescentar um pouquinho ao conhecimento humano que todos os bons homens do mundo têm acumulado desde que a vida começou. As pessoas que viveram antes fizeram tanto por mim, que quero demonstrar minha gratidão fazendo algo por aquelas que viverão depois de mim.”

Anne de Avonlea, **Lucy Maud Montgomery.**

RESUMO

AGRIPINO, Joice de Melo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Transcriptoma dual do efeito leishmanicida de inibidores de enzimas modificadoras de histonas na infecção *in vitro* e estudos de histonas deacetilases de *L. braziliensis*.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação clínica mais comum entre as leishmanioses, grupo de doenças negligenciadas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. O Brasil concentra a maior parte dos casos de LC nas Américas, sendo *L. (Viannia) braziliensis* a espécie mais prevalente. O arsenal terapêutico para o tratamento das leishmanioses é escasso e provoca efeitos colaterais graves, sendo necessário o desenvolvimento de novos medicamentos. As histonas deacetilases (HDACs) e as proteínas arginina metiltransferases (PRMTs) possuem importância para a biologia de diferentes células, incluindo parasitos, pois atuam na epigenética afetando a regulação da expressão gênica e replicação. Por isto vêm sendo apontadas como potenciais alvos farmacológicos. Foram selecionados previamente um inibidor de PRMT (BSF2) e um inibidor de HDAC (TH85) com ação leishmanicida contra *L. braziliensis* na infecção de macrófagos. Como forma de avaliar potenciais mecanismos de ação, neste trabalho foi realizada a montagem e a análise de RNA-Seq dual de macrófagos infectados por *L. braziliensis* na infecção e tratados com o BSF2 e TH85. O tratamento com o BSF2 levou à modulação negativa da via do TNF em macrófagos, sendo esta via validada por PCR em tempo real. O tratamento com o TH85 não alterou a expressão diferencial de genes de macrófagos ou do parasito, indicando que este inibidor de HDAC pode realmente estar atuando diretamente no parasito, sem influência direta na transcrição gênica global. Complementando este trabalho, apresenta-se dados preliminares da deleção gênica por CRISPR/Cas9 das 4 HDACs de *L. braziliensis*. A deleção única ou dupla das HDACs parece ter influenciado no crescimento e divisão celular das populações transfectadas. Porém estes dados precisam ser confirmados com clones isolados. Este trabalho também apresenta o depósito de uma patente sobre a aplicação das HDACs de *L. braziliensis* recombinantes no diagnóstico de leishmaniose. Como conclusão, este trabalho reforça as HDACs e seus inibidores como potenciais aplicações biotecnológicas no desenvolvimento de medicamentos e de estratégias de diagnóstico de leishmaniose causada por *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Transcriptoma. Leishmanicida. *L. braziliensis*.

ABSTRACT

AGRIPINO, Joice de Melo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Dual transcriptome of leishmanicidal effect of histone-modifying enzyme inhibitors on *in vitro* infection and studies of histone deacetylases of *L. braziliensis***. Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical manifestation among leishmaniasis, a group of neglected diseases caused by parasites of the *Leishmania* genus. Brazil concentrates most cases of CL in the Americas, with *L. (Viannia) braziliensis* being the most prevalent species. The therapeutic arsenal for the treatment of leishmaniasis is scarce and causes serious side effects, requiring the development of new drugs. Histone deacetylases (HDACs) and proteins arginine methyltransferases (PRMTs) are important for the biology of different cells, including parasites, as they act in epigenetics, affecting the regulation of gene expression and replication. For this reason, they have been identified as potential pharmacological targets. A PRMT inhibitor (BSF2) and an HDAC inhibitor (TH85) with leishmanicidal action against *L. braziliensis* in macrophage infection were previously selected. As a way of evaluating potential mechanisms of action, in this work we performed the assembly and analysis of dual RNA-Seq from macrophages infected by *L. braziliensis* in the infection and treated with BSF2 and TH85. Treatment with BSF2 led to negative modulation of the TNF pathway in macrophages, which was validated by real-time PCR. Treatment with TH85 did not alter the differential expression of macrophage or parasite genes, indicating that this HDAC inhibitor may actually be acting directly on the parasite, without direct influence on global gene transcription. Complementing this work, we present preliminary data on the gene deletion by CRISPR/Cas9 of the 4 HDACs from *L. braziliensis*. The single or double deletion of HDACs seems to have influenced the growth and cell division of the transfected populations. However, these data need to be confirmed with isolated clones. This work also presents the filing of a patent on the application of recombinant HDACs from *L. braziliensis* in diagnosis of leishmaniasis. In conclusion, this work reinforces HDACs and their inhibitors as potential biotechnological applications in the development of drugs, and diagnostic strategies for leishmaniasis caused by *L. braziliensis*.

Keywords: Transcriptome. Leishmanicidal. *L. braziliensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas dos compostos BSF2 e TH85.....	15
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	19
Figura 3 – Modificações pós-traducionais em histonas de <i>P. falciparum</i> e <i>T. brucei</i>	24
Figura 4 – Acetilação e deacetilação de um resíduo de lisina.....	25
Figura 5 – Metilação de um resíduo de arginina.....	28
Figura 6 – Estrutura química dos iHDACs.....	30
Figura 7 – Perfil de expressão global de macrófagos e <i>L. braziliensis</i> durante a infecção tratada e não tratada com o composto BSF2.....	47
Figura 8 – Efeito do tratamento da infecção de macrófagos por <i>L. braziliensis</i> com o BSF2 sobre a expressão gênica global da célula hospedeira e do parasito.....	50
Figura 9 – Análise de ontologia genética (GO) dos grupos de genes de macrófagos diferencialmente expressos ou exclusivos em cada situação experimental.....	52
Figura 10 – Genes da via do TNF com expressão reduzida após o tratamento com o BSF2...	53
Figura 11 – Perfil de expressão dos genes de macrófagos associados à via do TNF α no tratamento com o BSF2 por qRT-PCR em diferentes condições experimentais.....	58
Figura 12 – Perfil de expressão global de macrófagos e <i>L. braziliensis</i> durante a infecção tratada e não tratada com o composto TH85.....	59
Figura 13 – Perfil de expressão global de macrófagos e <i>L. braziliensis</i> durante a infecção tratada e não tratada com o composto TH85.....	62
Figura 14 – Análise comparativa dos valores de FPKM para os genes mapeados no RNA-Seq, envolvidos em processos de modificação de cromatina.....	63
Figura 15 – Perfil de expressão de genes de macrófagos associados no tratamento com o TH85.....	64
Figura 16 – Confirmação da integração do cassete de pTB007 e expressão da Cas9.....	65
Figura 17 – Curva de crescimento das linhagens de LbM2904.....	66
Figura 18 – LbCas9 em meios seletivos: controle e HDAC1.....	68
Figura 19 – LbCas9 em meios seletivos: HDAC2.....	69
Figura 20 – LbCas9 em meios seletivos: HDAC3.....	70
Figura 21– LbCas9 em meios seletivos HDAC4.....	71
Figura 22 – Curvas de crescimentos das células transfectadas vs LbCas9 WT.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais e descrição	39
Tabela 2 – Sequências de <i>primers</i>	40
Tabela 3 – Localização genômica e números de acessos das LbHDACs	42
Tabela 4 – Sequências de gRNA	43
Tabela 5 – Sequências de <i>primers</i> para construção de DNA doador	44
Tabela 6 – Número de <i>reads</i> e genes mapeados entre os transcritos de macrófago e <i>L. braziliensis</i>	48
Tabela 7 – Genes de <i>L. braziliensis</i> mapeados somente na infecção tratada com o BSF2	49
Tabela 8 – Genes de <i>L. braziliensis</i> mapeados somente na infecção tratada com o TH85	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	O parasito	17
2.2	A genômica funcional da interação parasito-hospedeiro	20
2.3	Epigenética e enzimas modificadoras de histonas de parasitos	22
2.4	Inibidores de HMEs (iHMEs)	29
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	METODOLOGIA	34
4.1	Delineamento experimental.....	34
4.2	Cultivo celular e compostos	34
4.3	Ensaio de infecção de macrófagos por <i>L. braziliensis</i>	36
4.4	Análise do transcriptoma dual da infecção de <i>L. braziliensis</i> em macrófagos tratada com iHMEs.....	36
4.4	Validação por PCR em tempo real de transcritos revelados pelo transcriptoma dual da infecção de macrófagos por <i>L. braziliensis</i>	38
4.5	Deleção das HDACs de <i>L. braziliensis</i> por CRISPR/Cas9.....	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Capítulo 1: Análise do transcriptoma dual da infecção por <i>L. braziliensis</i> tratada com iHMEs.....	46
5.1.1	Perfil de expressão gênica global do transcriptoma dual no tratamento com o BSF2 e validação por qRT-PCR	46
5.1.2	Perfil de expressão gênica global do transcriptoma dual no tratamento com o TH85. 59	
5.2	Capítulo 2: Estudos das HDACs de <i>L. braziliensis</i>	65
5.2.1	Deleção das HDACs de <i>L. braziliensis</i> por CRISPR/Cas9	65
6	CONCLUSÕES.....	75
7	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE A – Curvas-padrão dos genes de macrófagos analisados por qRT-PCR.....	86
	APÊNDICE B – Amplificação dos cassetes de DNA doador – Neo 0,8 kb e Puro 0,6 kb.....	87

APÊNDICE C – Curva de crescimento por DO ₆₀₀	88
APÊNDICE D – PATENTE: Aplicação das HDACs de <i>L. braziliensis</i> no diagnóstico de leishmaniose	89
ANEXO	124

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose corresponde a um grupo de doenças tropicais negligenciadas que ocorrem no mundo e que afeta principalmente populações economicamente vulneráveis de países subdesenvolvidos. Diversas espécies de parasitos do gênero *Leishmania* são responsáveis por provocar a doença, sendo os parasitos transmitidos a mamíferos através da picada de fêmeas hematófagas de flebotomíneos infectadas (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Estima-se que 1 milhão de novos casos ocorram todos os anos e que 350 milhões de pessoas encontram-se em risco de infecção, distribuídos entre os 98 países que registram a doença no mundo. Nas Américas, o Brasil é responsável por 96% dos casos notificados no continente, sendo o país mais afetado entre os 19 que registram a doença (HERRERA et al., 2020; WHO, 2022).

A leishmaniose se apresenta de diferentes formas, que vão desde um quadro assintomático até as diversas manifestações clínicas evidentes. Este espectro de manifestações da doença é resultado de diversos fatores que determinam como a doença irá progredir, tais como, a espécie, cepa, o grau de virulência do parasito e o tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; PACE, 2014). Três principais formas clínicas são bem caracterizadas, a leishmaniose visceral (LV) que acomete vísceras e que corresponde à forma mais grave e potencialmente fatal se não tratada; a leishmaniose cutânea (LC), forma mais prevalente que resulta na formação de lesões na pele em áreas mais expostas do corpo, podendo evoluir para úlceras e grandes deformidades; e a leishmaniose muco cutânea (LMC) que compromete mucosas e ocorre por disseminação do parasito, simultaneamente ou anos depois de uma lesão de LC (PACE, 2014).

O tratamento para as leishmanioses conta com um arsenal limitado de medicamentos, como os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e suas formulações lipídicas, paromomicina e mitelfosina (AKBARI, ORYAN E HATAM, 2017). Em 2018 BURZA, CROFT E BOELAERT revisaram as terapias disponíveis para a tratamento da LC. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) segue as orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) para o tratamento das leishmanioses nas Américas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Diante de um o arsenal terapêutico escasso para o tratamento das leishmanioses, em sua maioria de administração intravenosa e que provoca diversos efeitos colaterais graves, como alta toxicidade e resistência adquirida pelos parasitos, justifica-se a importância da busca por

novos medicamentos como alternativas para o tratamento das leishmanioses (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; NAWAZ et al., 2020).

Uma estratégia terapêutica que vem sendo estudada é o reposicionamento de medicamentos que já possuem alvos epigenéticos bem validados no tratamento de outras doenças humanas como candidatos a drogas antiparasitárias. Nesta abordagem, os inibidores das histonas deacetilases (iHDACs) utilizados no tratamento de câncer têm sido aplicados como inibidores de HDACs de parasitos causadores de doenças parasitárias, como malária, esquistossomose, doenças de Chagas e leishmaniose (NAWAZ et al., 2020).

As histonas deacetilases (HDACs) fazem parte de uma superfamília de proteínas que possuem o domínio deacetilases altamente conservado. Estas proteínas estão relacionadas com a regulação da transcrição do DNA em células eucarióticas, onde o DNA encontra-se compactado e organizado na forma de cromatina (NAWAZ et al., 2020; SETO; YOSHIDA, 2014).

Outras proteínas importantes neste contexto são as proteínas arginil metiltransferases (PRMTs). As PRMTs participam de diversos processos celulares, como o reparo de DNA, a sinalização celular, o metabolismo de RNAs e interagem com diversas proteínas ligadoras de RNA (RBPs) (CAMPAGNARO et al., 2021; HWANG et al., 2021).

A unidade formadora da cromatina, o nucleossomo, é um complexo dinâmico de DNA-proteína composto por um octâmero de proteínas histonas e material genético. As histonas presentes nos nucleossomos são passíveis de sofrerem modificações pós-traducionais pela ação das enzimas modificadoras de histonas, como as HDACs e as PRMTs. Estas modificações pós-traducionais alteram o grau de compactação da cromatina que atua como um regulador de diversos processos celulares importantes, como a replicação e a transcrição do DNA (NAWAZ et al., 2020; RUIJTER et al., 2003).

O estado de compactação do DNA é dependente da repulsão que ocorre entre as cargas negativas naturais do grupo fosfato do DNA e as cargas presentes nas histonas; com a acetilação de histonas, ocorre uma neutralização de cargas nestas histonas, provocando um relaxamento da cromatina. Por outro lado, se o conteúdo de cargas negativas diminui, devido a remoção dos grupos acetil, a cromatina tende a se compactar novamente. Este processo é controlado por enzimas que acetilam ou deacetilam as histonas, respectivamente, as histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas deacetilases (HDACs). Além da ação destas enzimas, há também a ação das enzimas do complexo de remodelação de cromatina que reconhecem marcas moleculares, como a acetilação, e auxiliam neste processo de remodelação. Assim, as HDACs são também conhecidas como repressoras da transcrição gênica por promoverem a deacetilação de resíduos

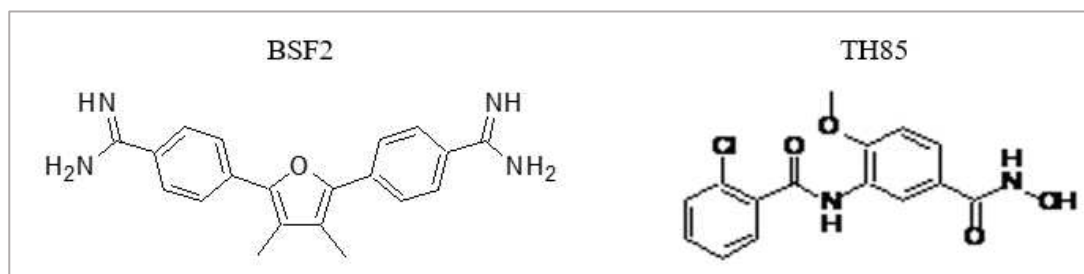
específicos das caudas de histonas, levando à diminuição do conteúdo de carga negativa e o aumento de compactação da cromatina, impedindo o acesso de fatores de transcrição ao DNA (RUIJTER et al., 2003).

A metilação de histonas, assim como a acetilação de histonas é uma das modificações pós-traducionais mais bem caracterizadas. Esta modificação altera a estrutura do resíduo de arginina metilado, modulando as suas interações com outras proteínas que regulam funções fisiológicas (FUHRMANN; THOMPSON, 2016; WYSOCKA; ALLIS; COONROD, 2006; ZHANG, Jing et al., 2019). O equilíbrio entre a ação das PRMTs e das enzimas demetilases, que desempenham função oposta, é de fundamental importância para a homeostase celular, uma vez que a metilação é um processo desregulado em diferentes tipos de câncer (HWANG et al., 2021; KANISKAN; MARTINI; JIN, 2018; SHI, 2007). Portanto, assim como as HDACs, as PRMTs também têm sido alvos moleculares para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de diversas doenças, como o câncer e doenças parasitárias (HWANG et al., 2021; NAWAZ et al., 2020).

Diversos patógenos parasitas de humanos possuem HDACs e PRMTs de diferentes classes em seu genoma, sendo estas importantes para o desenvolvimento de diversos parasitos, inclusive do gênero *Leishmania* (ANDREWS, K et al., 2012; CAMPAGNARO et al., 2021).

Estudos prévios do nosso grupo selecionaram alguns inibidores de enzimas modificadoras de histonas com ação leishmanicida contra *L. braziliensis* na infecção *in vitro* e *in vivo* (SOUZA, 2022; SOUZA et al., 2020). Dentre os compostos com maior atividade leishmanicida estão o BSF2 e o TH85, inibidores de PRMT e HDAC respectivamente (figura 1).

Figura 1 – Estruturas dos compostos BSF2 e TH85



O BSF2 é um análogo da Furamidina, uma diamidina difenilfurano que possui atividade antimicrobiana em *Giardia lamblia* e *Plasmodium falciparum*. Além de poderem agir como inibidores de PRMTs, compostos como a Furamidina possuem mecanismo de ação relacionado à capacidade de se ligarem ao DNA em locais ricos em A-T (adenina e timina), podendo assim inibir a ligação de enzimas dependentes de ligação ao DNA para desempenho de suas funções, impedindo processos de transcrição gênica (ARAFÁ R.K. et al., 2005). O outro composto selecionado, o TH85, é um derivado do ácido hidroxâmico, conhecido por ser inibidor de HDACs, desenvolvido em um projeto anterior, SETReND (2010-2012), em que foi possível criar uma biblioteca de compostos inibidores da HDAC 8 de *Schistosoma*, além de uma biblioteca de compostos a serem testados contra *Leishmania* (MELESINA et al., 2015; SOUZA, 2016).

Como forma de continuar os estudos no campo do desenvolvimento de novos medicamentos para tratamento de LC causada por *L. braziliensis*, neste projeto procuramos aprofundar o estudo dos mecanismos de ação do BSF2 e TH85 e validar geneticamente as HDACs 1-4 de *L. braziliensis* (LbHDAC) como alvos farmacológicos. Para estudar melhor o mecanismo de ação dos compostos foi feita a análise do transcriptoma dual da infecção *in vitro* e, para validar os alvos farmacológicos foi feita a deleção gênica das LbHDAC 1-4 por CRISPR/Cas9. Os dados deste trabalho demonstram que o BSF2 atua na regulação da expressão gênica, principalmente da célula hospedeira, e que o TH85 não afeta significativamente o transcriptoma dual. Além disso, dados preliminares com os mutantes deletados de cada uma das LbHDACs sugerem que estas são importantes alvos farmacológicos, pois afetaram de forma significativa o desenvolvimento do parasito *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

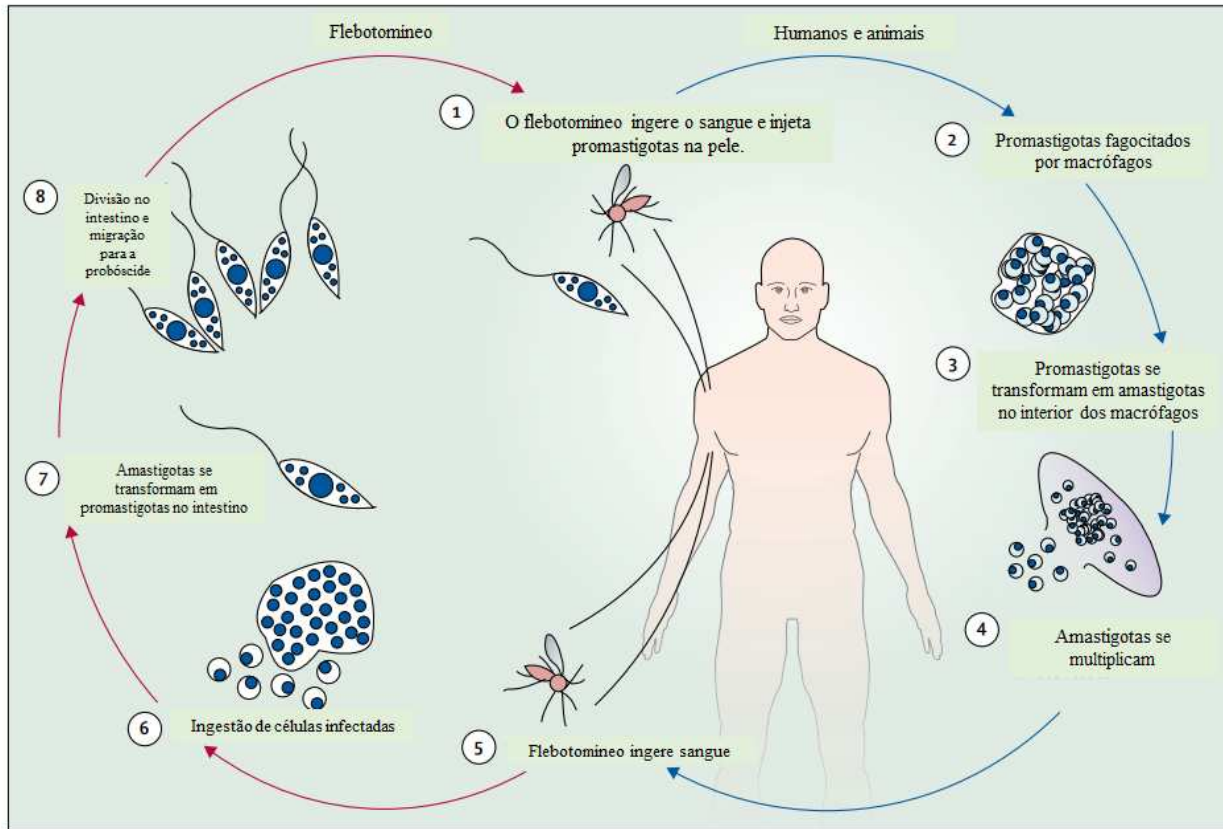
2.1 O parasito

O gênero *Leishmania* compreende mais de 53 espécies de protozoários identificadas, sendo mais de 20 espécies de parasitos patogênicas para humanos (SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021). Os parasitos deste gênero são considerados digenéticos, pois completam o ciclo de vida em dois hospedeiros diferentes, sendo transmitidos das fêmeas de flebotomíneo infectadas para hospedeiros mamíferos durante o repasto sanguíneo. Os flebotomíneos da família *Psychodidae* são insetos hematófagos, vetores de transmissão de *Leishmania* para mamíferos, com mais de 98 espécies divididas em dois gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, que transmitem os parasitos no Velho e Novo Mundo respectivamente (MAROLI et al., 2013; WHO, 2017). No flebotomíneo, os parasitos são encontrados em sua forma extracelular flagelada (promastigota) no trato gastrointestinal, já no hospedeiro vertebrado são encontrados em sua forma arredondada (amastigota) no interior de células do sistema imune (PACE, 2014).

Diferentes espécies de *Leishmania* provocam a leishmaniose mais comumente encontrada, a forma cutânea (LC), também chamada de leishmaniose tegumentar, terminologia proposta por pesquisadores brasileiros pela primeira vez em 1925 e que abrange as formas cutânea, cutânea difusa e mucocutânea (SIVIERO DO VALE; FURTADO, 2005). As espécies que provocam a LC podem ser classificadas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. No Novo Mundo as espécies causadoras de LC são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) pifanoi*, *L. (Leishmania) venezuelensis*, *L. (Viannia) peruviana*, *L. (Viannia) shawi* e *L. (Viannia) lainsoni*. As espécies que causam a LC no Velho Mundo são: *L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) tropica*, *L. (Leishmania) aethiopica*, e alguns isolados de *L. (Leishmania) infantum* (GOTO E LAULETTA LINDOSO, 2012).

Nas Américas, diversas espécies de *Leishmania* e vetores flebotomíneos circulam em uma mesma área e várias manifestações clínicas são simultaneamente observadas, o que torna complexa a situação epidemiológica da LC (WHO, 2017). Entre as espécies observadas, *L. (Viannia) braziliensis*, é a espécie com maior distribuição geográfica no continente, provocando além da LC, a forma mucocutânea, manifestação clínica mais grave, que pode apresentar-se em estágio assintomático durante anos, mas na maioria dos casos provoca nódulos subcutâneos, pápulas e comprometimento linfonodal, evoluindo para a formação de úlceras em mucosas e graves deformidades; o que torna essencial o tratamento para a resolução da infecção (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; HANDLER et al., 2015).

O ciclo de vida do parasito tem início quando uma fêmea de flebotomíneo infectada se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado e inocula o parasito durante o repasto sanguíneo em sua forma infecciosa (promastigota metacíclica). Ao ser transmitido para o hospedeiro vertebrado, o parasito é capturado por células do sistema fagocitário mononuclear, como os neutrófilos, que são o primeiro tipo celular a ser recrutado após a infecção, macrófagos e células dendríticas (AL-KAMEL, 2017; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2018; POMPEU et al., 1991). No interior da célula hospedeira, o parasito se diferencia para a sua forma intracelular, denominada amastigota, onde ocorrerá a replicação do parasito. Após sucessivos ciclos de replicação ocorre a lise da célula hospedeira, e assim, os parasitos poderão ser fagocitados por outras células vizinhas, como macrófagos e células dendríticas, dando continuidade ao processo infeccioso. O ciclo se completa quando o flebotomíneo ingere o sangue de um hospedeiro vertebrado infectado e, o parasito se diferencia novamente para sua forma promastigota migrando para a região anterior do intestino do vetor, em direção à proboscíde, estrutura utilizada para perfurar a pele e consumir sangue (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Em um novo repasto sanguíneo o parasito poderá ser mais uma vez transmitido a um hospedeiro vertebrado, como ilustra a figura 2:

Figura 2 – Ciclo de vida de *Leishmania*

Durante o repasto sanguíneo ocorre a transmissão do parasito para o hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado de BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018.

Após a infecção, a manutenção e progressão do processo infeccioso dependem de fatores como a adaptação do parasito ao hospedeiro e a ineficácia da resposta imune produzida pelas células fagocitárias (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2018). Parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de sobreviverem e se multiplicarem em condições extremas como estresse oxidativo, variações de temperatura e baixos valores de pH (DE PABLOS; FERREIRA; WALRAD, 2016), além de possuírem mecanismos elaborados de evasão do sistema imune (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Tais mecanismos incluem a expressão de lipofosfoglicano (LPG) modificado em sua superfície, o que aumenta a tolerância do parasito à lise pelo sistema complemento; apresentação defeituosa de antígeno via MHC tipo II e modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias importantes para a resolução da infecção por *Leishmania*, como o TNF α e INF γ (GEIGER et al., 2016; ROY et al., 2014). Além disso, ocorrem alterações em funções e vias de sinalização em macrófagos, células hospedeiras chave na resolução de infecção por *Leishmania*, por exemplo, alteração na síntese proteica, através da ativação de repressores de tradução (JARAMILLO et al., 2011); e interferência em vias sinalização purinérgica, relacionada a atividade de ENTPDases e ecto 5'-nucleotidase, a fim de favorecer

o parasito (DA SILVA, Walmir et al., 2021; FIGUEIREDO; SOUZA-TESTASICCA; AFONSO, 2016).

A complexidade da interação parasito-hospedeiro é bastante evidente nas infecções por *L. braziliensis*, em que são observados desde um quadro assintomático até graves lesões e ulcerações, resultado de um equilíbrio dinâmico entre a adaptabilidade do parasito ao hospedeiro, para manter a infecção e a ruptura deste equilíbrio para a progressão da doença (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015). Neste contexto, a genômica funcional surge como uma ferramenta importante para o estudo destas interações patógeno-hospedeiro, fornecendo informações sobre mecanismos moleculares envolvidos na doença (PROBST et al., 2012).

2.2 A genômica funcional da interação parasito-hospedeiro

O genoma de parasitos do gênero *Leishmania* apresenta um tamanho de aproximadamente 32Mb, com mais de 8000 genes codificantes, organizados entre 34 e 36 cromossomos, número que varia entre as espécies, e um conteúdo de citosina e guanina (CG) superior a 60%. No subgênero *Viannia*, *L. braziliensis* é a espécie que mais difere em relação a organização genômica das demais espécies que compõem o subgênero, apresentando 35 cromossomos em seu genoma, devido a fusão dos cromossomos 20 e 34. A sintenia genômica, ordem em que os genes se apresentam dispostos no genoma, é uma característica 99% conservada entre as espécies *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*, com poucos genes exclusivos, o que sugere que a aquisição de novos genes não é um fator determinante para as diferenças observadas entre estas espécies (LAFFITTE et al., 2016; PEACOCK et al., 2007).

À plasticidade gênica, que confere as diferentes características fenotípicas observadas entre as espécies de *Leishmania*, são atribuídas as adaptações genômicas do parasito, como a dosagem gênica que ocorre tanto a nível de um único gene, quanto a nível cromossômico (IANTORNO et al., 2017). Pois através da variação do número de cópias do DNA, por aneuploidia, amplificação ou deleção gênica, moléculas alvos e transportadores de medicamentos têm sua expressão alterada, levando a desenvolvimento de resistência ao tratamento como revisado por LAFFITTE et al., 2016.

Uma característica típica de tripanossomatídeos como *Leishmania* é a organização de genes em policístrons, que são transcritos constitutivamente, de forma bidirecional e sem a presença de um promotor definido (LAFFITTE et al., 2016). Entretanto, além de mecanismos adaptativos, como a plasticidade gênica, os mecanismos epigenéticos de controle da transcrição gênica vêm sendo amplamente explorados em parasitos nos últimos anos, pois permitem a

alteração do padrão de expressão gênica de forma rápida e variada em resposta às condições de crescimento e desenvolvimento (CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012). Entre os mecanismos epigenéticos estão a expressão de variantes de histonas que possuem interação direta com o DNA e alteram a estabilidade da cromatina, facilitando a expressão gênica; e as modificações pós-traducionais que vão interferir na transcrição de genes, permitindo alterações rápidas no padrão de expressão gênica destes parasitos e na interação com as células hospedeiras, de forma a modular a expressão destas células em favorecimento da progressão e manutenção do processo infeccioso (CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012; LECOEUR et al., 2020).

Em tripanossomatídeos é comum a presença de sequências repetitivas, principalmente de famílias multigênicas que codificam glicoproteínas de superfície que estão diretamente envolvidas na interação parasito-hospedeiro. Em *Trypanosoma cruzi* e parasitos do gênero *Leishmania* estes genes estão dispersos pelo genoma, o que dificulta a realização de experimentos de nocaute e de RNA de interferência, devido à ausência de maquinaria molecular em algumas espécies de *Leishmania*, o que implica em diferentes abordagens de genômica funcional em estudos com estes parasitos (DE PAIVA et al., 2015).

A compreensão da interação parasito-hospedeiro é essencial para definir estratégias de tratamento e prevenção da doença. Assim, a aplicação do sequenciamento de RNA de alto rendimento (RNA-Seq), surge como uma importante ferramenta para determinar quais as modificações ocorrem em macrófagos infectados por diversos patógenos, inclusive do gênero *Leishmania* (FERNANDES et al., 2016). Em análises de RNA-Seq é possível mensurar o perfil dos transcritos, tamanho, padrão de *splicing*, assim como alterações dos níveis de expressão gênica de uma célula através das moléculas de RNA presentes em uma amostra com alta precisão, o que faz com que a técnica seja predominante nas análises de transcriptômica. Outra possibilidade que a técnica permite é a abordagem RNA-Seq dual utilizada neste trabalho, que avalia simultaneamente as alterações nos padrões de expressão gênica do parasito e do hospedeiro, a fim de identificar como e quais os processos desta interação parasito-hospedeiro são modulados ao longo do processo de infecção. Pois, além de uma análise aprofundada da resposta do hospedeiro, o RNA-Seq dual é capaz de fornecer informações sobre o transcriptoma do parasito durante a infecção (MUKHERJEE; HEITLINGER, 2019).

Assim, com as informações geradas nas análises de transcriptômica, diversas ferramentas moleculares que vão desde a validação de genes diferencialmente expressos por qPCR, até a manipulação e edição de genomas por CRISPR/Cas9, podem ser aplicadas para validar genes de importância para a biologia parasitária, bem como a validação de alvos ou vias de ação de medicamentos utilizados na terapia da leishmaniose (DUNCAN; JONES; MOTTRAM, 2017).

2.3 Epigenética e enzimas modificadoras de histonas de parasitos

Em eucariotos o DNA de uma célula encontra-se compartimentalizado no núcleo, organizado em cromossomos e associados a proteínas formando um complexo dinâmico, a cromatina. As unidades formadoras da cromatina são os nucleossomos, compostos por um octâmero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) – pequenas proteínas básicas que se encontram em contato direto com o DNA. Dispostas em dímeros, as histonas envolvem aproximadamente 147 pb de DNA e, externamente, unem os nucleossomos através da histona H1. No interior dos nucleossomos as histonas são dispostas de forma a interagir tanto com o DNA, quanto entre si mantendo suas porções N-terminais expostas (ALLIS; JENUWEIN, 2016; ROTHBART; STRAHL, 2014).

Nos tripanossomatídeos, a estrutura básica da cromatina também é composta por nucleossomos. Estes organismos possuem várias cópias de genes de histonas H2A, H2B, H3 e H4 em seus genomas, porém bastante diferentes das histonas encontradas em outros organismos, principalmente no domínio N-terminal destas proteínas; a histona H1 também difere por ser menor e não possuir uma região globular. Outras diferenças estruturais são observadas na cromatina destes parasitos: o padrão de aproximadamente 200 pb contidos em cada nucleossomo; a ausência de cromossomos condensados durante a mitose; e a não organização dos nucleossomos em fitas de 30 nm, padrão observado nos demais eucariotos. A localização dos genes em nucleossomos também é diferente, pois em *L. tarentolae* e *L. major* algumas regiões promotoras e de transcrição não estão presentes em regiões de nucleossomos, mas sim nas regiões intergênicas. Sabe-se que a organização e a disposição dos nucleossomos possuem importante papel no controle da transcrição de genes em tripanossomatídeos, da mesma forma que nos demais eucariotos (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2018; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

Além de expressarem as histonas clássicas, os tripanossomatídeos também expressam as variantes de histonas H2A.Z, H2A.X, H2B-A, H2B-B, H3.3, CenH3, além das variantes específicas de parasitos H2Bv, H3V e H4V (CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012). *T. brucei* e *L. major* expressam as variantes de H2A.Z e H2Bv, que dimerizam apenas entre si e são essenciais para a viabilidade celular dos parasitos. Já as variantes H3V e H4V, identificadas em *T. brucei*, mas não em *Leishmania*, são exclusivas de tripanossomatídeos, porém não essenciais, como revisado por MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010.

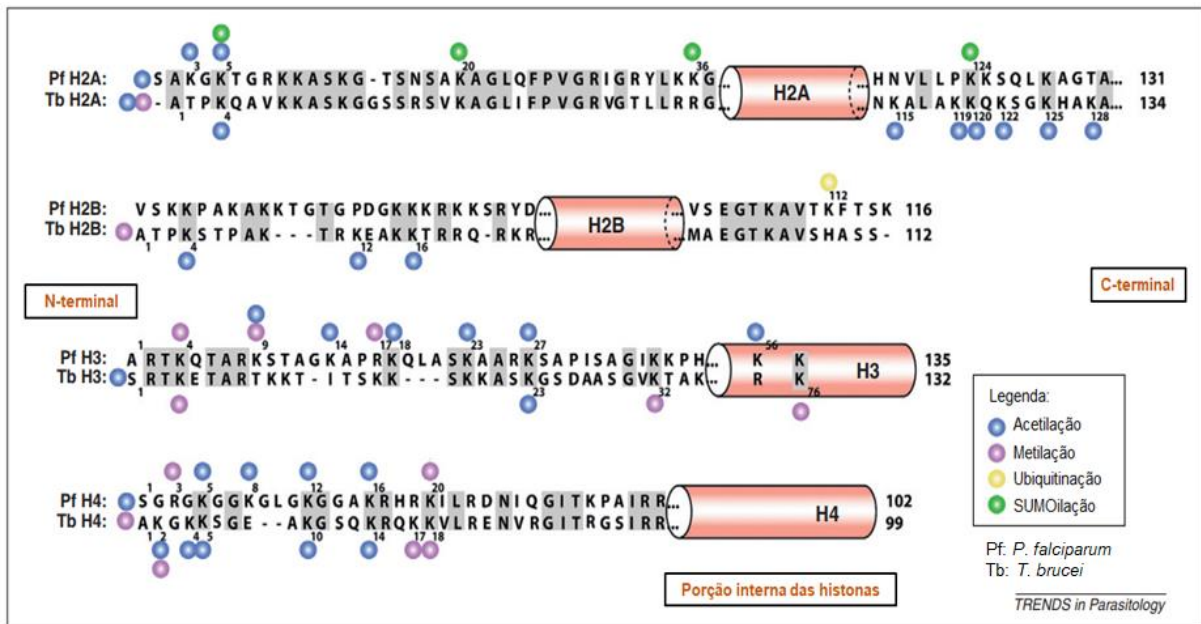
As histonas são capazes de interferir diretamente em processos de replicação, reparo do DNA e transcrição de genes, através das modificações pós-traducionais que sofrem. As

modificações pós-traducionais alteram a estrutura da cromatina local por meio da adição ou neutralização de cargas, alterando a hidrofobicidade que interfere na formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas. Além disso, estas modificações são reconhecidas por proteínas leitoras que levam a ativação ou a repressão da transcrição gênica (KIM; SAMARANAYAKE; PRADHAN, 2009). Mudanças de estrutura da cromatina têm impacto direto no controle destes processos celulares, assim a sua organização e a compactação estão sujeitas a uma fina regulação que ocorre através dos complexos de remodelamento de cromatina dependentes de ATP; das modificações nas caudas N-terminais das histonas e das substituições de histonas canônicas por suas variantes (FYODOROV et al., 2017; RUIJTER et al., 2003).

Neste ponto, podemos então definir o termo epigenética como o conjunto de alterações hereditárias de um organismo em seu padrão de expressão gênica, que alteram o estado da cromatina, sem afetar a sequência de DNA, constituindo o ‘código de histonas’ (CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012; WATSON et al., 2014).

Muitas são as modificações pós-traducionais que as histonas podem sofrer, entre elas estão acetilação, metilação – modificações mais compreendidas até o momento, fosforilação, ubiquitinação, entre outras. De forma geral, estas modificações ocorrem principalmente na cauda N-terminal destas proteínas, região rica em resíduos de lisina e arginina, porém a porção interna e o domínio globular C-terminal também são passíveis de serem modificados. As modificações ocorrem em locais específicos da cromatina, podem ser únicas, ou sobrepostas e estão diretamente relacionadas a eventos de estágios biológicos de uma determinada célula (LOTHROP, TORRES e FUCHS, 2013). Na figura 3 estão ilustradas diferentes modificações pós-traducionais em histonas e os locais em que ocorrem, para duas espécies de parasitos.

Figura 3 – Modificações pós-traducionais em histonas de *P. falciparum* e *T. brucei*



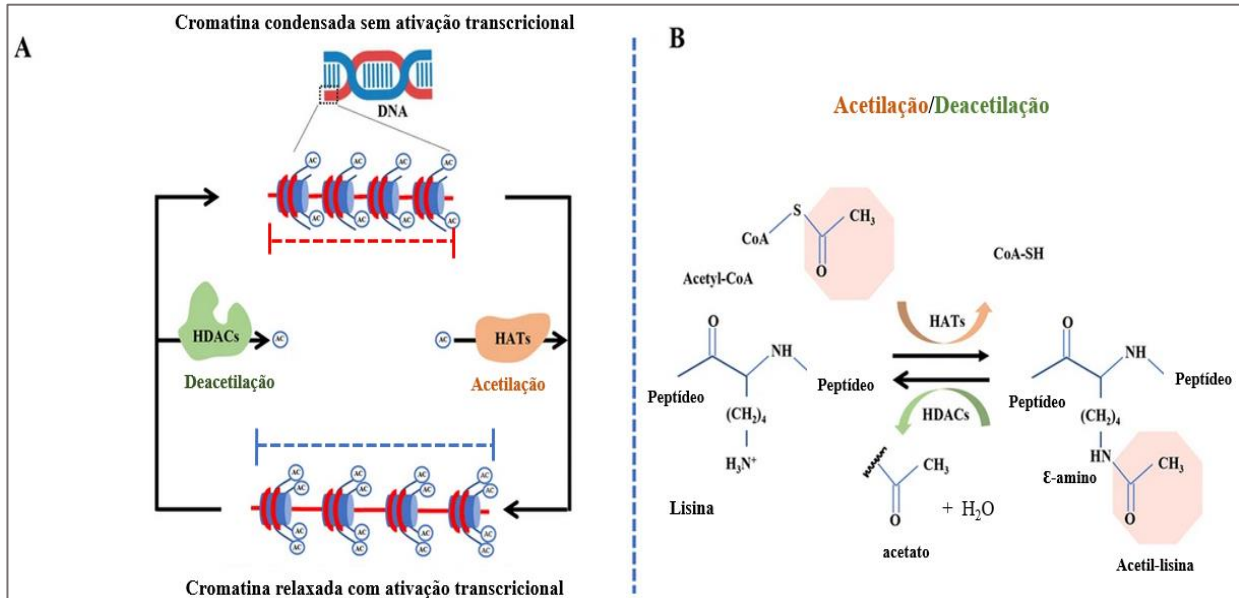
Na imagem é possível ver a comparação das sequências proteicas das histonas e os locais de suas respectivas modificações pós-traducionais (círculos coloridos). A maioria das modificações identificadas em *P. falciparum* (Pf) são comuns em outros eucariotos, já as modificações de *T. brucei* (Tb) são diferentes. Fonte: Adaptado de CROKEN, NARDELLI E KIM, 2012.

Diversas proteínas desempenham atividade relacionada às modificações pós-traducionais de histonas – enzimas modificadoras de histonas (HMEs). Entre elas estão as acetiltransferases, as histonas deacetilases, as proteínas arginil metiltransferases e as demetilases. As histonas deacetilases (HDACs) são as enzimas que realizam atividade contrária às histonas acetiltransferases (HATs), removendo os grupos acetil de resíduos de lisina das histonas. Em humanos são identificadas 18 HDACs divididas em quatro classes: Classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8); Classe II (IIa: HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9 e IIb: HDAC6 e HDAC10 – enzimas que possuem dois domínios catalíticos); Classe IV (HDAC11) e a Classe III ou Sirtuínas (SIRT1-7), assim denominadas por apresentarem um alto grau de conservação e similaridade com reguladores de informação silenciosa-2 de levedura (Sir2). Tais classificações são baseadas nas diferenças de estrutura, função, localização subcelular e mecanismo de ação das HDACs. As HDACs das classes I, II e IV são Zn²⁺-dependentes, enquanto as SIRTs são NAD⁺-dependentes (MARTINEZ-CALVILLO et al., 2018; SETO; YOSHIDA, 2014).

A atividade das HDACs impacta diretamente no balanço da acetilação celular. Estas enzimas removem grupos acetil, ε-amino de resíduos de lisinas, que foram adicionados pelas HATs, através da catalização da transferência do acetil da Coenzima-A para os resíduos de lisina da cauda das histonas (figura 4). Juntas, as HATs e as HDACs promovem um

balanceamento necessário para o correto desempenho da proliferação, crescimento e diferenciação celulares (REKOWSKI; GIANNIS, 2010).

Figura 4 – Acetilação e deacetilação de um resíduo de lisina



Mecanismo de ação das HATs e HDACs. **A)** Condensação e relaxamento da cromatina devido à acetilação e deacetilação de histonas. Os níveis de acetilação de histonas são determinados pela interação entre HATs e HDACs. A ação de HDACs leva a uma diminuição líquida da acetilação de histonas, condensação de cromatina e repressão transcricional. A ação de HATs resulta em um aumento líquido de acetilação de histonas, relaxamento da cromatina e ativação transcricional. **B)** Fórmula química da acetilação e deacetilação do grupamento ε-amino de um resíduo de lisina. Fonte: Adaptado de NING et al., 2021.

O balanço da acetilação de proteínas é um mecanismo evolutivamente conservado, dada a importância que possui para o correto funcionamento celular. Pois diversas proteínas citoplasmáticas, nucleares e fatores de transcrição, presentes em diferentes mecanismos celulares, como reparo e replicação de DNA, vias de metabólicas e de sinalização celular são acetiladas de forma reversível (REKOWSKI; GIANNIS, 2010). Tal fato é também observado em diversos parasitos que apresentam proteínas histonas e não-histonas acetiladas, em diferentes níveis ao longo de seus estágios de desenvolvimento. Estas proteínas são importantes para a regulação de diferentes processos celulares, como enzimas metabólicas e enzimas envolvidas em processos de oxirredução, necessárias para adaptação e sobrevivência de parasitos em seus hospedeiros, sugerindo mais este papel regulador da acetilação proteica (MARAN et al., 2021).

Neste contexto, as HDACs possuem um papel importante tanto na regulação da transcrição gênica, quanto na regulação de modificação pós-traducional de proteínas não-histonas. Uma vez que a deacetilação de histonas causa a compactação da cromatina, levando

à repressão transcricional; e a deacetilação de proteínas não-histonas, como fatores de transcrição e mediadores de sinal que regulam a homeostase celular, interferindo na atividade, estabilidade e interação dessas proteínas (YOON; EOM, 2016). Dessa forma, por atuarem como silenciadoras em vias de regulação transcricional e progressão do ciclo celular, as HDACs são alvos terapêuticos de inibidores no tratamento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, diferentes tipos de câncer e doenças parasitárias (DI BELLO et al., 2022; FIORAVANTI et al., 2020; MAKKAR; BEHL; ARORA, 2020; YOON; EOM, 2016).

Os tripanossomatídeos apresentam em seu genoma genes de diversas enzimas envolvidas em processos de modificações pós-traducionais de histonas e diversas histonas deacetilases já foram identificadas nos genomas destes parasitos (PEACOCK et al., 2007; MARTINEZ-CALVILLO et al., 2017).

T. brucei possui 3 genes de SIRT e 4 genes de HDACs de classes I e II, sendo duas proteínas, TbHDAC1 e TbHDAC3 essenciais à sobrevivência do parasito, enquanto as TbHDAC2 e 4 não são essenciais para a viabilidade celular, embora a deleção da TbHDAC4 afete a progressão do ciclo celular (INGRAM; HORN, 2002; OUAISSI; OUAISSI; G, 2006). Em *T. cruzi* as HDACs 1 e 2 são essenciais para a sobrevivência do parasito (MAREK et al., 2021), enquanto a TcHDAC4 não afeta a viabilidade do parasito, mas com a deleção deste gene formas tripomastigotas metacíclicas do parasito apresentam morfologia alterada e um núcleo menos condensado, mais próximo ao cinetoplasto (PICCHI-CONSTANTE et al., 2021).

Em *L. major* quatro genes foram identificados; a principal proteína é LmSIR2RP1, proteína de *L. major* homóloga à SIR2p de levedura, possui homólogos expressos no citoplasma de outras espécies de *Leishmania* e sua expressão é observada nos dois estágios celulares do parasito, promastigota e amastigota. *L. infantum chagasi* possui uma proteína relacionada à SIRT2, a LiSIRT2 que foi encontrada e relacionada à sobrevivência do parasito (ANDREWS, K et al., 2012; OUAISSI; OUAISSI, 2006). Em *L. donovani* foram identificados quatro genes de HDACs e três genes Sirtuínas, sendo um gene de HDAC clonado, expresso em *E. coli*, purificado e caracterizado e modelado por homologia à HDAC2 de humano (ANDREWS, K et al., 2012; PRASANNA et al., 2021).

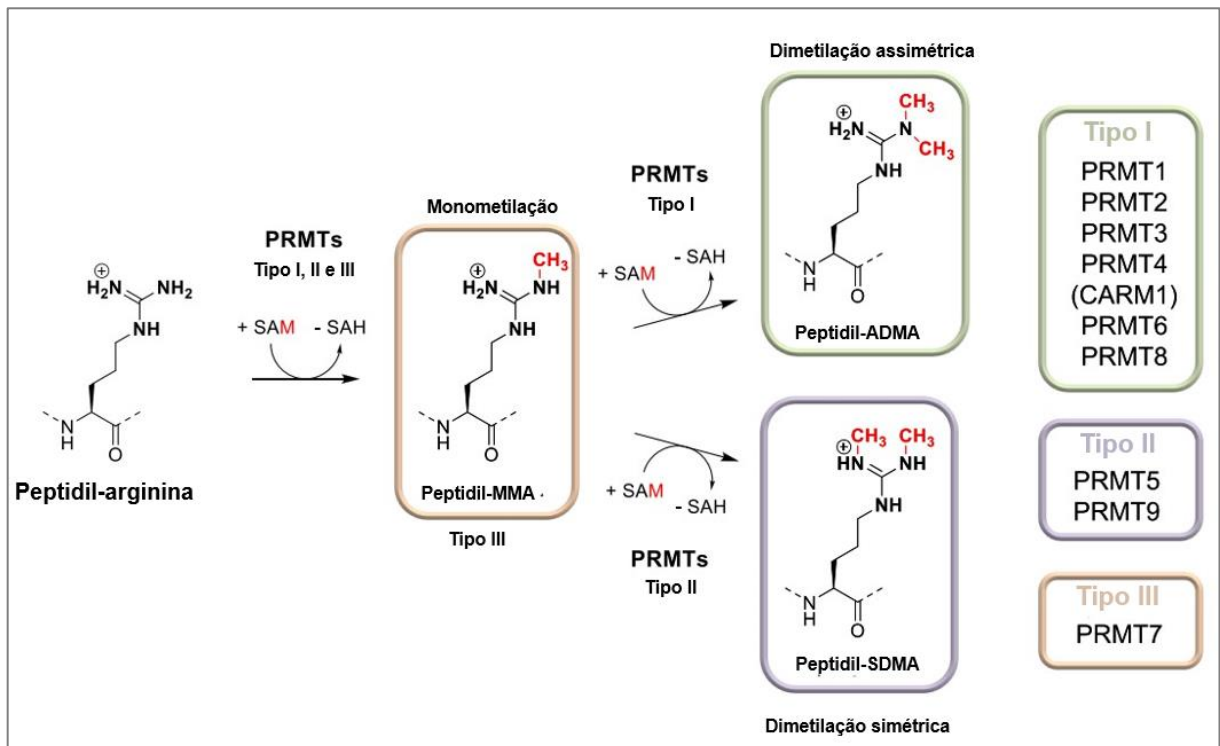
Em *L. braziliensis* foram identificados quatro genes codificadores de HDACs e três genes de SIRT no genoma do parasito (MELESINA et al., 2015; SCHOLTE et al., 2017). Dados do nosso grupo de pesquisa mostram duas isoformas de HDACs de *L. braziliensis* sendo expressas de forma heteróloga em *E. coli* em diferentes condições de produção, a purificação e o potencial de aplicação destas proteínas recombinantes para a aplicação no desenvolvimento

de *kits* de diagnóstico para a leishmaniose tegumentar e visceral canina (AGRIPINO, 2018; FIETTO et al., 2022). Além disso, a expressão destas enzimas foi vista positivamente modulada durante a infecção, em relação às formas promastigotas do parasito, e na presença de compostos inibidores de enzimas modificadoras de histonas (iHMEs), durante a infecção. O que sugere que estas enzimas possam ter uma participação importante durante a infecção parasitária (AGRIPINO, 2018).

Em *P. falciparum* foram identificados genes ortólogos à Sirt2, a PfSir2A e PfSir2B (classe III) e genes de HDACs de classes I e II, PfHDAC1, 2 e 3, sendo a PfHDAC1 homóloga a HDAC1 humana (ANDREWS, K et al., 2012; CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012). *T. gondii* apresenta 7 genes de HDACs das classes I, II e III em seu genoma, a maioria ainda sem caracterização. No entanto, apresenta TgHDAC2 e 3 análogas a hHDAC1, sendo a TgHDAC3 considerada essencial para a expressão gênica e diferenciação parasitária (CROKEN; NARDELLI; KIM, 2012; SAKSOUK et al., 2005). Além disso, a TgHDAC2 foi caracterizada quanto a sua localização celular, estrutura e em experimentos envolvendo nocautes foi associada à infectividade e progressão de ciclo celular do parasito como demonstrado por Siqueira, 2018. Em *Schistosoma mansoni*, HDACs de classe I (SmHDAC 1, 3 e 8) e classe III (smSIRT 2, 5, 6 e 7) já foram clonadas e caracterizadas (HEIMBURG et al., 2016).

A metilação de histonas, assim como a acetilação, é uma das modificações pós-traducionais mais bem caracterizadas e seu efeito como ativador ou repressor da transcrição gênica, irá depender da localização e da natureza desta modificação. Uma vez que esta modificação altera a estrutura do resíduo de arginina metilado, modulando as suas interações com outras proteínas que regulam funções fisiológicas (FUHRMANN; THOMPSON, 2016; WYSOCKA; ALLIS; COONROD, 2006; ZHANG, Jing et al., 2019). As proteínas arginil metiltransferases (PRMTs) são as enzimas que catalisam a transferência de grupo metil do cofator S-adenosil-L-metionina (SAM) para um átomo ω -nitrogênio em resíduos de arginina. Existem três tipos de PRMTs: tipo I - catalisam dimetilação de forma assimétrica (ADMA); tipo II – catalisam a dimetilação simétrica (SDMA); tipo III – catalisam a formação de monometil-arginina (MMA) apenas (CAMPAGNARO et al., 2021). A figura 5, ilustra o mecanismo de ação dos diferentes tipos de PRMTs:

Figura 5 – Metilação de um resíduo de arginina



Reações de metilação de resíduos de arginina catalisadas por diferentes tipos de PRMTs. As classes de PRMTs estão indicadas na figura (lado direito). Fonte: Adaptado de FUHRMANN; THOMPSON, 2016.

As PRMTs interferem em diversos processos, como o reparo de DNA, a sinalização celular e o metabolismo de RNAs, controlando o processo de transcrição gênica, por afetarem a interação de proteínas ligadoras ao RNA (RBP), que comumente possuem motivos ricos em arginina-glicina (RGG), muito presentes em regiões não estruturadas de proteínas como a porção N-terminal de histonas (CAMPAGNARO et al., 2021; HWANG et al., 2021). O equilíbrio entre a metilação e demetilação de proteínas histonas e não-histonas é de fundamental importância para a homeostase celular, o que depende do correto funcionamento das PRMTs e de enzimas demetilases (LSD1, JDJM6 e PAD4), visto que a metilação é um processo desregulado em diferentes tipos de câncer (HWANG et al., 2021; KANISKAN; MARTINI; JIN, 2018; SHI, 2007).

Entre as PRMTs de tripanossomatídeos, as PRMTs de *Leishmania* são menos caracterizadas. Entretanto, foi publicado um estudo da caracterização funcional dos genes de PRMT1, PRMT3, PRMT5, PRMT6 e PRMT7 de *Leishmania braziliensis*. O que se sabe até então é que R-metilação é presente em todos estágios do ciclo de vida do parasito *in vitro*, sendo maior em promastigotas do que em amastigotas. Nenhuma das LbPRMTs se mostrou essencial para a sobrevivência das formas promastigotas do parasito, mas a dupla deleção de PRMT1 e 5/7 afetou o crescimento de amastigotas e comprometeu a infecção de macrófagos *in vitro*. De

forma geral, as LbPRMTs são predominantemente citoplasmáticas, exceto LbPRMT6, mais abundante no núcleo. Além disso, foi revelada a interação de cada uma das LbPRMTs com um grupo variável de proteínas, mas principalmente, as proteínas ligadoras de RNA (RBPs), indicando que as LbPRMTs atuam como reguladores epigenéticos da expressão gênica (LORENZON et al., 2022). Tais resultados, reforçam que as HMEs, como as LbPRMTs são também promissores alvos para terapias antiparasitárias.

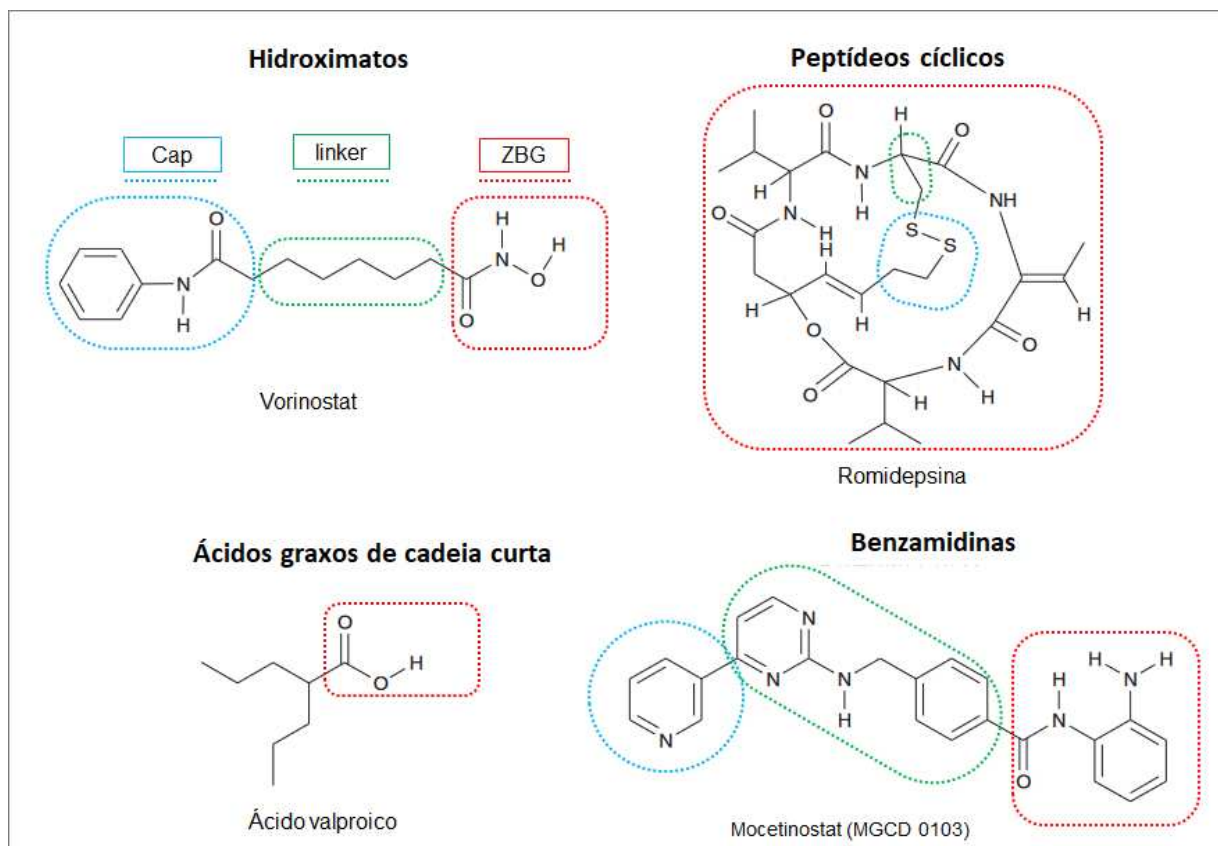
Dessa forma, as enzimas PRMTs, assim como as HDACs, têm sido alvos moleculares para o tratamento de diversas doenças, como o câncer e doenças parasitárias (HWANG et al., 2021; NAWAZ et al., 2020).

2.4 Inibidores de HMEs (iHMEs)

Por atuarem através de processos de metilação/demetilação e acetilação/deacetilação no controle funcional de proteínas histonas e não-histonas, de importância para o correto funcionamento celular, as HMEs vêm sendo objetos de estudos para o desenvolvimento de inibidores ao longo dos últimos anos. A atividade descontrolada de HMEs está relacionada a diversas anomalias celulares identificadas em doenças, como câncer, doenças neurológicas, cardíacas, pulmonares e diabetes tipo 2 (ANDREWS, K et al., 2012; PASYUKOVA; VAISERMAN, 2017; YOON; EOM, 2016).

Os inibidores de HDACs (iHDAC) humanas têm como alvos as enzimas zinco-dependentes de classes I e II. Estes inibidores possuem um núcleo catalítico que utiliza o Zn^{2+} como cofator e podem ser quimicamente agrupados em quatro classes: hidroxamatos – Vorinostat (SAHA), primeiro iHDAC com uso aprovado pelo FDA, em 2006, para o tratamento de linfoma cutâneo de células-T avançado, Tricostatina A (TSA), primeiro iHDAC natural identificado; peptídeos cíclicos – Romidepesina; ácidos alifáticos ou de cadeia curta: Ácido valproico (VPA) e Fenilbutirato, um dos primeiros iHDACs a serem descobertos; e benzamidas – Etinostat e Mocetinostat. Estes inibidores podem atuar tanto como pan-inibidores como iHDAC seletivos, inibindo a ação de uma classe ou de uma HDAC específica (MA; EZZELDIN; DIASIO, 2009). A figura 6 mostra a estrutura química dos iHDACs:

Figura 6 – Estrutura química dos iHDACs



Classes dos principais iHDACs. Hidroxiimatos – Vorinostat, inibidor de HDACs classe I e II; ácido valproico, inibidor seletivo de classes I e IIa; Romidepsina, inibidor de HDAC 1 e 2; e Mocetinostat, inibidor de HDAC 1, 2, 3 e 8. Em azul está destacado o grupo “Cap” de ligação à enzima, em verde o “linker” e em vermelho “ZBG”, a região de ligação ao zinco. Fonte: Adaptado de MA; EZZELDIN; DIASIO, 2009.

Em tripanossomatídeos que apresentam ciclos de vida complexos, como o gênero *Leishmania*, mecanismos epigenéticos são de grande importância para o crescimento e desenvolvimento. A sobrevivência em ambientes hostis, o desenvolvimento celular, a adaptação a diferentes hospedeiros e a manipulação da maquinaria de transcrição hospedeira pelo parasito envolvem processos epigenéticos, que têm levado ao desenvolvimento de compostos para terapias baseadas em inibidores de HMEs (iHMEs) (OUAISSI, OUAISSI E G., 2006; KAMHAWI E SERAFIM, 2020).

Por compartilharem de características com células tumorais, como a rápida proliferação celular e pela importância que as HMEs parasitárias possuem na regulação da expressão gênica, a abordagem “drug repurposing” de iHMEs para inibição da atividade de HDACs, PRMTs e LSD1, têm sido aplicada em estudos que visam o desenvolvimento de novas drogas contra doenças parasitárias negligenciadas (ANDREWS, K et al., 2012; WANG et al., 2015). Resultados promissores foram obtidos em estudos que utilizaram esta abordagem terapêutica. Entre os efeitos observados estão a inibição seletiva do crescimento de parasitos, acompanhada

de hiper acetilação, suportando a ideia de que inibidores de HDACs utilizados na terapia do câncer inibem a atividade deacetilase em diversos parasitos, como *Plasmodium knowlesi*, *P. berghei*, *Schistosoma mansoni* (CHUA et al., 2017) e *P. falciparum* (ENGEL et al., 2015).

Com o objetivo de consolidar esta abordagem terapêutica, a estrutura da HDAC8 de *S. mansoni*, deacetilase mais expressa durante todo o ciclo celular do parasito, foi utilizada para o desenho de diversos compostos com ação inibitória para a atividade desta enzima. A inibição seletiva para a HDAC8 de *S. mansoni* (SmHDAC8) em relação às células humanas e alteração da viabilidade celular, seguida de morte dos parasitos de forma dose dependente foram observados no estudo de Heimbarg et al., 2016. Outro trabalho, deste mesmo grupo, demonstrou atividade de uma nova classe iSmHDAC8 que foi identificada através de triagem virtual e *docking*. Quando testados *in vitro* estes novos compostos apresentaram valores de atividade em concentrações de micromolar efetiva para a inibição da atividade de SmHDAC8, porém uma atividade contra as HDACs humanas também foi observada (SIMOBEN et al., 2018).

Diversos compostos inibidores de PRMTs, análogos da Furamidina, uma diamidina difenilfurano, têm sido descobertos e desenvolvidos nos últimos anos. Entre estes, os mais bem estudados são os inibidores de PRMT1, enzima cuja atividade e expressão desregulada está relacionada a diversas doenças (ZHANG, Jing et al., 2017). A comprovação da eficácia de inibidores análogos à Furamidina com atividade antimicrobiana em parasitos, também tem sido reportada contra *T. cruzi*, *T. brucei*, *P. falciparum* e *L. donovani* (SILVA et al., 2007; THUITA et al., 2008; PATRICK et al., 2013; SAUER et al., 2017; MEIER, ERLER E BEITZ, 2018). Compostos contendo diamidinas possuem mecanismo de ação relacionado à capacidade que têm de se ligar ao DNA em regiões ricas em adenina e timina, podendo assim inibir a ligação de enzimas dependentes de ligação ao DNA para desempenho de suas funções, impedindo processos de transcrição gênica (ARAFKA R.K. et al, 2005).

Nosso grupo de pesquisa, representado pela Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto, integrou o Consórcio *Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics* (A-ParaDDisE) com os objetivos de buscar por compostos com ação leishmanicida sobre *L. braziliensis* e estudar seus possíveis alvos, buscando identificar, clonar, e validar HDACs de *L. braziliensis* como possíveis alvos destes compostos. Durante a vigência do Consórcio A-ParaDDisE (2014-2017), diversos compostos inibidores foram testados quanto à toxicidade em macrófagos, em formas promastigotas e na infecção por amastigotas em macrófagos (SOUZA, 2016; CALLA, 2018). Estes testes identificaram possíveis iHMEs, dentre eles dois compostos com maior ação leishmanicida se destacaram: BSF2 e TH85. O BSF2 apresentou um IC₅₀ da ordem de

nanomolar (640 nM) e um efeito significativo sobre amastigotas, sendo capaz de a 10 μ M diminuir aproximadamente 95% da infecção *in vitro*. Já o TH85 apresentou um IC₅₀ de 7,20 μ M na infecção *in vitro* (SOUZA, 2016).

Outros resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa, mostram a atividade leishmanicida de inibidores de PRMTs e LSD1 com baixa toxicidade em macrófagos, sendo o BSF2 o melhor inibidor de ação leishmanicida, entre os compostos analisados. Entre os iHDAC, foram identificados compostos leishmanicidas com IC₅₀ da ordem de μ M e índices de seletividade entre 6 e 21,7. Os efeitos destes iHDACs foram avaliados por microscopia eletrônica e citometria de fluxo, indicando que estes compostos provocam alterações no ciclo de celular e indução de apoptose em *L. braziliensis*, sem alterar a produção de óxido nítrico em macrófagos infectados *in vitro* (SOUZA et al., 2020). Em camundongos, os iHDACs levaram à uma diminuição de lesão na pata, com um efeito igual e superior ao Glucantime® e com uma menor toxicidade. Além disso, foi observado, junto à diminuição da lesão, um aumento na produção TNF e INF γ , citocinas importantes para a resolução de infecções por *L. braziliensis* (SOUZA, 2022).

Este trabalho vem como uma continuidade dos estudos de inibidores de HMEs, HDACs e PMRTs de *L. braziliensis* como possíveis alvos destes iHMEs com ação leishmanicida. A fim de compreender melhor o mecanismo de ação do BSF2 e do TH85, foi avaliado o efeito destes compostos no transcriptoma dual da infecção *in vitro*.

Para validar as HDACs de *L. braziliensis* como bons alvos para quimioterapia de leishmaniose tegumentar foi utilizada a técnica de CRISPR/Cas9 para produzir mutantes duplos e únicos para as LbHDACs 1, 2, 3 e 4.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

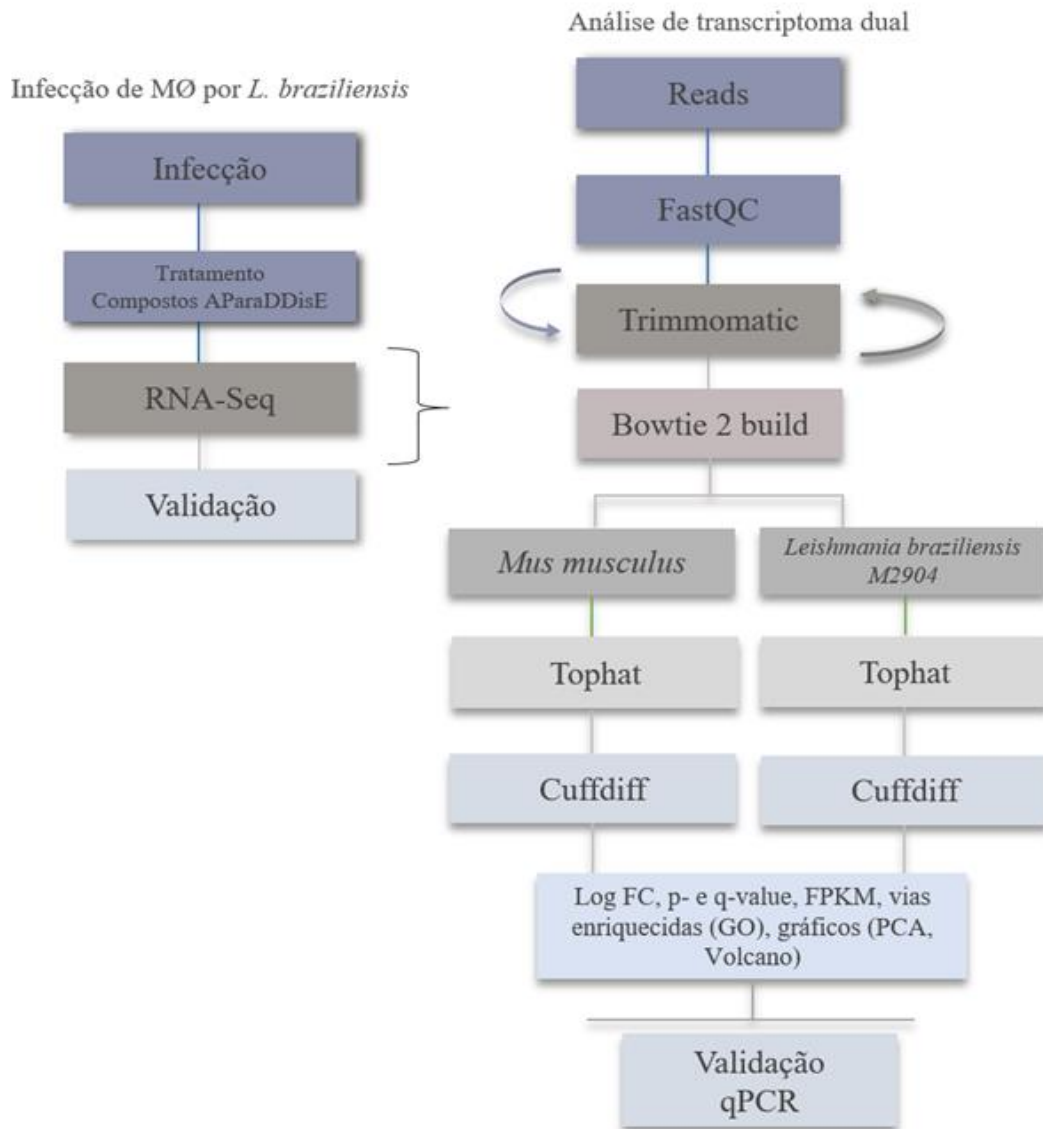
Avançar nos estudos do efeito dos iHMEs pré-selecionados sobre a transcrição gênica dual da infecção de *L. braziliensis* em macrófagos e; avaliar a importância das histonas deacetilases de *L. braziliensis* (LbHDACs) como alvos para o desenvolvimento de medicamentos.

3.2 Objetivos específicos

- Montar e analisar o transcriptoma dual na infecção *in vitro* tratada independentemente com os compostos iHMEs, BSF2 e TH85;
- Validar por qRT-PCR genes de interesse diferencialmente expressos, identificados no transcriptoma, dentro do contexto da infecção de *L. braziliensis* em macrófagos;
- Deletar as HDAC 1-4 de *L. braziliensis* pelo sistema CRISPR/Cas9.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental



4.2 Cultivo celular e compostos

Macrófagos RAW 264.7 (MØ) foram cultivados em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia), L-Glutamina 2 mM (Serva), penicilina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) e HEPES 1 M (Fisher Scientific), filtrado em membrana de 0,22 µm. As células foram mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific).

A manutenção e o congelamento destas células foram feitos quando se atingia 90% de confluência dos frascos de cultivo. Para o congelamento, os macrófagos foram desprendidos com o auxílio de um espalhador de células, centrifugados a 1200 x g, 25 °C, 10 min, e contados

em Câmara de Neubauer para o ajuste da cultura na proporção de 10^5 células/mL. Em seguida, as células foram suspensas em meio de congelamento, meio RPMI completo contendo 5% v/v de DMSO e distribuídas em criotubos, contendo 1 mL cada. Os criotubos foram então armazenados por 1 h a 4 °C em geladeira, 24 h em freezer -20 °C, 24 h em ultra freezer -80 °C e por fim, armazenados em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento destas células, um criotubo foi retirado do nitrogênio líquido e deixado em temperatura ambiente. Após descongelar, as células foram transferidas para os frascos de cultivo e 10 mL de meio de cultivo completo foram gentilmente adicionados à cultura. Por fim, as células foram mantidas em estufa até recuperação da cultura.

Células de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904-EGFP) (BASTOS et al., 2017), foram cultivadas em meio Grace (*Grace's Insect medium* Gibco – Life Technologies) pH 6,5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia), L-Glutamina 2 mM (Serva) e penicilina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich).

Células de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), foram cultivadas em meio 199 (Sigma-Aldrich, M5017) completo, pH 7,2, contendo 20% de soro fetal bovino, penicilina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich), L-glutamina 2 mM (Serva), adenina 500 µM, hemina 0,005%, biotina 1 µg/mL e HEPES 20mM (Sigma-Aldrich). Ambos os meios de cultivo de parasitos foram filtrados em membrana 0,22 µm e as culturas mantidas a 25 °C em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética).

O congelamento das células de *Leishmania spp.* foi feito com células em passagens baixas, em fase logarítmica de crescimento. As células foram inicialmente contadas em Câmara de Neubauer e a cultura foi ajustada de forma a atingir a proporção de 10^6 células/mL. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 x g, a 4 °C, 10 min. O pellet de células obtido foi suspenso em meio de congelamento (meio de cultivo completo contendo DMSO 6,5% v/v) e alíquotas de 1 mL de células foram distribuídas em criotubos. Para o descongelamento, o mesmo procedimento já descrito acima foi realizado e as culturas de *Leishmania spp.* foram mantidas em estufa a 25 °C até recuperarem.

Os compostos iHMEs, BSF2 e TH85, foram gentilmente cedidos pelo pesquisador integrante do consórcio *A-ParaDDisE*, Wolfgang Sippl, da Martin Luther Universität Halle-Wittenberg (MLU), Alemanha; as soluções estoque dos compostos (10 mM) foram preparadas em 100% de DMSO e armazenadas a -20 °C.

4.3 Ensaio de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*

Para analisar o efeito dos compostos inibidores de HMEs sobre a expressão gênica das células do parasito e do hospedeiro, foram realizadas infecções *in vitro* de macrófagos RAW264.7 por *L. braziliensis* na presença e na ausência dos compostos cedidos pelos pesquisadores parceiros do consórcio *A-paraDDisE*.

Inicialmente, 1×10^7 macrófagos foram semeados em garrafas de cultivo de 50 mL em meio RPMI e mantidos por 24 h em estufa de CO₂ a 37 °C. No dia seguinte foi realizada a infecção com promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária na proporção de 20 parasitos/macrófago. Em seguida, após 24 h de infecção foi feita a retirada dos parasitos que não infectaram os macrófagos, através de lavagem e troca de meio de cultivo. Passadas mais 24 h uma nova troca de meio de cultivo foi realizada para que os tratamentos com os compostos iHMEs fossem realizados. As concentrações dos compostos utilizados foram calculadas, com base no trabalho de Souza e colaboradores que determinou o IC₅₀ destes iHMEs (SOUZA, 2016; SOUZA et al., 2020). Os tratamentos foram feitos utilizando-se $\frac{1}{4}$ do IC₅₀, o que corresponde a 0,16 μ M do BSF2 e 1,8 μ M do TH85, a fim de não matar todas as *Leishmanias* e permitir a análise do transcriptoma do parasito. A infecção seguiu incubada a 37°C em estufa de CO₂. Após 48 h de tratamento com os compostos, as células foram removidas da garrafa, coletadas e armazenadas em Trizol (Qiagen) de acordo com manual do fabricante para posterior extração de RNA. Ao final do protocolo de infecção foi realizada a contagem do rendimento da infecção (contagem de diferentes campos de visão, quantos macrófagos estão presentes nestes campos e quanto destes foram infectados) e da razão *Leishmania*/MØ (quantas parasitos estavam no interior dos macrófagos). As contagens foram feitas em lâminas para análise em microscópio de fluorescência (Evos – Life Technologies). As condições deste ensaio foram padronizadas pelo pesquisador Dr. Matheus Silva e Bastos em seu pós-doutorado na Universidade Federal de Viçosa (2016).

4.4 Análise do transcriptoma dual da infecção de *L. braziliensis* em macrófagos tratada com iHMEs

A extração de RNA para a construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento do RNA (RNA-Seq) foi realizada em colaboração com o grupo do Dr. Sérgio Verjovski Almeida do Instituto Butantan (USP-SP).

Para as análises dos dados de RNA-Seq dual feitas neste trabalho foi utilizado o pacote de ferramentas Tuxedo (TRAPNELL et al., 2012). A análise de qualidade dos *reads* gerados

foi avaliada pelo FastQC (ANDREWS, 2010), seguida da remoção dos adaptadores de sequência utilizados no sequenciamento Illumina® e dos *reads* de baixa qualidade (valor de phred abaixo de 20), utilizando o programa Trimmomatic (v 0.36) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Após a remoção, uma nova análise de qualidade foi realizada, gerando *reads* de alta qualidade para cada amostra analisada. A indexação dos genomas de referência de *Mus musculus* (NCBI ID: GRCm38.p6) e *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (NCBI ID: 718 assembly ASM284v2) foi realizada utilizando o pacote Boltwie 2 build (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), e o alinhamento dos *reads* aos seus respectivos genomas de referência foi feito com a ferramenta Tophat (v 2.1.1) (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009).

Após o alinhamento dos *reads* com os genomas, foram analisados os genes diferencialmente expressos em macrófagos e em *L. braziliensis* com o pacote Cuffdiff (TRAPNELL et al., 2012). Esta ferramenta calcula os níveis de expressão gênica em resposta aos tratamentos experimentais; neste caso, as infecções tratada e não tratada com os inibidores de HMEs. Além disso, o Cuffdiff determina se as diferenças de expressão gênica dos grupos experimentais são significativamente diferentes ou não, utilizando o Teste-T seguindo de correção do valor p por FDR (taxa de falsas descobertas). Os níveis de expressões gênicas diferenciais foram normalizados como fragmentos por *kilobase* por milhão de fragmentos de transcrição mapeados (FPKM) – valores de FPKM, como uma estimativa normalizada da expressão gênica (<https://www.ebi.ac.uk/training/online/glossary/fpkm>). Os valores de FPKM são calculados para cada gene, a partir do número de *reads* mapeados, considerando o comprimento do gene (quanto maior o número de *reads* produzidos, maior o gene) e a quantidade de *reads* geradas (quanto mais profundo o sequenciamento, maior o número de *reads* mapeados em uma amostra). Após a quantificação e normalização dos valores de expressão, foi realizada uma nova análise da expressão diferencial comparando as amostras de infecção tratadas com o BSF2 e com o TH85 em relação ao controle não tratado.

Para caracterizar as alterações obtidas no transcriptoma dual em resposta aos tratamentos das infecções, comparamos os perfis de expressão de infecção não tratada com as infecções tratadas com os iHMEs. Os *scripts* em Perl foram escritos de forma específica de acordo com os arquivos de saída e as análises necessárias para etapa de avaliação do RNA-Seq.

Após a montagem do transcriptoma, a análise de qualidade dos dados de RNA-Seq dual foi feita com o pacote R (v 3.4.4) (TEAM, 2015) e visualizada no GraphPad Prism (v 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos; www.graphpad.com).

Por fim, para avaliar a qualidade das réplicas e o comportamento dos grupos experimentais, foram plotados gráficos de análise de componentes principais (PCA) e feita a análise de ontologia gênica (GO) das vias enriquecidas com a ferramenta BiNGO.

4.4 Validação por PCR em tempo real de transcritos revelados pelo transcriptoma dual da infecção de macrófagos por *L. braziliensis*

Para a validação dos genes de interesse que apresentaram expressão diferencial no transcriptoma dual, novos grupos experimentais foram introduzidos e um novo ensaio de infecção foi feito de acordo com os grupos descritos na Tabela 1. Além dos grupos iniciais, que foram enviados para a análise de RNA-Seq, foram inseridos os grupos de macrófagos estimulados com LPS 100 ng/mL por 12 h (SCOTT et al., 2000; XAUS et al., 2000). Todos os ensaios foram feitos em triplicata biológica, os macrófagos não infectados foram submetidos ao tratamento com os compostos iHMEs, nas mesmas condições dos macrófagos infectados: 1×10^7 macrófagos por garrafa, tratados com $\frac{1}{4}$ do IC₅₀ dos compostos nos grupos de tratamento e o mesmo volume de DMSO (veículo dos compostos), nos grupos controle. Além disso, foram feitos grupos de macrófagos não tratados e estimulados não tratados, como esquematizado na tabela 1:

Tabela 1 – Grupos experimentais e descrição

Grupos	Descrição
G1	macrófago + DMSO
G2	macrófago + TH85
G3	macrófago + BSF2
G4	macrófago + <i>L. braziliensis</i> + BSF2
G5	macrófago + <i>L. braziliensis</i> + TH85
G6	macrófago + <i>L. braziliensis</i> + DMSO
G7	macrófago + BSF2 + LPS
G8	macrófago + TH85 + LPS
G9	macrófago + DMSO + LPS

Após o fim dos tratamentos de cada um dos grupos, foram feitas extrações de RNA total pelo método do Trizol (Quiagen), tratamento dos RNAs com DNase I (Thermo Scientific), seguida da produção de cDNA (Platus Transcriber RNase H – cDNA First Strand kit) e análise por qRT-PCR com o kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Scientific).

Todas as amostras de cDNA foram quantificadas em NanoDrop (Thermo Scientific). Para cada alvo a ser analisado foi construída uma curva padrão (em duplicata) contendo um *pool* das amostras G1, G2, G3, G6, G7, G8 e G9. Os pontos de diferentes concentrações das curvas-padrão foram obtidos através de diluição seriada do *pool* de amostras, variando as concentrações de 80 ng/μL a 1,25 ng/μL. Em cada reação de qRT-PCR para a construção das curvas-padrão foram utilizados, 1 μL de cada diluição do *pool* de cDNA, 0,5 μL de cada *primer*, 3 μL de H₂O Mili-Q e 5 μL de SYBR™ Green PCR Master Mix 2X. Cada uma das curvas gerou uma equação de reta de regressão linear, com um coeficiente de relação (R^2), que relaciona o Log da concentração de cDNA utilizada e o valor de CT (limiar de ciclo) obtido em cada concentração, que foi utilizada para o cálculo das concentrações dos genes nos grupos analisados.

As reações para análise dos genes selecionados foram padronizadas em um volume final de 10 μL, contendo 20 ng de cDNA por reação, 0,5 μL de cada *primer*, 1 μL de H₂O Mili-Q e 5 μL de SYBR™ Green PCR Master Mix 2X, feitas em duplicatas na placa (Thermo Scientific). Todas as amostras de cDNA utilizadas nas reações de validação por qRT-PCR foram previamente diluídas e normalizadas para uma concentração final de 6,6 ng/μL.

O cálculo da expressão diferencial foi feito através das médias das duplicatas técnicas de cada triplicata biológica dos grupos experimentais, diminuídas das médias dos valores dos endógenos utilizados. A análise estatística foi feita através do Teste T utilizando o GraphPad Prism (v 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos; www.graphpad.com).

Os *primers* utilizados foram em sua maioria obtidos da literatura, quando não encontrados, foram desenhados com base nos transcritos mapeados (<https://www.ensembl.org/index.html>), nas sequências referências destes transcritos disponíveis no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) e com o auxílio da plataforma online PrimerQuestTool (IDT© Copyright 2012 – <https://www.idtdna.com>). As sequências dos *primers* utilizados estão na Tabela 2:

Tabela 2 – Sequências de *primers*

Genes	Sequência direta	Sequência reversa	Referência
TNFR1	ATCTGCTGCACCAAG TGCC	TGCATGGCAGTTACA CACG	(ZHOU, ZHANG E ATHERTON, 2007)
Cxcl2	CGCTGTCAATGCCTG AAGAC	ACACTCAAGCTCTGG ATGTTCTTG	(SILVA, DA et al., 2012)
Map2k7	TCAGGTGTGGAAGA TGCGG TTC	AAGGGCAGTCATGGC TCTTGAG	(BRYAN R. LANNING et al., 2017)
Mapk9	GTCAGTGGGTTGCAT CATGGGA	ACTCTGCGGATGGTG TTCCTAG	Este trabalho
Atf4	GCCGGTTTAAGTTGT GTGCT	CTGGATTTCGAGGAAT GTGCT	(FUSAKIO et al., 2016)
Lif	CAAGAATCAACTGG CACAGC	AGTGGGGTTCAGGAC CTTCT	(HUNT et al., 2011)
Tnfaip3	CATCCACAAAGCACT TATTGACA	GAGTGTCGTAGCAAA GTCCTGTT	(SAKAI, UCHIDA E NAKAYAMA, 2012)
β -actina	GTTTTGTTTTGGCGC TTTTG	AACTTTGGGGGATGT TTGCT	(PEREIRA, BRITTO E ALVES, 2012)
Sin3a	AGACCTGTTTGGCTT TGG	TTTGTTGAGGCCGAG AAC	Este trabalho
Rest	GGAAAGACAGAGCA GAGAAG	GTCTCTAACAGGCAC CAAG	Este trabalho
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGA TCTGA		(REN et al., 2010)

4.5 Deleção das HDACs de *L. braziliensis* por CRISPR/Cas9

Para realizar o nocaute por CRISPR/Cas9 dos genes das quatro HDACs encontradas no genoma de *L. braziliensis*, primeiro foi estabelecida uma linhagem de *L. braziliensis* M2904 para expressar o gene da nuclease Cas9 constitutivamente. Para isso, foi feita a transfecção do vetor pTB007 (BENEKE et al., 2017), que contém o gene da Cas9 de *Streptococcus pyogenes* e o cassete da T7 RNA polimerase inseridos entre as sequências 5'- e 3'-UTR da β -tubulina, permitindo uma expressão constitutiva da Cas9. Além disso, este vetor possui o gene de resistência a higromicina (Hyg) e a tag FLAG, que permitiu a confirmação da expressão de Cas9 por *Western blotting*. Antes da transfecção o vetor pTB007 foi linearizado com a enzima PacI.

Células de *L. braziliensis* em fase log de crescimento (10^7 células) foram centrifugadas a 1200 x g, por 10 minutos a 4°C e lavadas com 10 mL de tampão de transfecção HEPES-NaCl (HEPES 20 mM, NaCl 137 mM, KCl.7H₂O 1,85 mM, Na₂HPO₄ 1,32 mM, glicose 6 mM), pH 7,2. Após uma nova centrifugação, o pellet de células foi ressuscitado em 100 μ l de tampão HEPES-NaCl e 3–5 μ g de DNA (vetor pTB007 linearizado) foi adicionado junto a cultura. O mix de células e DNA foi incubado em gelo de 5 a 15 minutos e então transferido para a cubeta (0,2 cm *Gene pulser curvette*) e realizada o pulso em sistema de eletroporação Bio-Rad (1 pulso, 450 V, 500 μ F).

Após a eletroporação as células foram ressuscitadas em 5 mL de meio 199 e incubadas a 25°C por 24 h. No dia seguinte, foram adicionados 1,6 mg/mL de higromicina para a pré-seleção. Após outras 24 h, 1 mL de meio da cultura pré-selecionada foi inoculado em 10 mL de meio contendo concentrações crescentes de higromicina (0,6–1,4 mg/mL). Após aproximadamente 3 semanas, as culturas que recuperaram foram analisadas por *Western blotting* para confirmação da expressão da Cas9. Foram utilizados o anticorpo primário anti-FLAG 1:500 (MA191787 – Invitrogen) e secundário anti-*mouse* conjugado com peroxidase 1:120000 (A9044 – Sigma). Com a confirmação da obtenção de uma população positiva de *L. braziliensis* Cas9, foi realizada a diluição limitante para seleção clonal e os clones obtidos foram coletados, confirmados por *Western blotting* e devidamente armazenados, como descrito no item 4.1.

Para confirmar que os genes de HDAC são cópia única, foi feito mapeamento destes genes no genoma de *L. braziliensis* no banco de dados de TritypDB, a partir das regiões codificantes (CDS) e sequências referências (Ref Seq) de cada HDAC. A localização genômica e o número de acesso de cada HDAC estão na tabela 3:

Tabela 3 – Localização genômica e números de acessos das LbHDACs

Proteína	Gene	Localização	Número de acesso
HDAC 1	LbrM.21.0740:mRNA	LbrM.21:202,189..203,487(-)	XM_001564732.1
HDAC 2	LbrM.24.1510:mRNA	LbrM.24:535,809...537,110(-)	XM_001565365.1
HDAC 3	LbrM.33.0940:mRNA	LbrM.33:308,253..310,133(+)	XM_001567814.1
HDAC 4	LbrM.08.0840:mRNA	LbrM.08:331,629..333,476(-)	XM_003722905.1

O desenho dos RNA-guias (gRNA) dos genes das HDACs 1-4 de *L. braziliensis* foi feito seguindo as orientações do *Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool* (<http://grna.ctegd.uga.edu/>). Com as sequências genômicas das HDACs obtidas no banco de dados TritypDB foram selecionados os gRNAs, com os seguintes critérios: comprimento próximo de 20 nucleotídeos, sequência PAM NGG na extremidade 3' e ausência de timina nos últimos 8 nucleotídeos para evitar a formação de estruturas secundárias e efeitos *off target*. Na tabela 4 estão os gRNAs utilizados para a deleção de cada gene:

Tabela 4 – Sequências de gRNA

Alvo	gRNA
HDAC 1	CGATGTCAATGTACAGCACCC CGG
HDAC 2	GTCCCACTACCCACGCGGAC GGG
HDAC 3	GGCTGCTGCGCATCACCGGC GGG
HDAC 4	TGATGTTTACTGCAGCGACG AGG

gRNAs utilizados na deleção por CRISPR/Cas9. Em negrito a sequência PAM NGG

Para a deleção dos genes-alvo foi utilizado o sistema Alt-R™ CRISPR-Cas9 (IDT Technologies) que inclui as moléculas e tampões necessários para a edição, segundo as recomendações do fabricante. O DNA doador foi construído através de um conjunto de *primers* desenhados de forma específica para cada gene da seguinte forma: *primer* de sequência direta contendo nucleotídeos da região 5'-UTR do gene alvo e nucleotídeos do vetor do gene de resistência; *primer* reverso contendo nucleotídeos do gene de resistência e da região 3'-UTR do gene alvo. Estes primers foram então utilizados para amplificar os genes de resistência à neomicina e puromicina, que são inseridos nos vetores sp72 α neo e sp72 α puro, respectivamente (BENEKE et al., 2017). Estas reações de amplificações foram feitas utilizando a *HotStar HiFidelity Polymerase Kit* (Qiagen). Em seguida, os cassetes de transfecção foram verificados em gel de agarose 1%, purificados e eluídos com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), segundo o fabricante. As estratégias utilizadas para a transfecção dos cassetes foram: dupla deleção (-/-) e deleção de 1 alelo somente (+/-) para cada gene de HDAC selecionado. Na tabela 5 estão as sequências de *primers* utilizados para a construção das sequências de DNA doador:

Tabela 5 – Sequências de primers para construção de DNA doador

Gene	Sequência direta	Sequência reversa (Neo)	Sequência reversa (Puro)
HDAC 1	CTTAACGGGTACG AGGGGTGTGCCCCG GGTACCGAGCTCTCT CTT	CTGTGCCGCCCATC CTCCCTGGCTCCTC AGAAGA ACTCGTCA AGAAGG	CTGTGCCGCCCAT CCTCCCTGGCTCC TCAGGCACCGGGCT TGCGGGT
HDAC 2	CGTCACTGCCATTG CCTATGCCCCGGGT ACCGAGCTCTCTCTT	AGAGGCCTCAGTG CTCGCTCAGAAGAA CTCGTCAAGAAGG	AGAGGCCTCAGTG CTCGCTCAGGCACC GGGCTTGCGGGT
HDAC 3	GTCAGGCGACAAC GACG CCCGGGTACC GAGCTCTCTCTT	GGAGCGTTTGTCG GTGGTCTCAGAAGA ACTCGTCAAGAAGG	GGAGCGTTTGTCG GTGGTCTCAGGCA CCGGGCTTGCGGGT
HDAC 4	CGTCGGGTGACGA CATGG CCCGGGTAC CGAGCTCTCTCTT	CTTTCTGCCACACA ATGCACGTCAGAAG AACTCGTCAAGAAG G	CTTTCTGCCACAC AATGCACGTCAGG CACCGGGCTTGCGG GT

Primers diretos e reversos para construção do DNA doador. Legenda: Em verde: região 5'-UTR do gene alvo; em azul: região 3'-UTR do gene alvo.

Todas as transfecções foram feitas utilizando 10^7 células de *L. braziliensis* Cas9 em fase log de crescimento, resuspendidas em tampão de transfecção HEPES-NaCl pH 7,2, utilizando de 3-5 μ g de DNA doador de cada gene de resistência e 10 μ L de gRNA e TracrRNA (1:1) transfectados em tampão de transfecção Alt-R (Alt-R System, IDT Technologies), seguindo a recomendação do fabricante. Para esta etapa foi utilizado o programa X-001 do eletroporador Amaxa Nucleofector IIb (Lonza), gentilmente cedido pela professora Santuza Teixeira (UFMG). Nesta etapa também foi testado o sistema de eletroporação Bio-Rad (1 pulso, 450 V, 500 μ F), em nosso laboratório, para a deleção dupla do gene HDAC4. Logo em seguida, as células foram transferidas para 10 mL de meio 199 completo para a recuperação *overnight*. Após este tempo, foram adicionadas as devidas drogas de seleção para pré-seleção por 24 h – higromicina 20 μ g/mL, puromicina 10 μ g/mL (ADAUI et al., 2020) e paromomicina 157,7 μ g/mL – IC₅₀ determinado pelo método da resazurina (SOUZA, 2016). Em seguida, 1 mL de cada cultura transfectada e pré-selecionada foi acrescentada em 5 mL meio de cultivo contendo concentrações crescentes das drogas de seleção paromomicina e puromicina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão dos dados obtidos neste trabalho, os resultados foram divididos nos seguintes capítulos e tópicos:

- **Capítulo 1: Análise do transcriptoma dual da infecção por *L. braziliensis* tratada com iHMEs**
 - Perfil de expressão gênica global do transcriptoma dual no tratamento com o BSF2 e validação por qRT-PCR;
 - Perfil de expressão gênica global do transcriptoma dual no tratamento com o TH85.
- **Capítulo 2: Estudos das HDACs de *L. braziliensis***
 - Deleção das HDACs de *L. braziliensis* por CRISPR/Cas9.

5.1 Capítulo 1: Análise do transcriptoma dual da infecção por *L. braziliensis* tratada com iHMEs

5.1.1 Perfil de expressão gênica global do transcriptoma dual no tratamento com o BSF2 e validação por qRT-PCR

Após a extração de RNA, mapeamento dos transcritos e análise de qualidade dos *reads* gerados, foi feita a análise de componente principal (PCA). A análise de PCA permite reduzir a dimensão de um grande volume de dados, mantendo a sua variabilidade. Assim, é possível visualizar como se comportam as amostras de uma mesma condição e definir se elas podem ou não serem agrupadas (RINGNÉR, 2008).

Dessa forma, com o objetivo de analisar o perfil de expressão gênica global em cada situação experimental, foi feita a análise de PCA para avaliar a qualidade e o comportamento das réplicas dos grupos experimentais. Foram plotados os gráficos de PCA para a infecção sem tratamento (controle) e para a infecção tratada com $\frac{1}{4}$ IC₅₀ do BSF2, para comparar a qualidade das réplicas e os perfis globais de expressão da célula hospedeira e do parasito.

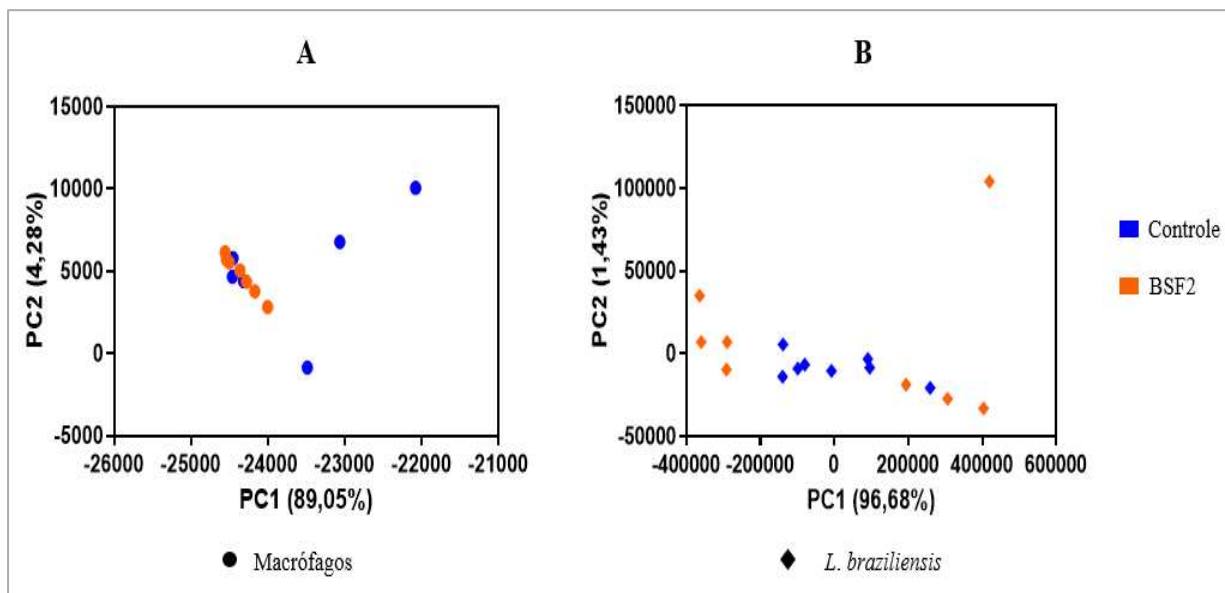
A partir dos gráficos de PCA é possível notar que houve uma melhor separação entre as amostras de macrófagos (figura 7A), em comparação com as amostras de *L. braziliensis* (figura 7B), sendo possível observar a presença de dois conjuntos de dados. Já as amostras de parasito ficaram mais agrupadas entre si somente na condição controle, apresentando uma dispersão maior na presença do BSF2.

No gráfico A, que analisa a expressão global de macrófagos, nota-se que algumas amostras tratadas com o BSF2 foram agrupadas junto com as amostras controle. Tal fato pode ser explicado pelo tipo de célula utilizada neste experimento, que pode sofrer alterações em seu padrão de expressão gênica como consequência das interferências de manipulação, inerentes ao desenvolvimento do próprio experimento, como as seguidas trocas do meio de cultivo e lavagens da cultura para a retirada de parasitos não aderidos nos grupos infectados.

No gráfico de *L. braziliensis* (7B) há uma maior dispersão entre as amostras do controle e dos tratamentos. Quando comparadas ao tratamento com o BSF2, as amostras do controle podem ser parcialmente agrupadas, mas as amostras de tratamento não se agrupam em uma única área do gráfico. Com isso, não pôde ser observado um efeito direto dos tratamentos com os compostos sobre as amostras de *L. braziliensis*, a ponto de diferenciá-las entre as amostras que receberam e não receberam o tratamento na infecção. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que os tripanossomatídeos, como *Leishmania*, não possuem um ajuste fino da regulação da expressão gênica global, o que faz com que o genoma destes parasitos seja constitutivamente

expresso, dificultando a visualização de um efeito direto sobre o transcriptoma, como mostra a figura 7:

Figura 7 – Perfil de expressão global de macrófagos e *L. braziliensis* durante a infecção tratada e não tratada com o composto BSF2



As cores indicam o tipo de amostra: infecção tratada com BSF2 (laranja) e controle – infecção não tratada (azul). Os símbolos representam o tipo de célula: (●) macrófagos RAW 264.7 infectados; (◆) formas intracelulares de *L. braziliensis*.

Após a remoção das sequências adaptadoras e dos *reads* de baixa qualidade com o programa Trimmomatic, um novo número de *reads* de alta qualidade foi gerado. Estes *reads* foram então alinhados a seus respectivos genomas, através da ferramenta Tophat, e foi possível analisar o número de genes identificados entre os transcritos de cada célula. Como pode ser observado, a maior parte dos transcritos identificados pertencem à célula hospedeira e não ao parasito (tabela 6). O que era esperado, visto que os genomas utilizados para indexação e mapeamento apresentam diferentes números de genes. No genoma da célula hospedeira de mamífero utilizado, *Mus musculus* NCBI ID: GRCm38.p6 (Ref Seq GCF_000001635.26), há aproximadamente 50 mil genes e no genoma de *L. braziliensis* M2904 NCBI ID: 718 assembly ASM284v2 (Ref Seq GCF_000002845.2) pouco mais de 8 mil genes. Assim, de acordo o número de *reads* obtidos e genes mapeados (tabela 6), é possível dizer que os genomas estão bem representados no conjunto de dados analisados.

Tabela 6 – Número de *reads* e genes mapeados entre os transcritos de macrófago e *L. braziliensis*

<i>Reads</i> obtidos	
Fastqc	1.505.005.354
Trimmomatic	1.099.953.888
Genes mapeados	
Macrófago	43.665 86,36%
<i>L. braziliensis</i>	8.463 100%

Número de *reads* obtidos no sequenciamento de RNA-Seq antes (Fastqc) e depois da remoção das sequências adaptadoras com o (Trimmomatic). As porcentagens indicam a porcentagem de genes mapeados em relação ao número de genes preditos (NCBI).

Para analisar a correlação entre os conjuntos de dados gerados nas infecções tratada com BSF2 e sem tratamento, foi feita a análise dos genes presentes em cada condição. Como pode ser observado, mais uma vez, nos diagramas de Venn a maior parte dos transcritos identificados nas análises de RNA-Seq pertencem à célula hospedeira e não ao parasito (figura 8).

Analisando os transcritos do parasito, vemos que no tratamento com o BSF2 (figura 8B) a maioria dos transcritos mapeados apresentaram expressão em ambas as condições experimentais; 8216 genes apresentaram alguma expressão tanto no controle (CT), quanto no tratamento (BSF2); 14 genes apresentaram expressão somente no controle e 12 genes somente no tratamento (tabela 7). Entre os 8216 transcritos de *L. braziliensis* que aparecem no controle e no tratamento, nenhum gene foi diferencialmente expresso ($q\text{-value} < 0.05$). São considerados positivamente regulados aqueles genes que apresentam valores de $\text{Log}_2(\text{Fold Change}) > 1$ e $-\text{Log}_{10}(q\text{-value}) > 1.3$ (proporcional a $p\text{-value}$ menor que 0,05); e genes negativamente regulados aqueles que possuem $\text{Log}_2(\text{Fold Change}) < 1$ e $\text{Log}_{10}(q\text{-value}) > 1.3$.

Tabela 7 – Genes de *L. braziliensis* mapeados somente na infecção tratada com o BSF2

Gene	Sample_1	Sample_2	Value_ 1	Value_2	Significant	TriTrypDB
LBRM_07 _TRNA1	control_leish	bsf2_leish	0	73.582	no	<i>transfer RNA-Arg</i>
LBRM_34 _0320	control_leish	bsf2_leish	0	129.195	no	<i>hypothetical protein, unknown function</i>
LBRM_15 _0010	control_leish	bsf2_leish	0	154.188	no	<i>histone H4</i>
LBRM_10 _1530	control_leish	bsf2_leish	0	194.929	no	<i>hypothetical protein, conserved</i>
LBRM_34 _0310	control_leish	bsf2_leish	0	298.491	no	<i>hypothetical protein, conserved</i>
LBRM_07 _0510	control_leish	bsf2_leish	0	307.556	no	<i>hypothetical protein</i>
LBRM_24 _1500	control_leish	bsf2_leish	0	329.659	no	<i>Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)/EF-hand domain pair, putative</i>
LBRM_35 _0050	control_leish	bsf2_leish	0	400.021	no	<i>histone H4 (pseudogene)</i>
LBRM_27 _2330	control_leish	bsf2_leish	0	1133.36	no	<i>hypothetical protein, conserved</i>
LBRM_23 _SNRNA2	control_leish	bsf2_leish	0	11273.2	no	<i>small nuclear RNA, U3 snRNA</i>
LBRM_25 _SNORN A4	control_leish	bsf2_leish	0	12803.1	no	<i>snoRNA encoding</i>
LBRM_35 _SNRNA1	control_leish	bsf2_leish	0	16822.7	no	<i>small nuclear RNA, U4 snRNA</i>

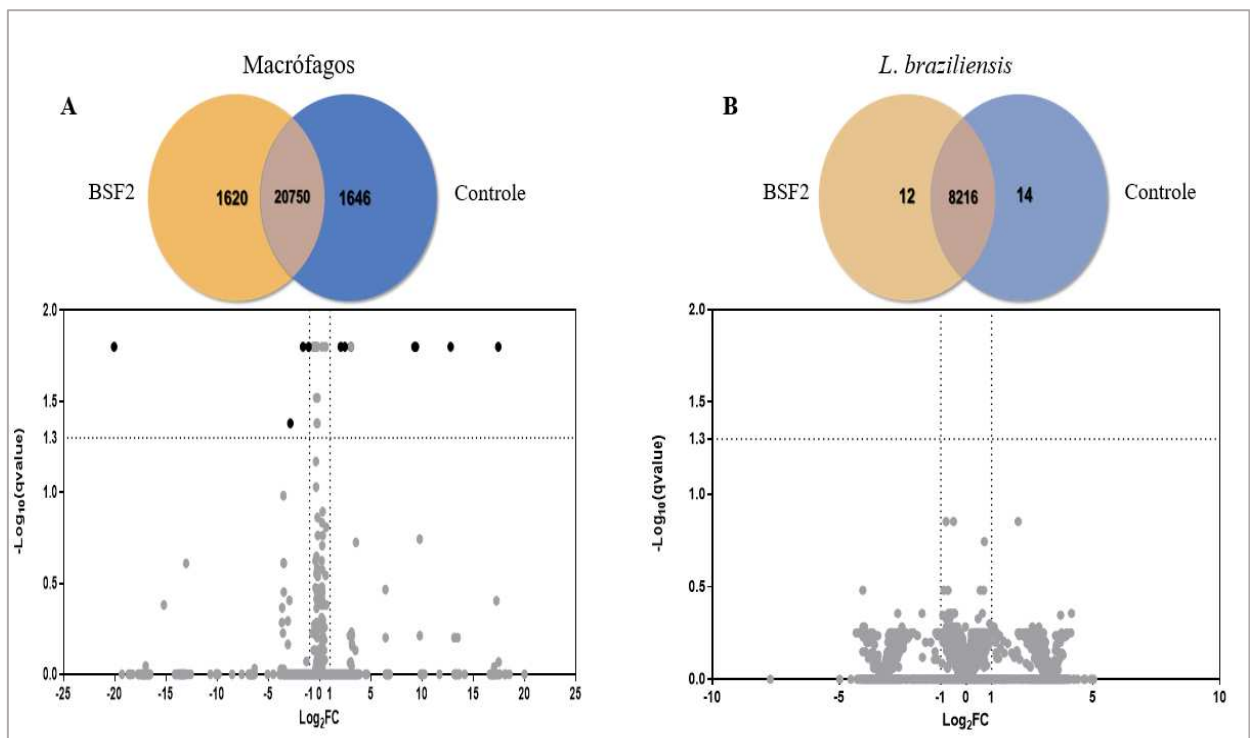
Genes exclusivos do tratamento e valores de FPKM (*Value*). *Sample_1*: controle – infecção não tratada; *Sample_2*: infecção tratada.

Para a célula hospedeira, mais de 20000 transcritos foram identificados, sendo 1620 genes expressos apenas nas células infectadas tratadas, e 1646 genes expressos apenas nas células controle (CT), ou seja, as células infectadas não tratadas (figura 8A). Entre os transcritos de macrófagos é possível notar um efeito do tratamento da infecção com o BSF2; a expressão de alguns genes foi positiva ou negativamente modulada.

Assim como observado na análise de PCA, os diagramas de Venn e os gráficos do tipo *Volcano plot* sugerem que o tratamento da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* com o

BSF2, provoca um efeito na modulação da expressão gênica a nível de célula hospedeira e não diretamente sobre o parasito. Grande foi a diferença observada entre o número de transcritos atribuídos à célula hospedeira e ao parasito (figura 8), o que pode ser explicado pela diferente quantidade de genes presentes no genoma de cada espécie e por se tratar de uma infecção tratada com um composto que possui ação leishmanicida, como já demonstrado (SOUZA, 2016).

Figura 8 – Efeito do tratamento da infecção de macrófagos por *L. braziliensis* com o BSF2 sobre a expressão gênica global da célula hospedeira e do parasito



Os diagramas de Venn mostram o número de genes específicos e comuns a cada condição. Controle: infecção não tratada. Os gráficos de *Volcano plot* representam a expressão diferencial de genes em amostras de RNA-Seq de macrófagos (A) e *L. braziliensis* (B) durante a infecção após o tratamento com o composto. As linhas tracejadas partindo do eixo x indicam os valores de Log_2FC (-1) e (+1); e no eixo y $-\text{Log}_{10}(\text{qvalue}) = 1.3$. Pontos pretos: genes diferencialmente expressos; pontos cinzas: genes que não foram diferencialmente expressos.

O BSF2 até então não possui um alvo molecular em *Leishmania* bem definido. No entanto, ele é um análogo da Furaminidina, que serviu de base para a síntese do composto, sendo essa um potente inibidor de PRMT1 (YAN et al., 2014) com atividade antiparasitária contra *T. brucei*, *P. falciparum* (HU et al., 2009). Assim como a Furamidina, o BSF2 teve sua atividade demonstrada contra *P. falciparum* e *L. braziliensis* (SAUER et al., 2017; SOUZA, 2016). Além disso, compostos diamidinas possuem mecanismo de ação relacionado à capacidade que têm de se ligar ao DNA, inibindo a ligação de enzimas dependentes de ligação ao DNA para desempenho de suas funções e, assim impedir a transcrição gênica (ARAFA R.K. et al, 2005).

Considerando a atividade microbicida que estes compostos apresentam, a interação que possuem com enzimas envolvidas em processos de metilação/demetilação de histonas, de interação com o DNA e o fato de que estes alvos epigenéticos possuem motivos-chave conservados em eucariotos (LORENZON et al., 2022), é provável que o BSF2 possa desempenhar sua função leishmanicida atuando sobre PRMTs, tanto do parasito quanto das células hospedeiras.

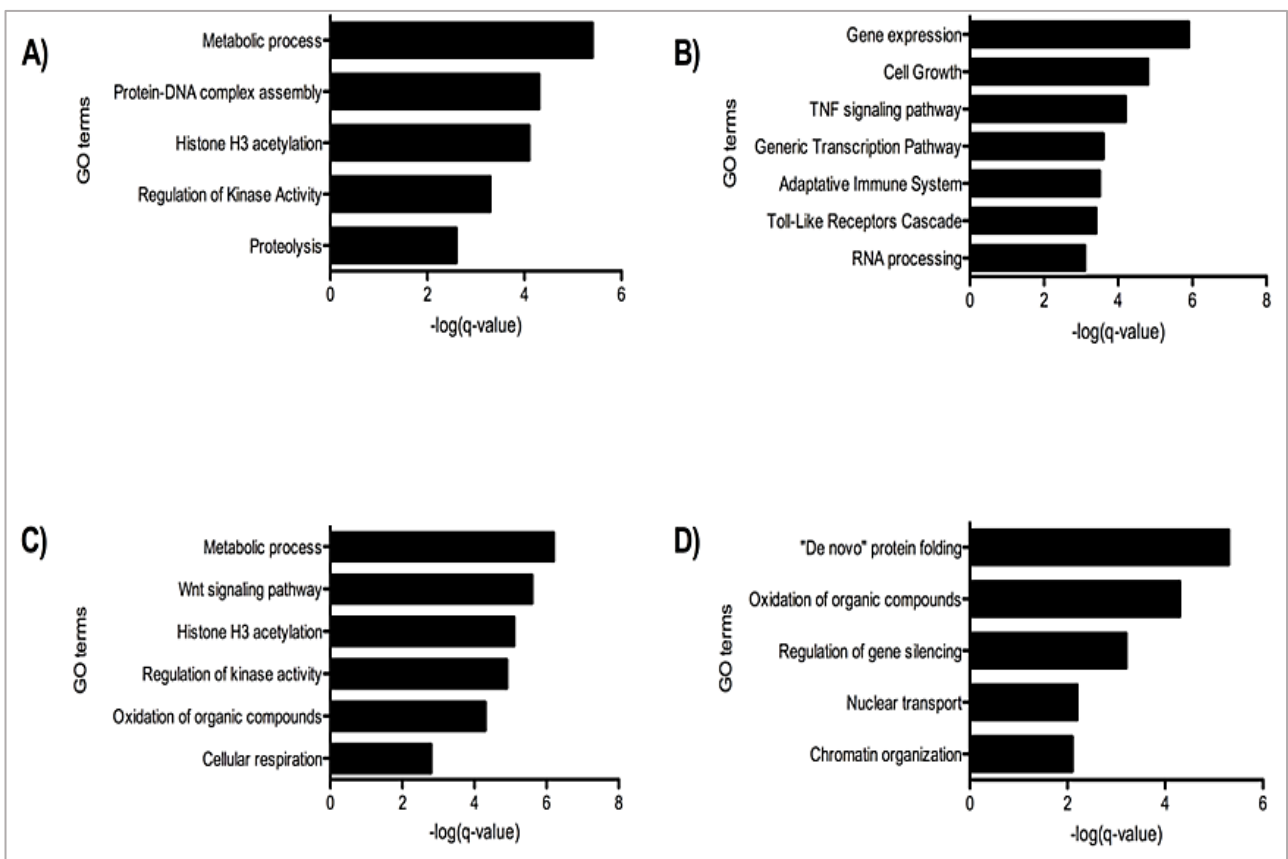
No contexto de ação do BSF2 sobre PRMTs de *L. braziliensis* (LbPRMTs), dada a importância que estas enzimas possuem para a biologia parasitária; sendo este composto desenvolvido para ser parasito-específico, a partir de um análogo inibidor de PRMT1; um estudo funcional das PRMTs de *L. braziliensis* recentemente publicado, traz luz a essa discussão do provável mecanismo de ação do BSF2 como leishmanicida e inibidor de LbPRMTs (LORENZON et al., 2022).

Lorenzon e colaboradores, demonstram que os motivos que desempenham atividade de PRMT são conservados entre as proteínas de tripanossomatídeos e humanas. Porém, uma maior conservação é observada entre as PRMTs de *L. braziliensis* e *T. brucei*. Além disso, a dupla deleção das PRMT1 ou 5 em *L. braziliensis* compromete a proliferação de formas amastigotas axências e diminui a taxa de infecção em formas promastigotas; porém nenhuma das LbPRMTs se mostrou essencial à sobrevivência do parasito (LORENZON et al., 2022). Estes dados, vão ao encontro dos dados observados em nosso grupo de pesquisa que demonstram a atividade leishmanicida do BSF2 sobre a infecção e sobre formas promastigotas do parasito (SOUZA, 2016). A análise do BSF2 e de outros derivados da Furamidina, sobre células *L. braziliensis* nocautes de PRMTs pode ser uma abordagem futura para obter resultados ainda mais interessantes para validar o mecanismo de ação destes compostos sobre a infecção e sobre o parasito, já que as LbPRMTs poderiam interferir no controle das atividades de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos (LORENZON et al., 2022).

A análise de ontologia genética (GO) dos genes de macrófagos enriquecidos nas amostras tratadas com o BSF2 descreve as principais vias reguladas pelo tratamento realizado, em relação ao controle não tratado (figura 9). Pode-se observar que na infecção tratada com BSF2, genes relacionados à acetilação da histona H3 foram positivamente regulados (**A**), sendo alguns deles representantes de transcritos exclusivos das amostras de infecção tratada (**C**). Além disso, genes relacionados as vias do TNF α (Fator de Necrose Tumoral alfa), de receptores do tipo Toll e de resposta imune adaptativa foram vistos negativamente regulados na infecção tratada (**B**). Já entre os genes específicos do tratamento (**C**) e do controle não tratado (**D**), podemos observar a presença de genes categorizados relacionados à oxidação de compostos

orgânicos em ambas as situações. Genes relacionados a acetilação da histona H3 e à via de sinalização Wnt foram específicos do tratamento (C). Por outro lado, genes relacionados à organização de cromatina e à regulação de silenciamento gênico foram específicos da condição não tratada (D). O que pode indicar uma manipulação, de transcrição a nível epigenético, do parasito sobre a célula hospedeira, algo já observado em infecções envolvendo diferentes espécies de *Leishmania* (GUPTA, Anand Kumar et al., 2017; LECOEUR et al., 2020; NAVAS et al., 2014).

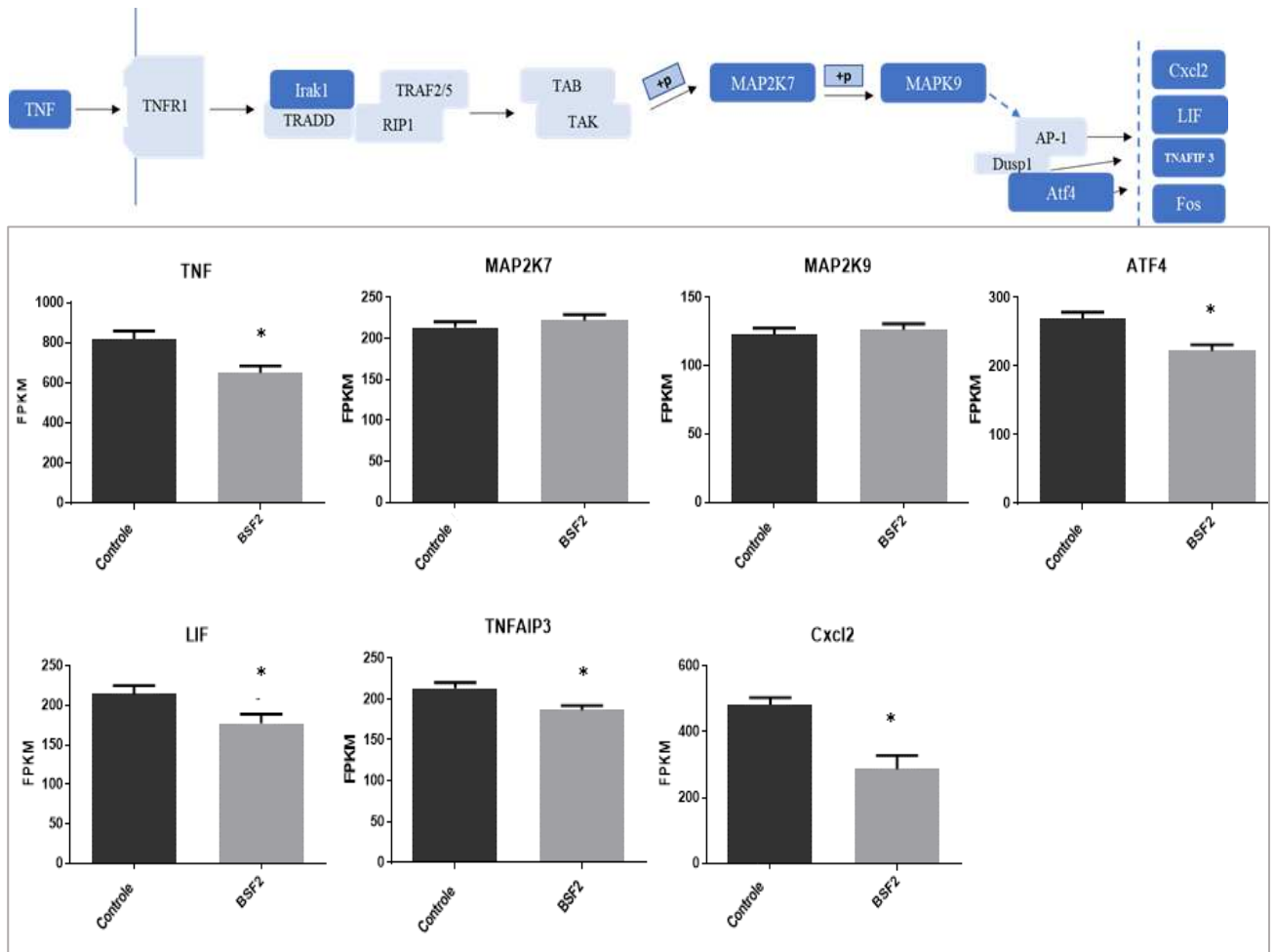
Figura 9 – Análise de ontologia genética (GO) dos grupos de genes de macrófagos diferencialmente expressos ou exclusivos em cada situação experimental



Análise de GO dos genes de cada situação experimental. Legenda: **A)** Genes positivamente regulados no tratamento com BSF2; **B)** Genes negativamente regulados no tratamento com o BSF2; **C)** Genes específicos do tratamento com o BSF2; **D)** Genes específicos do controle infectado não tratado.

Analisando o grupo de genes relacionados à via do TNF que apresentaram regulação negativa, foram identificados genes codificadores de proteínas que estão presentes ao longo de toda a via sinalização, como o TNF, Irak1, MAP2K7, MAPK9, ATF4, Cxcl2, Lif, Tnfrsf3 e Fos (figura 10). De posse dos valores de FPKM associados a cada um destes genes, foi aplicado o teste T para avaliar se a diferença de expressão observada após o tratamento com o BSF2 era de fato significativa, como pode ser observado na figura 10:

Figura 10 – Genes da via do TNF com expressão reduzida após o tratamento com o BSF2



Painel superior: via do TNF α (KEGG) com destaque para os genes que foram mapeados e negativamente regulados em macrófagos infectados e tratados com o BSF2 (azul escuro). Painel inferior: avaliação da expressão no transcriptoma por FPKM. (*) Genes com redução de expressão significativa pelo teste T. $p \leq 0.05$.

De fato, como demonstrado na figura 10, alguns genes presentes ao longo desta via apresentaram um perfil de expressão significativamente diferente após o tratamento da infecção com BSF2. Considerando, estes resultados, a importância do TNF α para a resolução de infecções em macrófagos por *L. braziliensis* (POLARI et al., 2019) e a regulação negativa observada, foram selecionados alguns genes-alvo para a etapa de validação por qRT-PCR e melhor compreensão do efeito do composto sobre a célula hospedeira durante a infecção. Para avaliar se o efeito observado de fato se dava pelo composto e não por modulação do parasito sobre a célula hospedeira, outros grupos e seus respectivos controle foram inseridos na análise experimental (macrófagos tratados não infectados – G1 e G3; e macrófagos estimulados tratados – G9 e G7), além dos grupos inicialmente experimentados e analisados por RNA-Seq.

Para cada gene analisado por qRT-PCR foi feita uma curva-padrão com um *pool* de amostras, contendo todos os grupos controles utilizados no experimento de validação. Todas as

curvas apresentaram um bom coeficiente de relação (R^2) entre os valores de Ct obtidos e as concentrações do *pool* de amostras utilizadas na construção da curva-padrão de cada gene (apêndice A).

Os resultados de expressão observados nas análises de qRT-PCR dos genes relacionados à via do TNF α tendem para uma regulação negativa destes genes na presença do composto BSF2 (figura 11). O gene do TNFR1 (receptor 1 do fator de necrose tumoral) não apresentou redução de expressão em macrófagos infectados (G6 e G4) ou não infectados (G1 e G3) tratados com o composto. Entretanto, uma diminuição estatística foi observada na expressão do TNFR1 em macrófagos que foram previamente tratados com o BSF2 e posteriormente estimulados com o LPS, agente conhecido por induzir a resposta inflamatória, em comparação a macrófagos que foram apenas estimulados e não tratados (G9 e G7). Este é um resultado interessante, pois uma das formas pelas quais macrófagos infectados por *L. braziliensis* promovem a diminuição da carga parasitária, está associada à produção de TNF α e de espécies reativas de oxigênio (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; NOVAIS et al., 2009). Além disso, em um estudo com camundongos mutantes nulos para TNF α (TNF α -/-), foi visto que estes animais não evoluem para um quadro curável de leishmaniose cutânea quando infectados com *L. braziliensis* (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; ROCHA et al., 2007).

Embora seja conhecida a importância da produção de TNF α para o controle da infecção por *L. braziliensis*, curiosamente o composto BSF2 parece exercer um efeito supressor sobre a via do TNF α em macrófagos diante de um desafio imunológico, como a estimulação com o LPS, enquanto exerce seu potencial leishmanicida como demonstrado por SOUZA, LA, 2016.

Outro gene que apresentou o mesmo padrão de expressão gênica que o TNFR1 foi a quinase MAPK9 presente na via do TNF α . Na presença do BSF2, macrófagos estimulados com LPS (G7) apresentaram uma diminuição na expressão desta proteína. Embora não tenha apresentado diferença estatística, a quinase MAP2K7 também apresentou diminuição de expressão gênica nesta condição. Na infecção tratada com o composto (G4), ambas as quinases não apresentaram diminuição estatística em relação aos macrófagos infectados não tratados (G6), porém é possível observar que as expressões gênicas diminuem entre esses grupos após o tratamento com o inibidor. A ativação da via do TNF α , via TNFR1 ativa diversas vias de sinalização que envolvem quinases, como as MAP2K7 e MAPK9, que por sua vez irão atuar na produção de uma resposta secundária aumentando a produção de citocinas inflamatórias, inclusive do próprio TNF α , para o desempenho de suas funções no sistema imune (SABIO; DAVIS, 2014). Considerando a supressão da via do TNF α , de fato espera-se que a expressão destas quinases também esteja sendo diminuída na presença do composto BSF2.

O mesmo perfil de expressão gênica foi observado no fator de transcrição ATF4/CREB em macrófagos infectados e não infectados (G6 e G4), tratados e estimulados (G9 e G7). Este fator de transcrição está presente na via do TNF α e na via de ativação dos receptores do tipo *Toll* (TLRs). Os receptores TLRs são expressos pelas células hospedeiras em resposta à presença de patógenos, ao reconhecerem seus padrões moleculares associados, que são transduzidos da membrana para o núcleo (ZHANG, Chunyan et al., 2013). Assim como a via do TNF α , os TLRs também estão entre os grupos de GO enriquecidos (figura 9B) que sofreram regulação negativa nos macrófagos infectados tratados com o BSF2.

O fator ATF4 foi inicialmente identificado em mamíferos como uma proteína do tipo zíper de leucina que se liga ao DNA através de interações proteína-proteína (AMERI; HARRIS, 2008). Atuando na produção de resposta imune inata, o ATF4 contribui para a produção de uma variedade de citocinas importantes no processo imunológico. Além disso, já foi demonstrado que a estimulação de monócitos humanos com LPS promove a ativação de ATF4, provocando a sua translocação para o núcleo, seguida da produção de citocinas inflamatórias (ZHANG, Chunyan et al., 2013). De fato, a estimulação de macrófagos com LPS promoveu um aumento da expressão de ATF4, porém este efeito não foi observado nas células que foram tratadas com o BSF2. Mais uma vez o tratamento com o BSF2, embora não tenha produzido tais efeitos nas células infectadas e tratadas, sugere uma modulação negativa da via de forma a evitar uma ativação destas células efectoras, enquanto exerce também função leishmanicida.

Duas citocinas produtos da ativação da via do TNF α , Lif e Cxcl2 apresentaram redução de expressão gênica durante a infecção após o tratamento com o composto. Lif (fator inibidor de leucemia) é uma citocina inflamatória altamente conservada que desempenha diversos papéis em vários sistemas (METCALFE, 2011). No sistema imunológico Lif e IL-6 desempenham papéis opostos, porém relacionados, na regulação de células T. Lif promove a transcrição de Foxp3, que atua sobre a regulação de células T reguladoras que diminuem a resposta imune de células efectoras. Ao mesmo tempo, Lif reprime a expressão de IL-6 que promove a indução de células Th17; células que produzem a citocina IL-17, que parece ter função protetora na infecção por *L. braziliensis*. Ao se ligar em seu receptor celular, IL-17 ativa uma cascata de sinalização que culmina na ativação de fatores de transcrição como NF-k β , um importante mediador da atividade de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias relacionadas à resistência à leishmaniose (METCALFE, 2011; NASCIMENTO, 2012). Dessa forma, como a regulação negativa de Lif foi observada em todas as situações experimentadas (figura 11 Lif), vemos que a ação do BSF2 mais uma vez sugere a uma modulação negativa da via do TNF α , citocina produzida por macrófagos quando infectados por patógeno intracelulares ou

estimulados com LPS. Além disso, já foi relatado o papel anti-inflamatório que Lif possui em infecções cutâneas, atuando como um importante regulador de citocinas como IL-1, IL-2, IL-6 e INF γ (METCALFE, 2011; ZHU et al., 2001). Neste ponto, vale ressaltar que o TNF α age de forma sinérgica com IFN γ (interferon gama) para aumentar a ativação de macrófagos, fazendo com que estas células ativem a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produzindo óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) que são importantes para a eliminação do parasito, como revisado por (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Já a Cxcl2 (ligante 2 de quimiocina com motivo C-X-C), quimiocina induzida por IL-17 e produto da via de ativação do TNF α em macrófagos, que atua no recrutamento de outras células, como neutrófilos para os locais de inflamação, apresentou redução significativa de expressão somente na infecção tratada com o BSF2 (G4). Esta quimiocina é de grande importância na regulação da resposta imune inata contra o parasito, pois leva à produção de IL-1 β que estimula a produção de TNF α pelos macrófagos, foi vista como super expressa em macrófagos U937 infectados por *L. braziliensis*, através de dados de RNA-Seq após 72 horas de infecção (OVALLE-BRACHO et al., 2015).

Além disso, sabe-se que o parasito pode controlar a expressão de genes da célula hospedeira a fim de neutralizar uma resposta imune capaz de resolver a infecção, algo já observado em diversas espécies de *Leishmania*, como *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*. Pois, a expressão de Cxcl2 e outras quimiocinas, ativa e recruta neutrófilos constantemente para o local da infecção contribuindo para a cronicidade da leishmaniose cutânea (NAVAS et al., 2014). Assim, os neutrófilos em um primeiro instante agem como hospedeiros temporários do parasito, mas também favorecem a colonização de macrófagos, que contribuem para o estabelecimento da infecção (FALCÃO et al., 2015). Além disso, alterações genéticas na expressão do receptor de quimiocina Cxcr2 em macrófagos infectados, sugerem a participação deste receptor nas infecções causadas por *L. braziliensis* (CASTELLUCCI et al., 2010). Outro ponto a destacar é que a indução da expressão de Cxcl2 por *L. braziliensis* também depende de NF-k β , que é induzido por IL-17, para ativar a produção de TNF α (GREGORY et al., 2008) que se encontra suprimido em macrófagos infectados por esse parasito após o tratamento com o BSF2.

Outro gene que sofreu diminuição estatística na sua expressão em macrófagos estimulados e tratados como o BSF2 (G7) foi o TNFAIP3 (proteína 3 induzida pelo TNF α). Esta é uma proteína que tem sua expressão rapidamente induzida pelo TNF α e está relacionada à inibição da ativação de NF-k β , bem como a apoptose mediada por TNF α . Esta proteína também possui atividade de ubiquitinase e está envolvida em respostas imunes que envolvem a ativação dos

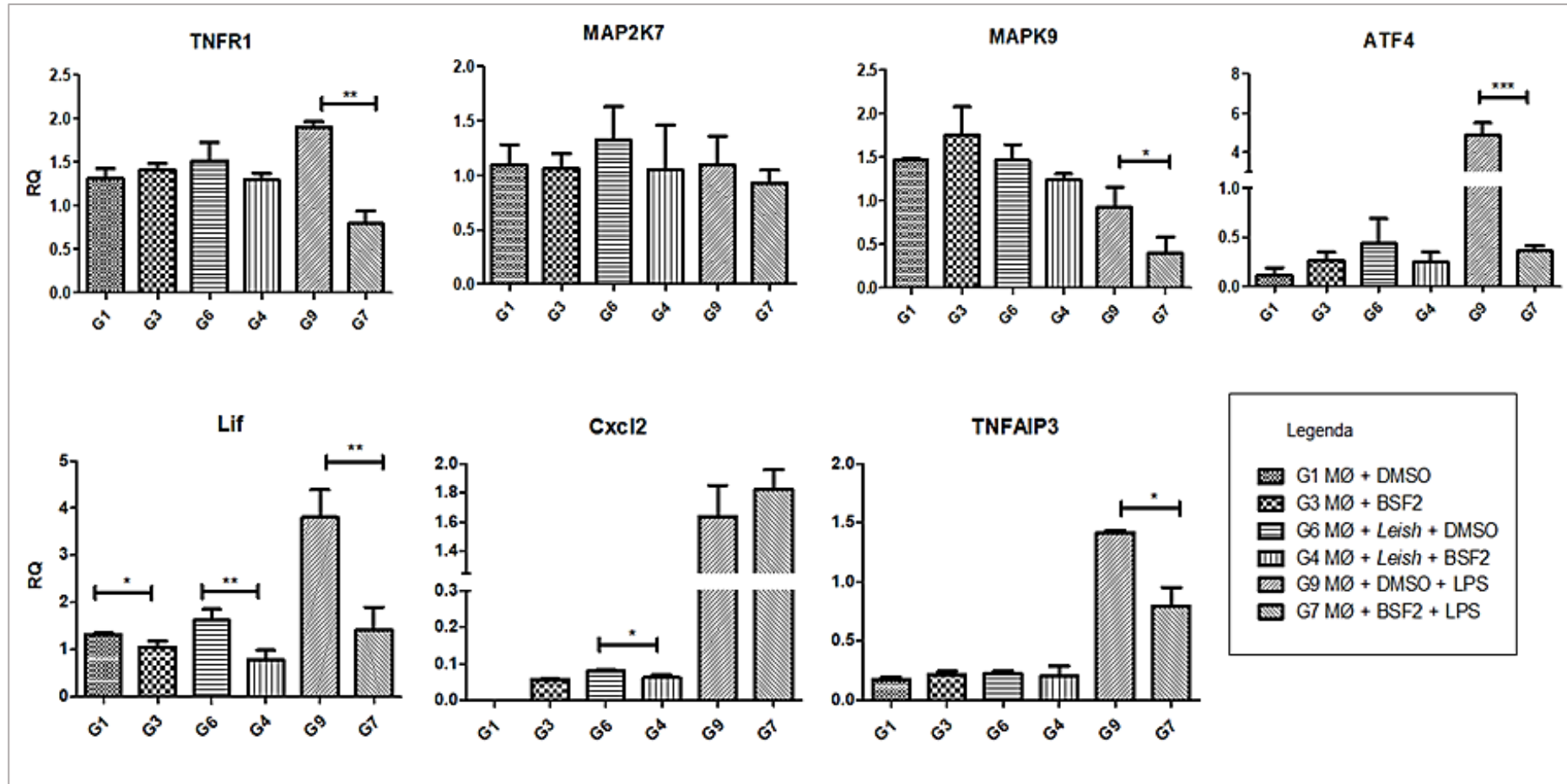
receptores TLRs via inibição de NF- κ B, sendo necessária na produção de citocinas pró-inflamatórias estimuladas por LPS e INF γ em macrófagos. Além disso, foi demonstrada como uma proteína super expressa em macrófagos infectados por *L. donovani*, através de manipulação do parasito sobre a célula hospedeira para evitar a ativação do inflamossoma (GUPTA, Anand Kumar et al., 2017). Nossos resultados mostram que a expressão de TNFAIP3 é reduzida mesmo diante da estimulação com LPS, quando os macrófagos não infectados foram previamente tratados com o BSF2, em relação aos macrófagos não tratados.

Não foi observada diminuição significativa na expressão de TNFAIP3 por qRT-PCR na infecção tratada com o BSF2, em comparação à infecção não tratada. Entretanto, recentemente foi demonstrado que macrófagos derivados de lesões provocada por *L. amazonensis*, espécie que também causa a leishmaniose cutânea, não exibem um fenótipo inflamatório, apresentando baixos níveis de expressão de componentes do inflamassoma e de reguladores pró-inflamatórios como o TNFAIP3. Além disso, este perfil de expressão foi relacionado a baixos níveis de acetilação de histonas (sem demonstrar qual HDAC estaria envolvida no processo), mais especificamente H3K9/14; e à redução da trimetilação na lisina 4 da histona H3 (H3K4) em promotores de genes pró-inflamatórios do eixo TLR-NF- κ B-inflamossoma, importantes para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz contra os parasitos. Estes macrófagos lesionais também não responderam à estimulação por LPS, impedindo a ativação do inflamossoma e de seus componentes como o TNFAIP3, evidenciando a presença de uma inibição epigenética e transcriptômica da resposta anti-inflamatória em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (LECOEUR et al., 2020).

Considerando estes estudos, acrescentando o fato que temos um composto desenvolvido para um alvo epigenético, é possível que a soma destes efeitos supressores, via epigenética, esteja contribuindo para a supressão das vias inflamatória do TNF α , aliado ao seu potencial leishmanicida durante a infecção.

A remodelação da cromatina através de modificações epigenéticas nas células hospedeiras, induzidas por parasitos do gênero *Leishmania* vem sendo estudada e demonstrada nos últimos anos (LAMOTTE et al., 2017). Tal estratégia é adotada para estabelecer condições permissivas para a sobrevivência intracelular do parasito e manutenção de seu processo infeccioso, sugerindo um possível caminho de regulação epigenética comum entre as diversas formas clínicas de leishmaniose que requer mais estudos, como proposto por AFRIN; KHAN; HEMEG, 2019; GUPTA, Anand Kumar et al., 2017; LECOEUR et al., 2020.

Figura 11 – Perfil de expressão dos genes de macrófagos associados à via do TNF α no tratamento com o BSF2 por qRT-PCR em diferentes condições experimentais

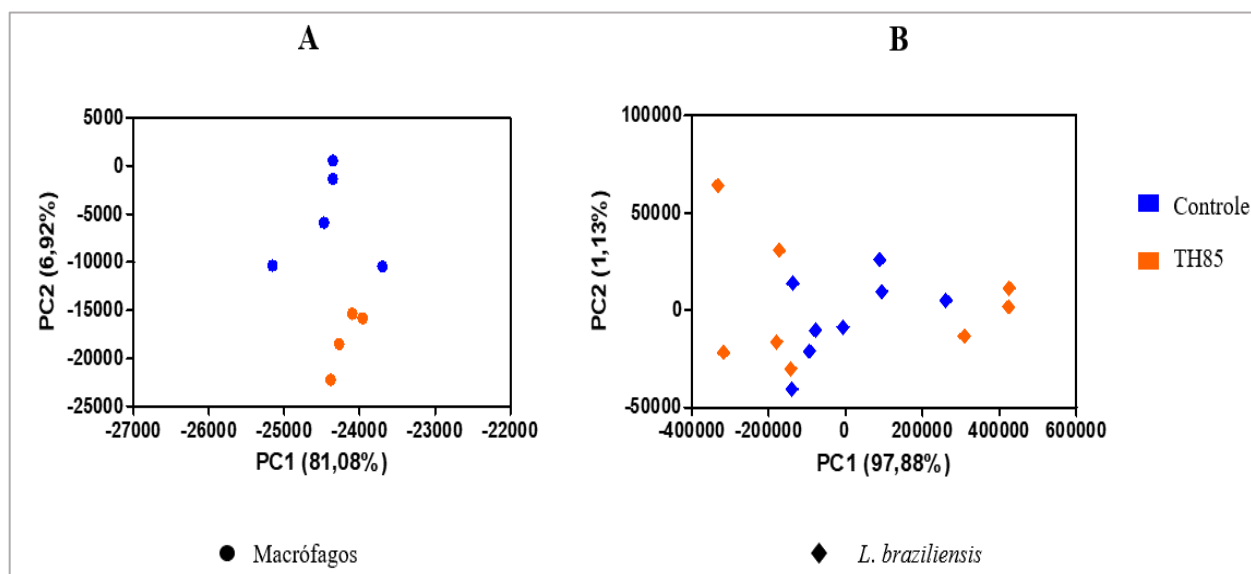


Legenda: MØ: macrófagos RAW264.7; *Leish*: *L. braziliensis* M2904 EGFP. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes (triplicata biológica) e de pelo menos duas réplicas técnicas de cada um destes experimentos. Análise estatística feita pelo GraphPad Prism, T. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $\leq 0,0005$.

5.1.2 Perfil de expressão gênica global do transcriptoma dual no tratamento com o TH85.

As mesmas análises de bioinformática do tópico anterior foram aplicadas sobre as amostras tratadas com $\frac{1}{4}$ do IC₅₀ do TH85, após 48 horas. Na comparação da qualidade das replicatas e dos perfis globais de expressão da célula hospedeira e do parasito é possível observar uma melhor separação entre as amostras de macrófagos (figura 12A) em relação às amostras de *L. braziliensis* (figura 12B) nos gráficos de PCA. Entre as amostras de macrófagos, nota-se presença de dois grupos de dados, sem sobreposição entre as amostras controle e as amostras tratadas. Enquanto, as amostras de parasito permaneceram mais agrupadas na condição controle e com uma maior dispersão na presença do composto.

Figura 12 – Perfil de expressão global de macrófagos e *L. braziliensis* durante a infecção tratada e não tratada com o composto TH85



As cores indicam o tipo de amostra: infecção tratada com TH85 (laranja) e controle – infecção não tratada (azul). Os símbolos representam o tipo de célula: A: (●) macrófagos RAW 264.7 infectados; B: (◆) formas intracelulares de *L. braziliensis*.

No tratamento com o TH85, 20691 transcritos de macrófagos apresentaram expressão tanto no controle quanto na infecção tratada, 1523 apresentaram expressão somente no tratamento e 1705 somente no controle. Porém, não foram encontrados genes diferencialmente expressos sendo positiva ou negativamente regulados entre os transcritos identificados (figura 13A). Também não foram encontrados genes diferencialmente expressos entre os transcritos do parasito (*Volcano plot*, figura 13B); um total de 8219 genes apresentaram expressão tanto no tratamento (TH85), quanto no controle (CT) e 11 genes apresentaram expressão exclusiva para

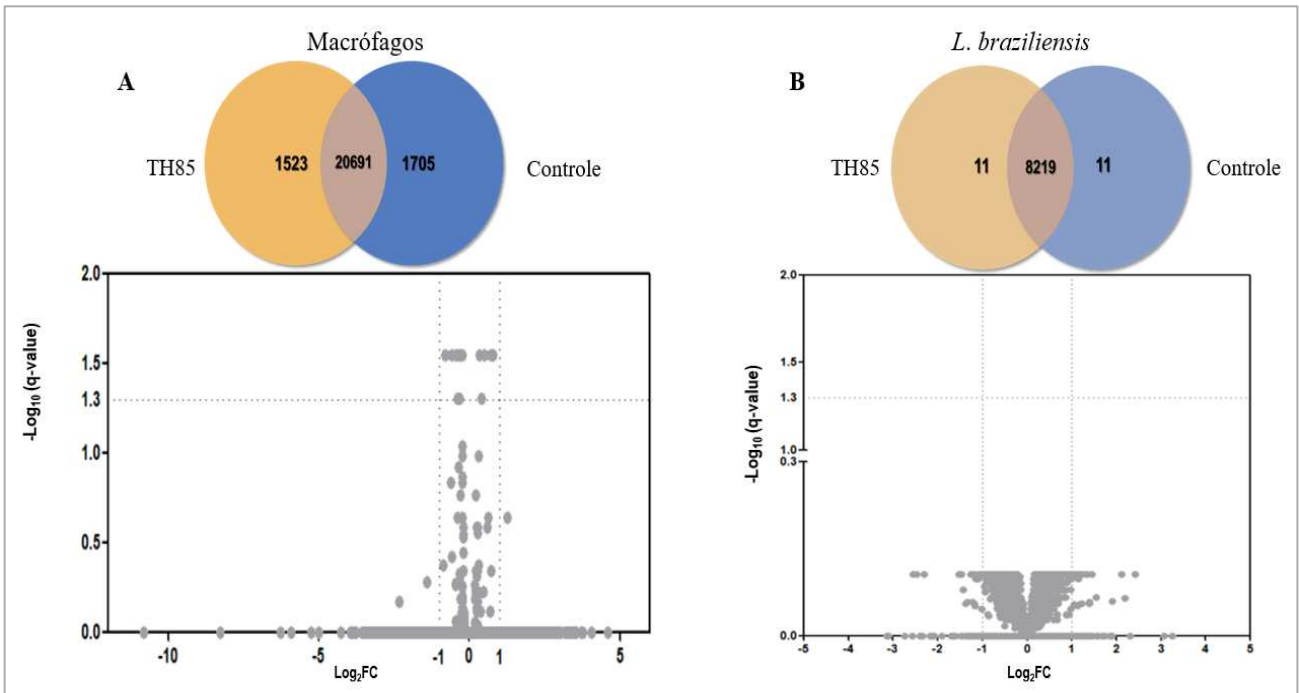
a condição controle ou para tratamento como o TH85 (Figura 13B). De modo geral, o efeito do tratamento sobre os parasitos foi bastante semelhante em relação ao número de genes que apresentaram algum tipo de expressão exclusiva na presença dos compostos. Além disso, entre os genes exclusivos, aqueles que foram mapeados somente na infecção tratada com os compostos, foi identificado o gene da histona H4, proteína alvo das modificações pós-traducionais promovidas pelas enzimas modificadoras de histonas, como as HDACs, prováveis alvos da ação inibitória do composto em questão (tabela 8).

Tabela 8 – Genes de *L. braziliensis* mapeados somente na infecção tratada com o TH85

Gene	Sample_1	Sample_2	Value_1	Value_2	Significant	TriTrypDB*
LBRM_24_1500	control_leish	th85_leish	0	0.302832	no	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger)/EF-hand domain pair, putative
LBRM_02_0010	control_leish	th85_leish	0	1.09481	no	phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase 3
LBRM_35_1100	control_leish	th85_leish	0	1.20967	no	40S ribosomal protein S10, putative
LBRM_07_0510	control_leish	th85_leish	0	4.37317	no	hypothetical protein
LBRM_11_0450	control_leish	th85_leish	0	8.30768	no	protein associated with differentiation 4, putative (pseudogene)
LBRM_35_0050	control_leish	th85_leish	0	9.27908	no	histone H4 (pseudogene)
LBRM_15_0010	control_leish	th85_leish	0	10.7273	no	histone H4
LBRM_10_1530	control_leish	th85_leish	0	15.5408	no	hypothetical protein, conserved
LPG1R	control_leish	th85_leish	0	31.4669	no	beta-galactofuranosyltransferase-like protein
LBRM_34_0310	control_leish	th85_leish	0	40.8194	no	hypothetical protein, conserved
LBRM_23_snRNA2	control_leish	th85_leish	0	10101.3	no	small nuclear RNA, U3 snRNA

Genes exclusivos do tratamento e valores de FPKM (*Value*). *Sample_1*: controle – infecção não tratada; *Sample_2*: infecção tratada.

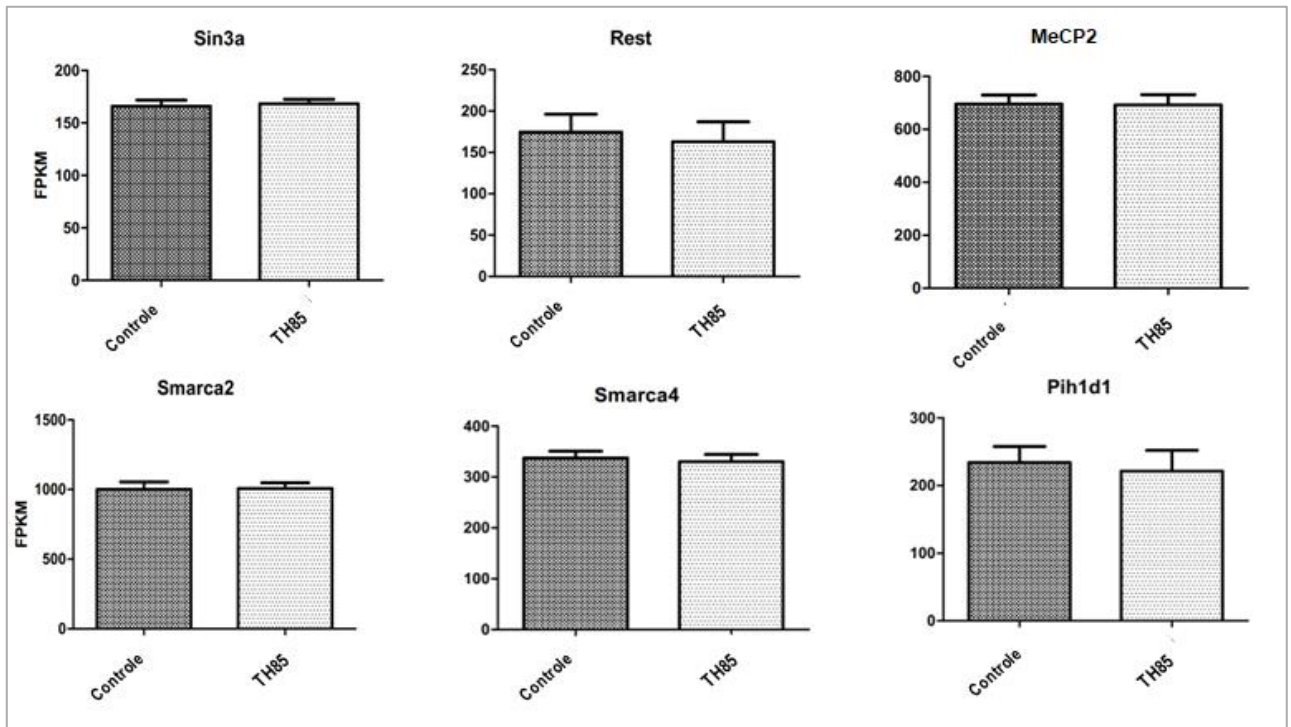
Figura 13 – Perfil de expressão global de macrófagos e *L. braziliensis* durante a infecção tratada e não tratada com o composto TH85



Os diagramas de Venn mostram o número de genes específicos e comuns a cada tratamento. Controle: infecção não tratada. Os gráficos de *Volcano plot* representam a expressão diferencial de genes em amostras de RNA-Seq de macrófago (A) e (B) *L. braziliensis* durante a infecção após o tratamento com o composto. As linhas tracejadas partindo do eixo x indicam os valores de Log_2FC (-1) e (+1); e no eixo y $-\text{Log}_{10}(\text{q-value}) = 1.3$. Pontos pretos: genes diferencialmente expressos; pontos cinzas: genes que não foram diferencialmente expressos.

Considerando a validação do transcriptoma por qRT-PCR, e uma análise prévia do transcriptoma dual em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Sérgio Verjovski, analisamos os valores de FPKM de alguns genes relacionados a processos de acetilação de lisinas e remodelação de cromatina (figura 14), tais como o Sin3a, REST e MeCP2 que atuam juntos, formando um complexo repressor com as HDACs; e Smarca2, Smarca4 e Pihd1 que atuam no complexo de remodelamento de cromatina SWI/SNF (PIETRZAK et al., 2019; THIEL; EKICI; RÖSSLER, 2015).

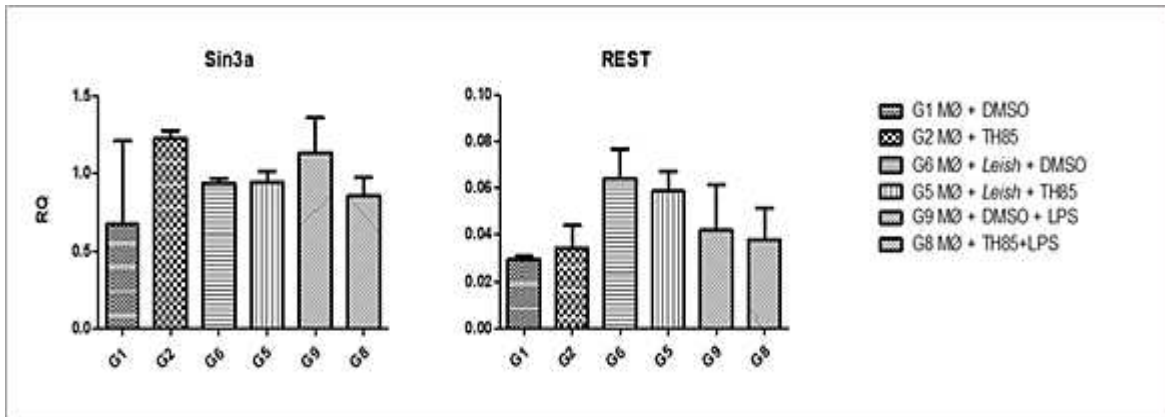
Figura 14 – Análise comparativa dos valores de FPKM para os genes de macrófagos mapeados no RNA-Seq, envolvidos em processos de modificação de cromatina.



Avaliação da expressão no transcriptoma por FPKM. (*) Genes com redução de expressão significativa pelo teste T. $p \leq 0.05$.

Como pode ser observado, os genes não apresentaram um valor de estatística significativo após a comparação dos valores de FPKM entre as duas condições experimentais testadas, infecção não tratada e infecção tratada com o TH85. O mesmo foi observado para a análise por qRT-PCR dos genes Sin3a e Rest (figura 15), mais uma vez indicando que o TH85 não altera de forma diferencial o perfil de expressão de global da célula hospedeira, quando usado para tratar a infecção por *L. braziliensis*, como observado até aqui. Porém, não podemos ainda descartar que a ausência de um efeito transcricional, represente totalmente a forma de atuação deste composto. Devemos considerar que uma ação a nível de inibição de HDACs pode ocorrer, sem afetar os níveis da expressão gênica, porém alterando, por exemplo, o controle da replicação do DNA.

Figura 15 – Perfil de expressão de genes de macrófagos associados no tratamento com o TH85



Os resultados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. Legenda: MØ: macrófagos RAW264.7; *Leish*: *L. braziliensis* M2904 EGFP. Análise estatística feita pelo GraphPad Prism.

Neste sentido, o resultado obtido corrobora com o estudo do nosso grupo, que mostra a ação leishmanicida do TH85 acompanhada de alterações no padrão de condensação de cromatina do parasito, indução de apoptose celular e parada de ciclo celular em G2-M em amastigotas, sem afetar o macrófago, conforme resultados de microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo (ÂNGELO DE SOUZA et al., 2020). O fato de o TH85 não afetar a transcrição gênica global dos macrófagos e do parasito corroboram com um efeito direto deste inibidor sobre HDAC do parasito, demonstrando um possível efeito direto e seletivo do inibidor.

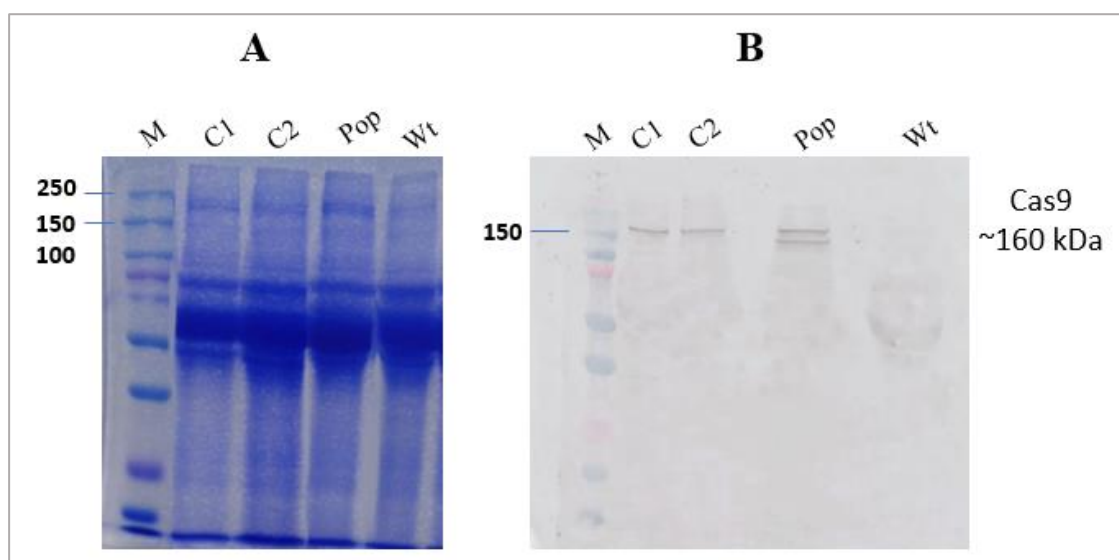
5.2 Capítulo 2: Estudos das HDACs de *L. braziliensis*

5.2.1 Deleção das HDACs de *L. braziliensis* por CRISPR/Cas9

Em busca de uma maior compreensão da importância das HDACs de *L. braziliensis* para a biologia parasitária, que as indique como alvos terapêuticos no uso de iHDACs, este trabalho teve como um de seus objetivos a deleção dos genes codificadores das 4 HDACs mapeadas no genoma de *L. braziliensis*. Para isso foi utilizada a técnica de deleção por CRISPR/Cas9.

O primeiro passo para este estudo foi a construção de uma linhagem celular de *L. braziliensis* que expressasse de forma constitutiva a proteína Cas9. Como pode ser visto na figura 16, foi comprovada por *Western blotting* a obtenção de uma população (Pop) e de clones isolados (C1 e C2) expressando constitutivamente a Cas9.

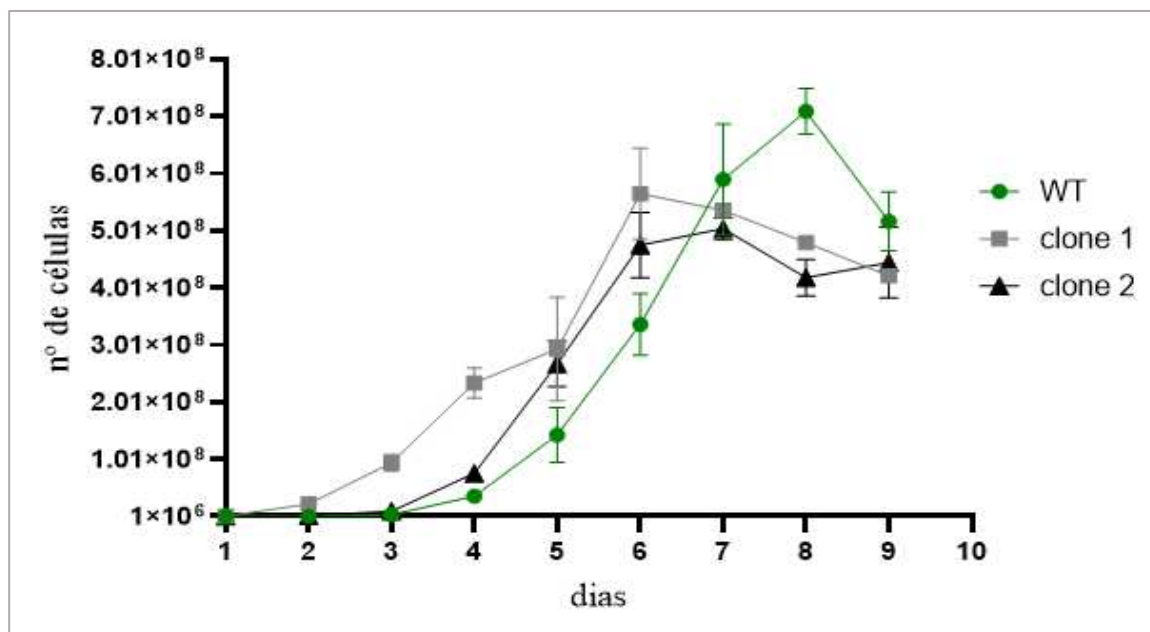
Figura 16 – Confirmação da integração do cassete de pTB007 e expressão da Cas9



SDS-Page dos extratos de *L. braziliensis* (A) e *Western blotting* de confirmação de expressão da Cas9 nos clones 1, 2 e na população inicial de transfetada (B). Anticorpos: primário anti-FLAG 1:500 (MA191787 – Invitrogen), secundário anti-mouse conjugado com peroxidase 1:120000 (A9044 – Sigma). M: marcador (Bio-Rad *Dual Color*); C1 e C2: clones 1 e 2; Pop: população de LbCas9 e Wt: LbM2904.

Após a confirmação da expressão e estabelecimento da linhagem LbCas9 (população e clones), foi feita a curva de crescimento para verificar se a expressão de Cas9 alterou o perfil de desenvolvimento desta nova linhagem. Como esperado, uma vez que o estabelecimento da LbCas9 através da transfecção de pTB007 é algo bem documentado na literatura (ADAUI et al., 2020; ESPADA et al., 2021; SHARMA et al., 2022), não observamos uma diferença significativa no perfil de crescimento das culturas comparadas (figura 17).

Figura 17 – Curva de crescimento das linhagens de LbM2904



Cada ponto representa a média de três experimentos independentes. Legenda: WT: LbM2904; clone 1 e clone 2: isolados de LbCas9.

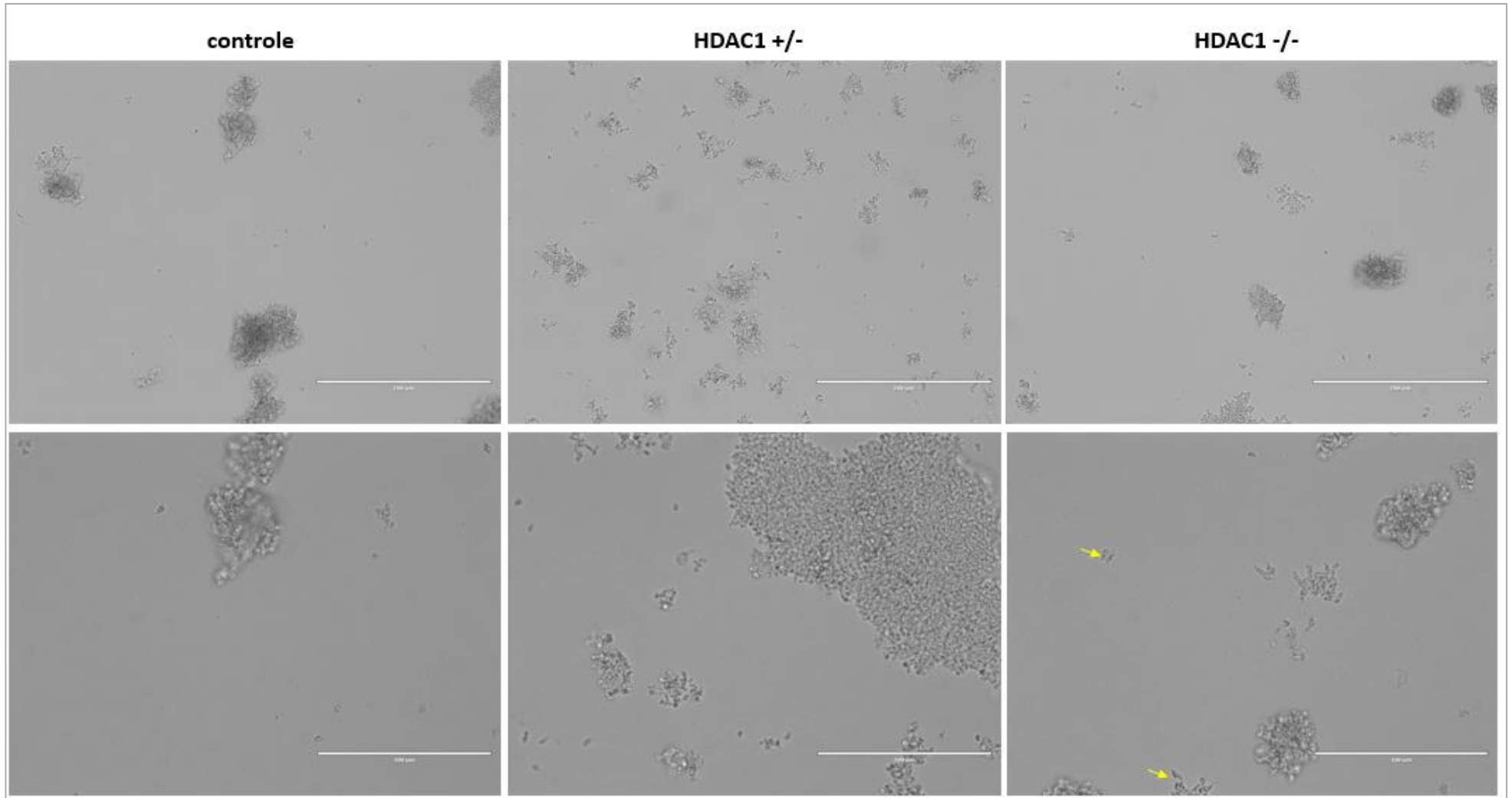
Após o estabelecimento da cultura de LbCas9, da obtenção dos gRNAs e TracrRNA, foi feita a amplificação dos cassetes de DNA doadores (apêndice B) para interrupção de cada gene alvo, com inserção dos genes de resistência a antibiótico usados no processo de seleção de transformantes (neomicina e puromicina). Assim, então, foram feitas as transfecções para cada deleção de um alelo e dos dois alelos de cada uma das LbHDACs isoladamente: LbHDAC1 +/-, LbHDAC1 -/-, LbHDAC2 +/-, LbHDAC2 -/-, LbHDAC3 +/-, LbHDAC3 -/-, e LbHDAC4 +/-, LbHDAC4 -/-. Em seguida, foi iniciado o acompanhamento das culturas transfectadas por visualização em microscópio óptico invertido.

Após aproximadamente 4 semanas de transfecção, as culturas mantidas em garrafas, em seus respectivos meios de seleção, não apresentaram um fenótipo normal de crescimento e morfologia. Observando as culturas em microscópio ótico, em maior aumento (40-60x) foi possível ver sutis movimentos celulares e células com a divisão celular incompleta. As células transfectadas com algum cassete de deleção, em sua maior parte se apresentavam em aglomerados celulares grandes, diferentes de uma típica roseta de multiplicação, e algumas células livres no meio, sempre com morfologia anormal. Apesar de estarem livres, estas células apresentavam motilidade bastante reduzida; outro fato observado foi o aspecto granuloso destas células.

Nas células controle (parasitos não transfectados em meio com os antibióticos de seleção) observou-se, praticamente ausência de movimentação celular, um número muito

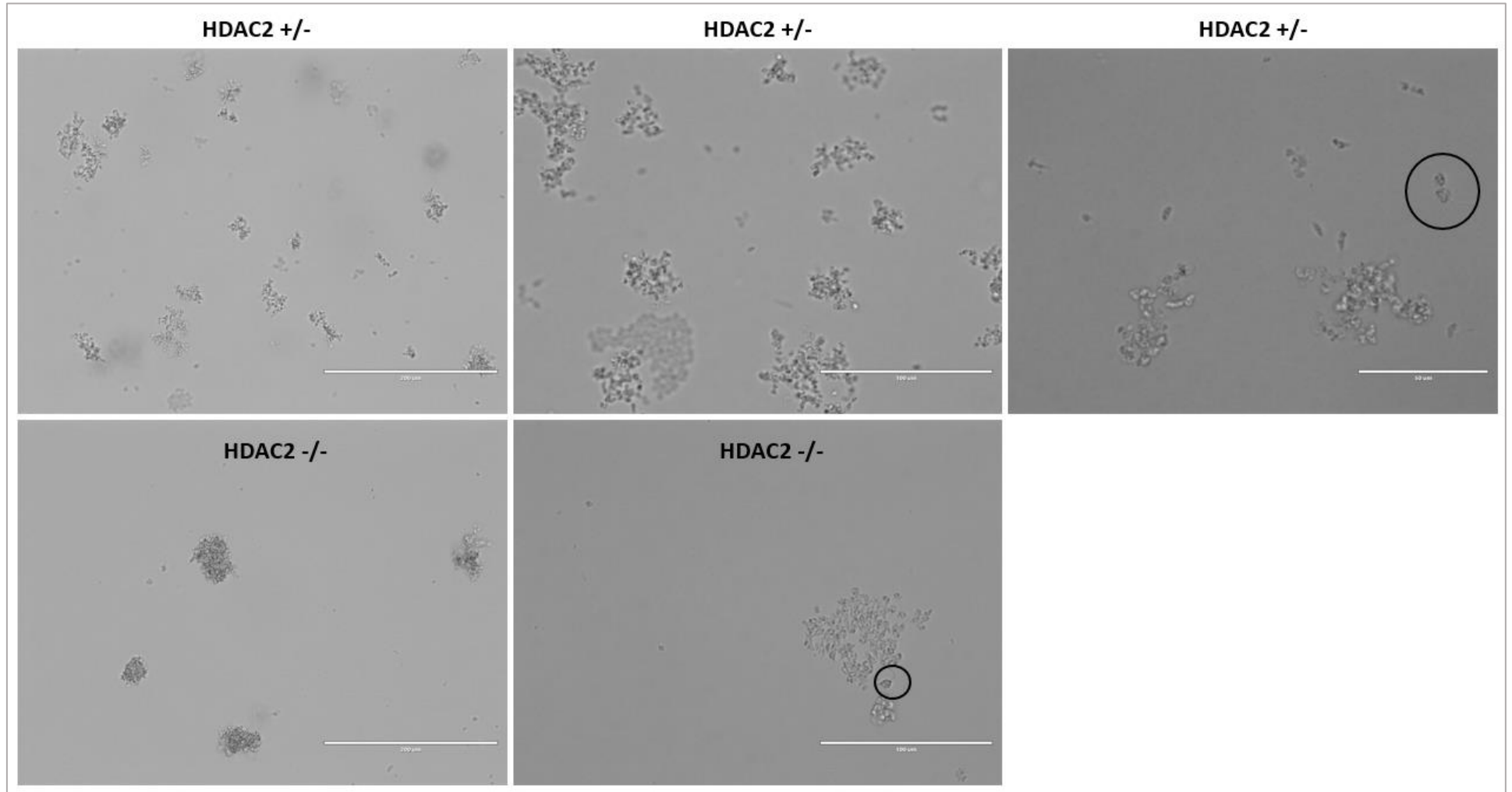
menor de aglomerados de células, com morfologia ainda mais danificada do que as células transfectadas para deleção das LbHDACs. Em geral os mutantes que, em tese são +/- apresentaram relativa melhor mobilidade e possível maior crescimento celular do que os mutantes -/-, conforme demonstrado pela presença de maiores aglomerados de células e visualização mais frequente de movimentos em células individualizadas e em aglomerados. A seguir, são apresentadas imagens ilustrativas das culturas transfectadas (figuras 18-21).

Figura 18 – LbCas9 em meios seletivos: controle e HDAC1



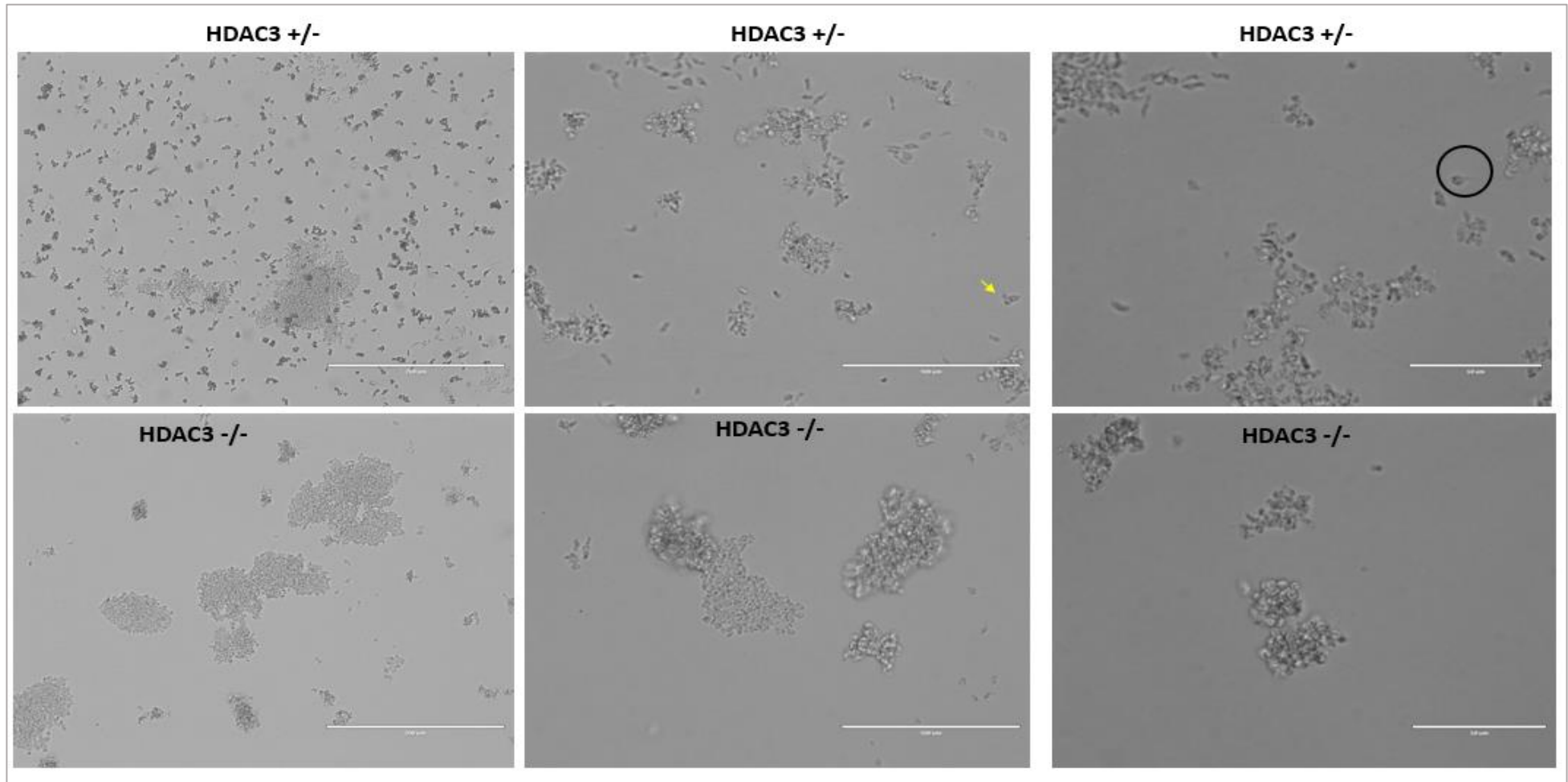
Legenda: Controle: LbCas9 WT em meio contendo neomicina e puromicina. (+/-): deleção única – meio seletivo contendo neomicina. (-/-): dupla deleção – meio seletivo contendo neomicina e puromicina. Painel superior – aumento de 20x; painel inferior – 40x. Seta: parasito granuloso. Parasitos mantidos em garrafas de cultivo.

Figura 19 – LbCas9 em meios seletivos: HDAC2



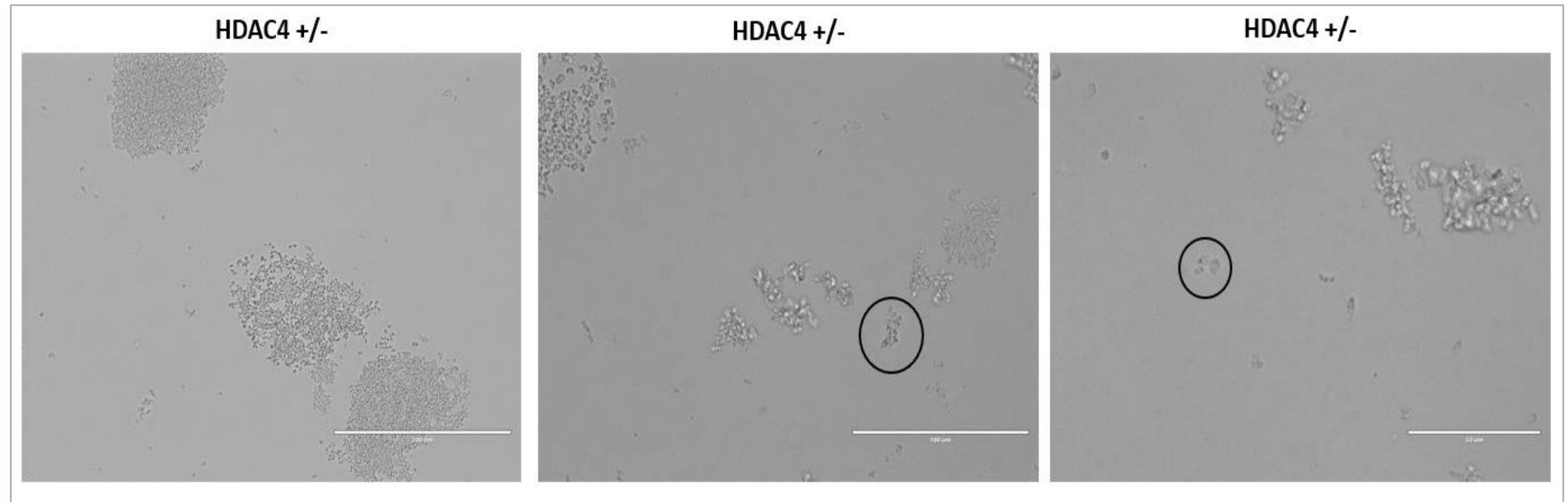
Legenda: Controle: LbCas9 WT em meio contendo neomicina e puromicina. (+/-): deleção única – meio seletivo contendo neomicina. (-/-): dupla deleção – meio seletivo contendo neomicina e puromicina Painel superior – HDAC2 +/- em aumento de 20x, 40x e 60x; Painel inferior – HDAC2 -/- em aumento de 20x e 40x. Círculos: parasitos com morfologia alterada. Parasitos mantidos em garrafas de cultivo.

Figura 20 – LbCas9 em meios seletivos: HDAC3



Legenda: Controle: LbCas9 WT em meio contendo neomicina e puomicina. (+/-): deleção única – meio seletivo contendo neomicina. (-/-): dupla deleção – meio seletivo contendo neomicina e puomicina. Painel superior – HDAC3 +/- em aumento de 20x, 40x e 60x; Painel inferior – HDAC3 -/- em aumento de 20x e 40x. Círculo: parasito com morfologia alterada. Seta: parasito granuloso. Parasitos mantidos em garrafas de cultivo.

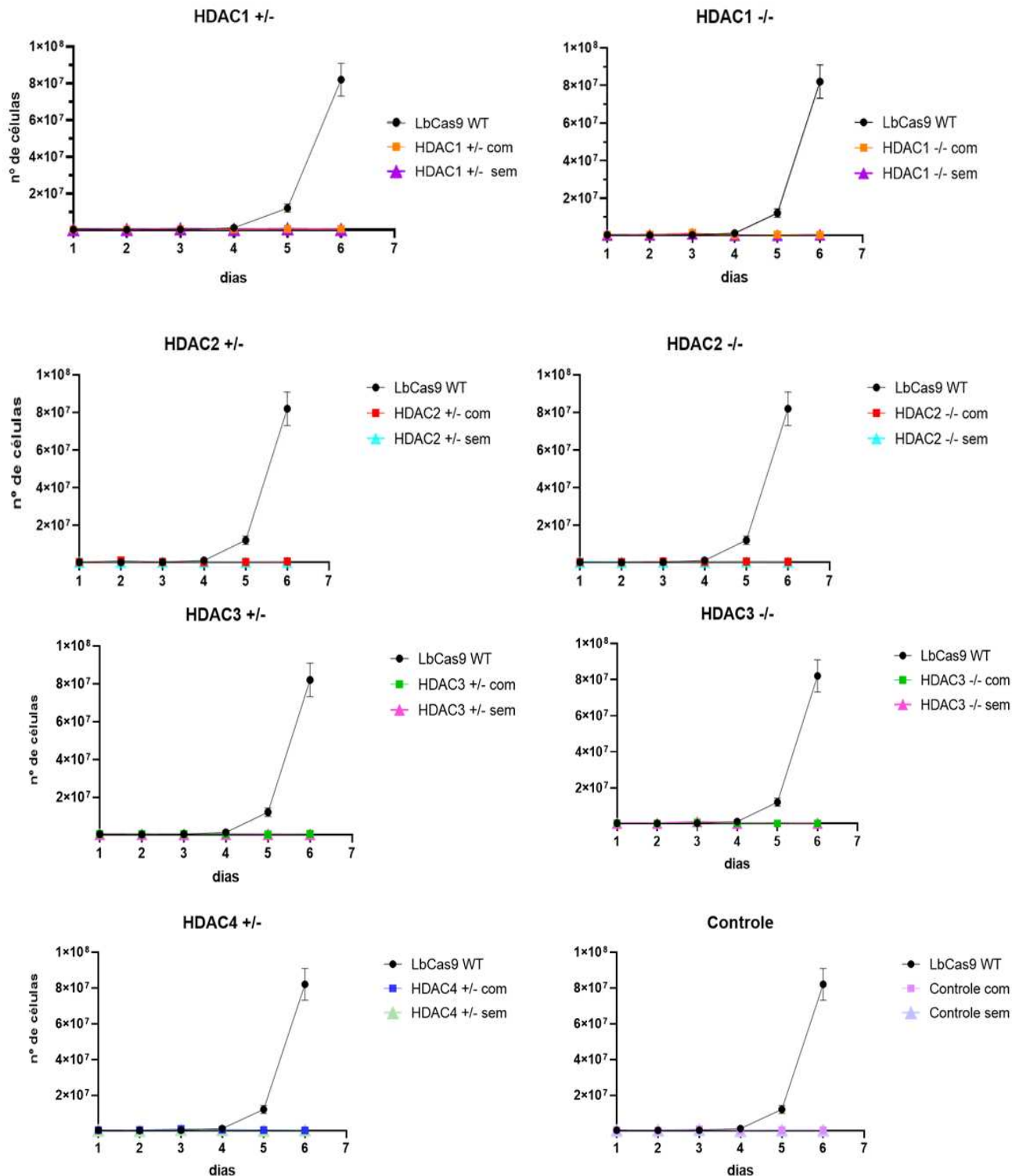
Figura 21– LbCas9 em meios seletivos HDAC4



Legenda: Controle: LbCas9 WT em meio contendo neomicina e puromicina. (+/-): deleção única – meio seletivo contendo neomicina. (-/-): dupla deleção – meio seletivo contendo neomicina e puromicina. HDAC4 +/- em aumento de 20x, 40x e 60x. Círculos: parasitos com morfologia alterada. Parasitos mantidos em garrafas de cultivo.

Considerando as observações de presença de grandes aglomerados com células de morfologia anormal, presença de movimentos celulares e o fato de que macroscopicamente foi possível notar que as culturas transfectadas apresentavam diferentes níveis de turbidez do meio com o passar do tempo, causado por um crescimento celular, principalmente em relação ao controle – LbCas9 em meio com neomicina e puromicina, é possível sugerir que tenhamos conseguido obter populações de *L. braziliensis single* e duplo deletadas para as LbHDACs 1-4. Além disso, as culturas que em tese sofreram a deleção de um alelo de HDAC (+/-) eram mais turvas do que as culturas de dupla deleção (-/-), o que pode ser atribuído tanto a um efeito um pouco menos deletério em resposta a deleção de somente um dos alelos dos genes alvos. Porém, não podemos descartar também a possibilidade de efeitos diretos das drogas de seleção, que para o *single* deletado é somente uma e para o duplo deletado duas drogas. Partindo deste ponto, repiques destas culturas transfectadas foram feitos em meios com e sem as drogas de seleção, a fim de observar o crescimento destas células. Por contagem diária de células, vimos que as culturas transfectadas de fato não possuem um desenvolvimento normal em relação a uma cultura de LbCas9, que permite acompanhar o seu crescimento através da contagem (figura 22). Importante destacar que a contagem das células é dificultada devido a morfologia anormal (tipo arredondado e disforme) e a presença dos aglomerados celulares que dificultam a obtenção de amostras homogêneas para a contagem celular.

Figura 22 – Curvas de crescimentos das células transfectadas vs LbCas9 WT



Curvas de crescimento de *L. braziliensis* controle (LbCa9 WT) e mutantes. As culturas foram iniciadas com 5×10^5 células, contadas diariamente em câmara de Neubauer. Os dados representam a média e desvio padrão de 2 replicatas. Legenda: **com**: meio contendo 1 ou 2 drogas de seleção; **sem**: meio sem nenhuma droga de seleção; Controle: LbCas9WT em meio com drogas de seleção; (+/-): deleção única – resistência a neomicina. (-/-): dupla deleção – resistência a neomicina e puromicina.

Com base nos resultados e nas observações obtidas, até então não foi possível afirmar que a deleção de um ou dois alelos dos genes das LbHDACs de fato ocorreu e que a falta destes genes, ou de um de seus alelos, são essenciais para o desenvolvimento do ciclo celular do parasito, provocando as alterações registradas; fato já observado em outras espécies de tripanossomatídeos (INGRAM; HORN, 2002; MAREK et al., 2021; PICCHI-CONSTANTE et al., 2021). No entanto, vale ressaltar que as células após a transfecção e a adição de drogas de seleção apresentavam aspectos morfológicos normais, em todas as culturas analisadas. Dias após a adição das drogas de seleção, as culturas foram mostrando as modificações apresentadas, sem evoluir para uma cultura recuperada e bem estabelecida. Conforme as culturas não foram evoluindo, optamos por mantê-las em meio de cultivo sem droga de seleção, para permitir uma melhor recuperação das células; a mesma condição, foi utilizada para o plaqueamento, seguido de análise por densidade ótica (apêndice C) e diluição limitante. Até o momento, as culturas se mantêm da mesma forma não progredindo em seu ciclo celular, onde algumas parecem crescer em aglomerados que turvam o meio, porém sem uma comprovação direta do crescimento e progressão do ciclo celular.

Observações semelhantes às feitas neste trabalho foram obtidas em mutantes nulos de *T. cruzi* para das HDACs 1 e 2, genes essenciais à sobrevivência do parasito. Os mutantes nulos destes genes, não progrediram em seu ciclo celular e morreram com o tempo após a deleção. Já mutantes nulos para a HDAC 4, foram viáveis nestes parasitos, apresentando um ciclo celular com progressão mais lenta e aspectos morfológicos alterados, como um corpo celular mais alongado e núcleo menos condensado próximo ao cinetoplasto. Estas mesmas observações foram feitas em mutantes de nulos para as TcHDAC 1 e 2 por citometria de fluxo, ciclo celular afetado e células com vários núcleos e cinetoplastos até células sem conteúdo de DNA (MAREK et al., 2021; PICCHI-CONSTANTE et al., 2021). Tais observações também pode ser feitas em nossas culturas que apresentam estes grânulos evidentes em seu citoplasma.

Estudos recentes de deleção gênica por CRISPR/Cas9 vêm sendo feitos em *L. braziliensis*, o que mostra como esta técnica é uma ferramenta de trabalho bem estabelecida para este tipo de estudo (ADAUI et al., 2020; ESPADA et al., 2021; SHARMA et al., 2022). No entanto, mais análises serão necessárias para avaliar o que de fato provocou as alterações nas células transfectadas e gerar um dado mais robusto sobre o efeito da deleção destes sobre a biologia do parasito.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados neste trabalho podemos concluir que:

- As análises de transcriptoma dual da infecção mostram que o efeito leishmanicida observado no composto BSF2, em relação a alguma ação à nível de transcrição, está mais relacionado à modulação da célula hospedeira do que a um efeito direto no parasito;
- Genes da via do TNF α são negativamente regulados na infecção de macrófagos por *L. braziliensis* quando tratados com o BSF2;
- A modulação desta via de fato parece ocorrer devido ao tratamento com o BSF2 e não ser uma modulação do hospedeiro para combater a infecção;
- A modulação negativa dos genes *Lif* e *Cxcl2* foi observada tanto nas análises de RNA-Seq como nas análises por qRT-PCR;
- O efeito do composto TH85 não parece estar relacionado à modulação da transcrição na célula hospedeira, ou no parasito que aponte para um possível efeito direto no parasito, corroborando com a atuação direta sobre as LbHDACs;
- No estudo da deleção das LbHDACs por CRISPR/Cas9 até então foi possível observar que as células são morfologicamente alteradas, com a presença de grânulos citoplasmáticos, crescimento alterado e divisão celular dificultada. Porém, estas observações precisam ser melhor investigadas para afirmar que as alterações celulares observadas são provocadas pela deleção dos genes alvo.

7 REFERÊNCIAS

- ADAUI, Vanessa et al. Application of crispr/cas9-based reverse genetics in leishmania braziliensis: Conserved roles for hsp100 and hsp23. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1–24, 2020.
- AFRIN, Farhat; KHAN, Inbesat; HEMEG, Hassan A. Leishmania-host interactions-an epigenetic paradigm. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–9, 2019.
- AGRIPINO, Joice de Melo. **HISTONAS DEACETILASES 1 E 3 DE Leishmania braziliensis (LbHDAC1 e LbHDAC3): AVALIAÇÃO COMO ALVO DE INIBIDORES, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-LbHDAC3**. 2018. 97 f. Universidade Federal de Viçosa, 2018.
- AKBARI, Maryam; ORYAN, Ahmad; HATAM, Gholamreza. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86–90, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.029>>.
- AL-KAMEL, Mohamed Ahmed Naif. Leishmaniasis and Malignancy: A Review and Perspective. **Clinical Skin Cancer**, v. 2, n. 1–2, p. 54–58, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clsc.2017.10.003>>.
- ALLIS, C. David; JENUWEIN, Thomas. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 8, p. 487–500, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.59>>.
- AMERI, Kurosh; HARRIS, Adrian L. Activating transcription factor 4. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 1, p. 14–21, 2008.
- ANDREWS, K et al. HDAC inhibitors in parasitic diseases. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 1, p. 66–77, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/icb.2011.97>>.
- ANDREWS, Simon. **FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data**. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.
- ARAFAT R.K. ET AL. Synthesis, DNA Affinity, and Antiprotozoal Activity of Fused Ring Dicationic Compounds and Their Prodrugs. **J. Med. Chem**, v. 48, n. 14, p. 5480–5488, 2005.
- BASTOS, Matheus Silva et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp leishmania Braziliensis and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, p. 155–159, 2017.
- BENEKE, Tom et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 5, 2017.
- BHATWA, Arshpreet et al. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. February, p. 1–18, 2021.
- BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BRYAN R. LANNING et al. A roadmap to evaluate the proteome-wide selectivity of covalent kinase inhibitors Bryan. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 Set. 2018.

CALLA, Lourdes Fanny Apaza. **Busca de inibidores de histonas deacetilases com atividade leishmanicida na infecção por ma Leishmania braziliensis**. 2018. 127 f. Universidade Federal de Viçosa, 2018.

CAMPAGNARO, Gustavo D et al. Arginine methyltransferases as regulators of RNA-binding protein activities in pathogenic kinetoplastids. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. 2296– 889X, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.692668>>.

CASTELLUCCI, Léa et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: Affect case-control and family-based study. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2010.

CHUA, Ming Jang et al. Effect of clinically approved HDAC inhibitors on Plasmodium, Leishmania and Schistosoma parasite growth. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 42–50, 2017.

CROKEN, Matthew M.; NARDELLI, Sheila C.; KIM, Kami. Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 5, p. 202–213, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.02.009>>.

DA SILVA, Josefa B. et al. Induction of TNF-alfa and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic Leptospira. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 4, p. 206–216, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2012.01.002>>.

DA SILVA, Walmir et al. ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 14, p. 213–226, 2021.

DE OLIVEIRA, Camila I.; BRODSKY, Claudia I. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.

DE PABLOS, L. M.; FERREIRA, T. R.; WALRAD, P. B. Developmental differentiation in Leishmania lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, n. Figure 1, p. 82–89, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.004>>.

DE PAIVA, Rita Marcia Cardoso et al. Amastin Knockdown in Leishmania braziliensis Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2015.

DI BELLO, Elisabetta et al. Effects of Structurally Different HDAC Inhibitors against Trypanosoma cruzi , Leishmania , and Schistosoma mansoni . **ACS Infectious Diseases**, 2022.

DUNCAN, Samuel M.; JONES, Nathaniel G.; MOTTRAM, Jeremy C. Recent advances in Leishmania reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 216, n. June, p. 30–38, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.06.005>>.

ENGEL, Jessica A. et al. Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against Plasmodium and Trypanosoma parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 3, p. 117–126, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.05.004>>.

- ESPADA, Caroline R. et al. Effective Genome Editing in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Stably Expressing Cas9 and T7 RNA Polymerase. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. November, p. 1–13, 2021.
- FALCÃO, Sarah A.C. et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2015.
- FERNANDES, Maria Cecilia et al. Dual Transcriptome Profiling of *Leishmania*-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. **mBio**, v. 7, n. 3, p. 1–16, 2016.
- FIETTO, J.L.R. et al. **Histonas deacetilases recombinantes de *Leishmania* spp., Kit diagnóstico e usos.** . [S.l.: s.n.] , 2022
- FIGUEIREDO, Amanda Braga de; SOUZA-TESTASICCA, Miriam Conceicao; AFONSO, Luis Carlos Crocco. Purinergic signaling and infection by *Leishmania*: A new approach to evasion of the immune response [figure presented]. **Biomedical Journal**, v. 39, n. 4, p. 244–250, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2016.08.004>>.
- FIORAVANTI, Rossella et al. Targeting histone acetylation/deacetylation in parasites: an update (2017–2020). **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 57, p. 65–74, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.05.008>>.
- FUHRMANN, Jakob; THOMPSON, Paul R. Protein Arginine Methylation and Citrullination in Epigenetic Regulation. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 654–668, 2016.
- FUSAKIO, Michael E. et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 9, p. 1536–1551, 2016.
- FYODOROV, Dmitry V. et al. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm.2017.94>>.
- GEIGER, Anne et al. Escaping deleterious immune response in their hosts: Lessons from trypanosomatids. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–21, 2016.
- GOTO, Hiro; LAULETTA LINDOSO, José Angelo. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.
- GREGORY, David J. et al. A novel form of NF- κ B is induced by *Leishmania* infection: Involvement in macrophage gene expression. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 1071–1081, 2008.
- GUPTA, Anand Kumar et al. *Leishmania donovani* inhibits inflammasome-dependent macrophage activation by exploiting the negative regulatory proteins A20 and UCP2. **FASEB Journal**, v. 31, n. 11, p. 5087–5101, 2017.
- GUPTA, Gaurav; OGHUMU, Steve; SATOSKAR, Abhay R. **Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis.** [S.l.]: Elsevier, 2013. v. 82. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>>.
- HANDLER, Marc Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.08.051>>.
- HEIMBURG, Tino et al. Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting

HDAC8 from *Schistosoma mansoni* for the Treatment of Schistosomiasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2423–2435, 24 Mar. 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b01478>>.

HERRERA, Giovanni et al. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. **Scientific Data**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2020.

HU, Laixing et al. Synthesis and activity of azaterphenyl diamidines against *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Plasmodium falciparum*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p. 6651–6658, 2009.

HUNT, Liam et al. Alterations in the expression of leukemia inhibitory factor following exercise: comparisons between wild-type and mdx muscles. **PLOS Currents Muscular Dystrophy**, v. Edition 1, 2011.

HWANG, Jee Won et al. Protein arginine methyltransferases: promising targets for cancer therapy. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 53, n. 5, p. 788–808, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-021-00613-y>>.

IANTORNO, Stefano A. et al. Gene Expression in *Leishmania* Is Regulated Predominantly by Gene Dosage. **mBio**, v. 8, n. 5, p. 1–20, 2017.

INGRAM, Alexandra K.; HORN, David. Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: Two are essential and another is required for normal cell cycle progression. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 89–97, 2002.

JARAMILLO, Maritza et al. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 4, p. 331–341, 2011.

KAMHAWI, Shaden; SERAFIM, Tiago D. *Leishmania*: A Maestro in Epigenetic Manipulation of Macrophage Inflammasomes. **Trends in Parasitology**, v. xx, n. xx, p. 1–3, 2020.

KANISKAN, H. Ümit; MARTINI, Michael L.; JIN, Jian. Inhibitors of Protein Methyltransferases and Demethylases. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 3, p. 989–1068, 2018.

KEVRIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–93, Jul. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733863515000315>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 4, p. 596–612, 2009.

LAFFITTE, Marie-Claude N. et al. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**, v. 5, p. 2350, 2016.

LAMOTTE, Suzanne et al. The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–14, 2017.

LANGMEAD, Ben; SALZBERG, Steven L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

LECOEUR, Hervé et al. Targeting Macrophage Histone H3 Modification as a *Leishmania* Strategy to Dampen the NF- κ B/NLRP3-Mediated Inflammatory Response. **Cell Reports**, v.

30, n. 6, p. 1870- 1882.e4, 2020.

LORENZON, Lucas et al. Functional Study of *Leishmania braziliensis* Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs) Reveals That PRMT1 and PRMT5 Are Required for Macrophage Infection. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 516–532, 2022.

LOTHROP, Adam P.; TORRES, Matthew P.; FUCHS, Stephen M. Deciphering post-translational modification codes. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1247–1257, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.047>>.

MA, Xujun; EZZELDIN, Hany H.; DIASIO, Robert B. Histone deacetylase inhibitors: Current status and overview of recent clinical trials. **Drugs**, v. 69, n. 14, p. 1911–1934, 2009.

MAKKAR, Rashita; BEHL, Tapan; ARORA, Sandeep. Role of HDAC inhibitors in diabetes mellitus. **Current Research in Translational Medicine**, v. 68, n. 2, p. 45–50, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.08.001>>.

MARAN, Suellen Rodrigues et al. Protein acetylation in the critical biological processes in protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 9, p. 815–830, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.04.008>>.

MAREK, Martin et al. Species-selective targeting of pathogens revealed by the atypical structure and active site of *Trypanosoma cruzi* histone deacetylase DAC2. **Cell Reports**, v. 37, n. 12, 2021.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, 2013.

MARTINEZ-CALVILLO, Santiago et al. Epigenetic Regulation of Transcription in Trypanosomatid Protozoa. **Current Genomics**, v. 19, n. 2, p. 140–149, 12 Jan. 2018. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/155497/article>>.

MARTÍNEZ-CALVILLO, Santiago et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, María et al. *Leishmania* Hijacks myeloid cells for immune escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–16, 2018.

MEIER, Anna; ERLER, Holger; BEITZ, Eric. Targeting channels and transporters in protozoan parasite infections. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. MAR, 2018.

MELESINA, Jelena et al. Homology modeling of parasite histone deacetylases to guide the structure-based design of selective inhibitors. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 62, p. 342–361, 2015.

METCALFE, S. M. LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic. **Genes and Immunity**, v. 12, n. 3, p. 157–168, 2011.

MUKHERJEE, Parnika; HEITLINGER, Emanuel. Dual RNA-Seq meta-analysis in Plasmodium infection. **bioRxiv**, p. 576116, 2019. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/node/246265.full>>.

NASCIMENTO, Msl. Papel de linfócitos Th17 durante a infecção experimental por *Leishmania infantum/chagasi*. p. 119, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17147/tde-15032012-162942/>>.

NAVAS, Adriana et al. Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 7, p. 2872–2880, 2014.

NAWAZ, Mohsin et al. Modifications of histones in parasites as drug targets. **Veterinary Parasitology**, v. 278, n. October 2019, 2020.

NING, Li et al. The critical roles of histone deacetylase 3 in the pathogenesis of solid organ injury. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 8, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-021-04019-6>>.

NOVAIS, Fernanda O. et al. Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, 2009.

OUAISSI, Mehdi; OUAISSI, Ali. Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2006, n. class III, p. 1–10, 2006.

OUAISSI, Mehdi; OUAISSI, Ali; G, De Chirurgie Digestive. Histone Deacetylase Enzymes as Potential Drug Targets in Cancer and Parasitic Diseases. v. 2006, n. class III, p. 1–10, 2006.

OVALLE-BRACHO, Clemencia et al. Changes in macrophage gene expression associated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–13, 2015.

PACE, David. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10–S18, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016344531400228X>>.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, PAHO. **Leishmaniasis in the Americas: Treatment recommendations**. PAHO ed. Washington, D.C: [s.n.], 2018.

PASYUKOVA, Elena G.; VAISERMAN, Alexander M. HDAC inhibitors: A new promising drug class in anti-aging research. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 166, n. March, p. 6–15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.008>>.

PATRICK, Donald A. et al. Synthesis and antiprotozoal activities of benzyl phenyl ether diamidine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 310–324, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.033>>.

PEACOCK, Christopher S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.

PEREIRA, Bernardo Acácio Santini; BRITTO, Constança; ALVES, Carlos Roberto. Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 2, p. 101–108, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2011.11.004>>.

PICCHI-CONSTANTE, Gisele Fernanda Assine et al. Metacyclogenesis defects and gene expression hallmarks of histone deacetylase 4-deficient *Trypanosoma cruzi* cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-01080-1>>.

PICCHI-CONSTANTE, Gisele Fernanda Assine et al. Metacyclogenesis defects and gene expression hallmarks of histone deacetylase 4-deficient *Trypanosoma cruzi* cells Enhanced Reader. **Nature Scientific Reports**, v. 11, n. 21671, 2021.

- PIETRZAK, Julita et al. EP300-HDAC1-SWI/SNF functional unit defines transcription of some DNA repair enzymes during differentiation of human macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1862, n. 2, p. 198–208, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.10.019>>.
- PODINOVSKAIA, Maria; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.
- POLARI, Ludmila P. et al. Leishmania braziliensis infection enhances toll-like receptors 2 and 4 expression and triggers TNF- α and IL-10 production in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, 2019.
- POMPEU, M.L. et al. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by Leishmania amazonensis. A quantitative approach. **Acta Tropica**, v. 48, n. 0001-706X, p. 185–193, 1991. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7621>>.
- PRASANNA, Pragya et al. Cloning, purification, and homology modeling of Histone deacetylase in Leishmania donovani. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, n. July 2020, p. 104738, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104738>>.
- PROBST, Christian M. et al. A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to Leishmania amazonensis infection. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1–12, 2012.
- REKOWSKI, Margarete von Wantoch; GIANNIS, Athanassios. Histone acetylation modulation by small molecules: A chemical approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10–12, p. 760–767, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.006>>.
- REN, Shengwei et al. Selection of housekeeping genes for use in quantitative reverse transcription PCR assays on the murine cornea. **Molecular Vision**, v. 16, n. June, p. 1076–1086, 2010.
- RINGNÉR, Markus. What is principal component analysis? **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 303–304, 2008.
- ROCHA, F. Janaina Soares et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of Leishmania (Viannia) braziliensis in mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3823–3832, 2007.
- ROTHBART, Scott B.; STRAHL, Brian D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 8, p. 627–643, 2014.
- ROY, Koushik et al. Class II MHC/Peptide Interaction in Leishmania donovani Infection: Implications in Vaccine Design. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 12, p. 5873–5880, 2014.
- RUIJTER, Annemieke J.M. de et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v. 370, n. 3, p. 737–749, 2003. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj20021321>>.
- SABIO, Guadalupe; DAVIS, Roger J. TNF and MAP kinase signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 26, n. 3, p. 237–245, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

- SAKAI, Yusuke; UCHIDA, Kazuyuki; NAKAYAMA, Hiroyuki. A20 and ABIN-3 possibly promote regression of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)-induced granuloma by interacting with an NF-kappa B signaling protein, TAK-1. **Inflammation Research**, v. 61, n. 3, p. 245–253, 2012.
- SAKSOUK, Nehmé et al. Histone-Modifying Complexes Regulate Gene Expression Pertinent to the Differentiation of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 23, p. 10301–10314, 2005.
- SASIDHARAN, Santanu; SAUDAGAR, Prakash. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 2021.
- SAUER, B. et al. Synthesis, biological characterisation and structure activity relationships of aromatic bisamidines active against *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 22–40, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.041>>.
- SCHOLTE, Larissa L.S. et al. Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 175–188, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.011>>.
- SCOTT, Monisha G. et al. An α -Helical Cationic Antimicrobial Peptide Selectively Modulates Macrophage Responses to Lipopolysaccharide and Directly Alters Macrophage Gene Expression. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 6, p. 3358–3365, 2000.
- SETO, Edward; YOSHIDA, Minoru. Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 4, p. 1–26, 2014.
- SHARMA, Rohit et al. Targeted Deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* Using CRISPR-Cas9-Based Editing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. February, p. 1–13, 2022.
- SHI, Yang. Histone lysine demethylases: Emerging roles in development, physiology and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 11, p. 829–833, 2007.
- SILVA, C. F. et al. Activity of «reversed» diamidines against *Trypanosoma cruzi* «in vitro». **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 12, p. 1939–1946, 2007.
- SIMOBEN, Conrad V. et al. A novel class of *Schistosoma mansoni* histone deacetylase 8 (HDAC8) inhibitors identified by structure-based virtual screening and in vitro testing. **Molecules**, v. 23, n. 3, 2018.
- SIQUEIRA, Caroline de Moraes de. **Caracterização da histona desacetilase 2 (TgHDAC2) de *Toxoplasma gondii***. 2018. Fiocruz-PR, 2018.
- SIVIERO DO VALE, Everton Carlos; FURTADO, Tancredo. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: A historical review related to the origin, expansion and etiology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421–428, 2005.
- SOUZA, Luciana Ângelo de. **AVALIAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS EM *Leishmania braziliensis* E NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS**. 2016. 87 f. Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- _____. **ESTUDOS BIOQUÍMICOS DO EFEITO LEISHMANICIDA DE**

INIBIDORES DE ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS EM *Leishmania braziliensis* IN VITRO E IN VIVO EM MODELO MURINO. 2022. Universidade Federal de Viçosa, 2022.

_____. Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against *Leishmania braziliensis*, the main causative agent of new world tegumentary leishmaniasis. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, n. May, p. 114191, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114191>>.

TEAM, R Studio. **RStudio: Integrated Development for R.** . Boston, MA: RStudio, Inc. Disponível em: <<http://www.rstudio.com>>. , 2015

THIEL, Gerald; EKICI, Myriam; RÖSSLER, Oliver G. RE-1 silencing transcription factor (REST): A regulator of neuronal development and neuronal/endocrine function. **Cell and Tissue Research**, v. 359, n. 1, p. 99–109, 2015.

THUITA, J. K. et al. Efficacy of the diamidine DB75 and its prodrug DB289, against murine models of human African trypanosomiasis. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 6–10, 2008.

TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda et al. **Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons.** **Frontiers in immunology.** [S.l.]: NLM (Medline). , 2018

TRAPNELL, Cole et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 3, p. 562–578, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.016>>.

TRAPNELL, Cole; PACHTER, Lior; SALZBERG, Steven L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 2009.

WANG, Qi et al. Targeting Lysine Deacetylases (KDACs) in Parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 2015.

WATSON, James D. et al. **Molecular biology of the gene.** 7th editio ed. [S.l.]: Pearson Education, 2014.

WHO. **Leishmaniasis.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis. Fact sheet, 2017.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

WYSOCKA, Joanna; ALLIS, C. David; COONROD, Scott. Histone arginine methylation and its dynamic regulation Joanna. **Frontiers in Bioscience**, n. 11, p. 344–55, 2006.

XAUS, Jordi et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3823–3831, 2000.

YAN, L. et al. Diamidine Compounds for Selective Inhibition of Protein Arginine Methyltransferase 1. **J. Med. Chem.**, v. 57, p. 2611–2622, 2014.

YOON, Somy; EOM, Gwang Hyeon. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 1, p. 1, 2016.

ZHANG, Chunyan et al. ATF4 is directly recruited by TLR4 signaling and positively regulates TLR4-triggered cytokine production in human monocytes. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 10, n. 1, p. 84–94, 2013.

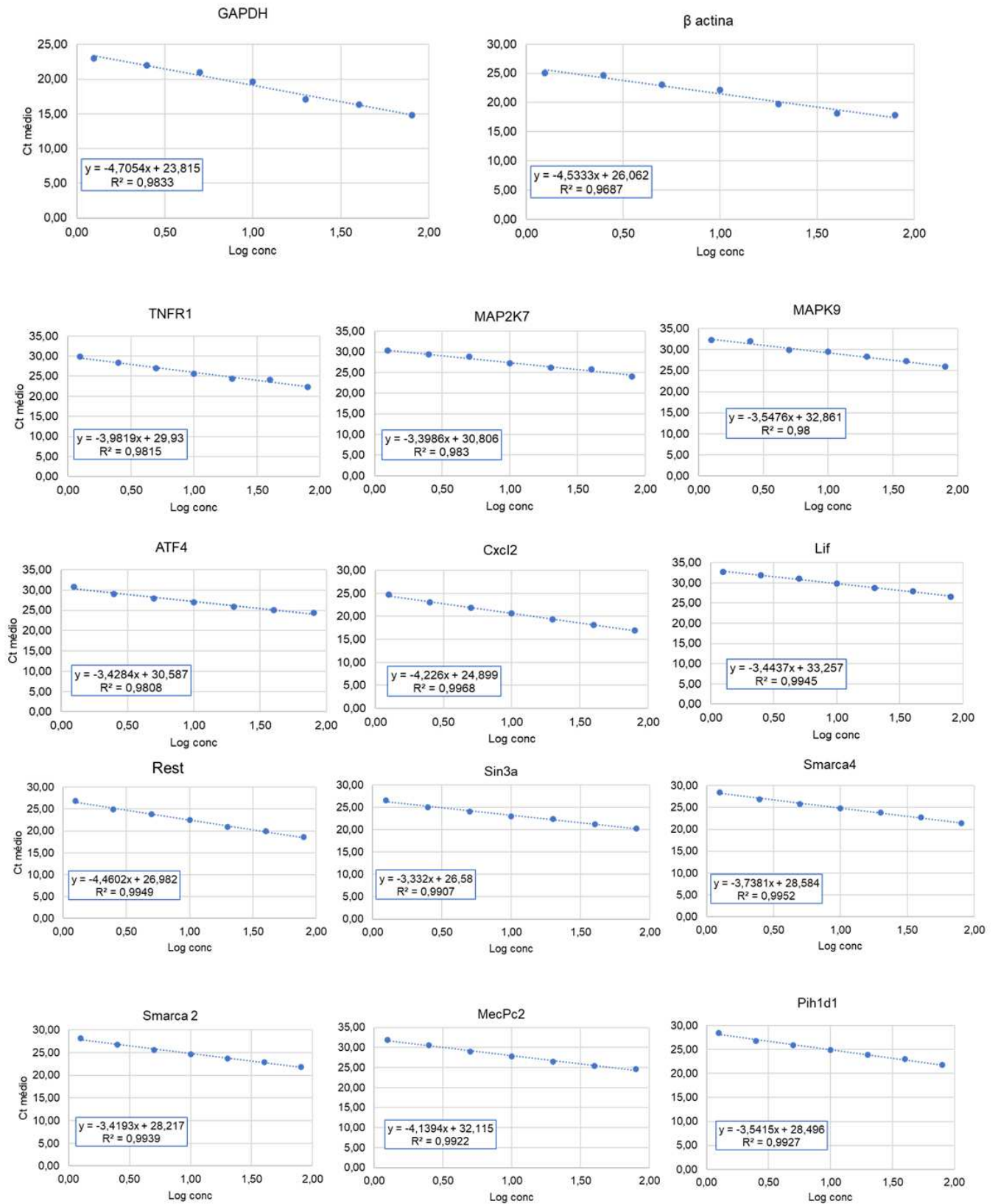
ZHANG, Jing et al. Discovery of decamidine as a new and potent PRMT1 inhibitor. **MedChemComm**, v. 8, n. 2, p. 440–444, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6MD00573J>>.

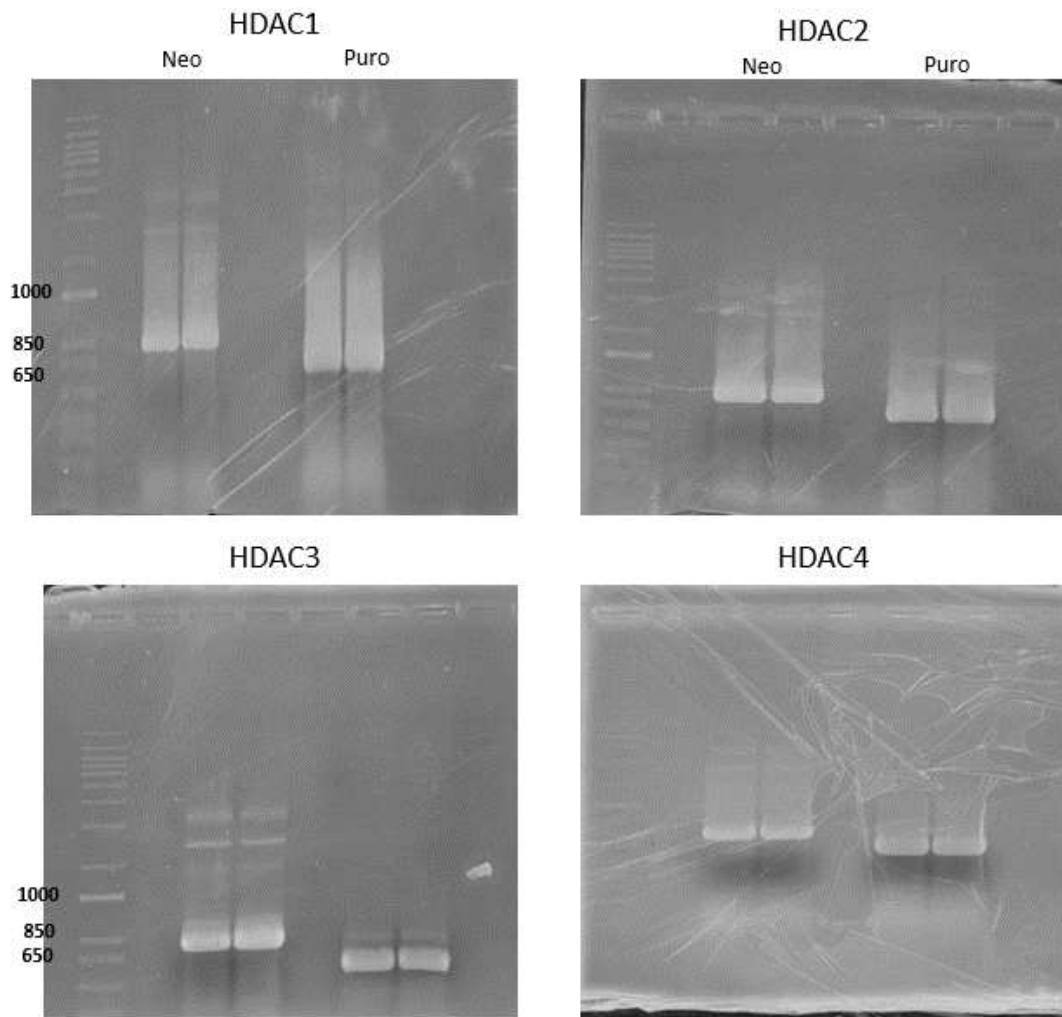
_____. Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 49, n. 5, p. 3963–3971, 2019.

ZHOU, Jun; ZHANG, Ming; ATHERTON, Sally S. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in murine cytomegalovirus retinitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 48, n. 4, p. 1691–1700, 2007.

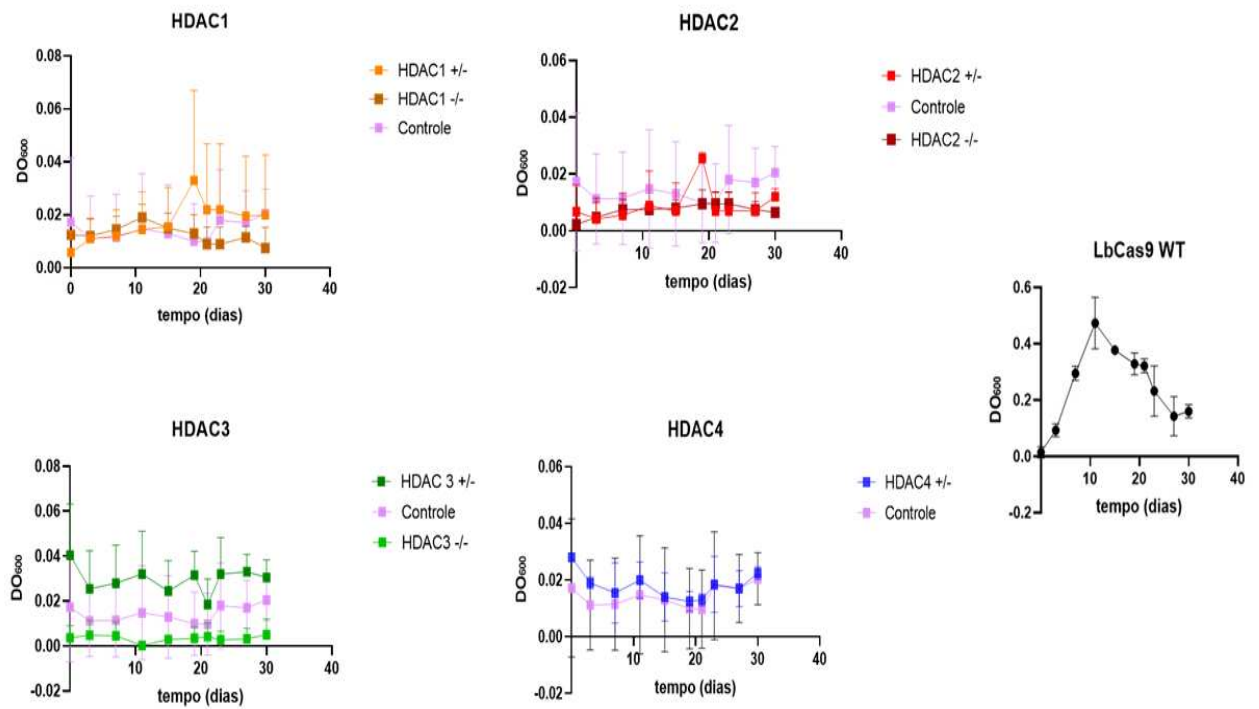
ZHU, Min et al. Studies Using Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Knockout Mice and a LIF Adenoviral Vector Demonstrate a Key Anti-Inflammatory Role for This Cytokine in Cutaneous Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 2049–2054, 2001.

APÊNDICE A – Curvas-padrão dos genes de macrófagos analisados por qRT-PCR



APÊNDICE B – Amplificação dos cassetes de DNA doador – Neo 0,8 kb e Puro 0,6 kb

APÊNDICE C – Curva de crescimento por DO_{600}



As culturas de células transfectadas foram acompanhadas por 30 dias através da análise de densidade ótica (DO_{600}), em placa de 24 poços, para verificação do crescimento celular em comparação a uma cultura de LbCas9 WT.

APÊNDICE D – PATENTE: Aplicação das HDACs de *L. braziliensis* no diagnóstico de leishmaniose

Inventores: Juliana Lopes Rangel Fietto, Joice de Melo Agripino, Anna Cláudia Alves de Souza, Matheus Silva e Bastos, Raissa Barbosa de Castro, Luciana Ângelo de Souza, Raphael de Souza Vasconcellos, Maria Terezinha Bahia, George Luiz Lins Machado Coelho e Gustavo Costa Bressan.



13/07/2022 870220061854
17:05
29409161950806081

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 013918 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25044455000198

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade: Vicosá

Estado: MG

CEP: 36570-900

País: Brasil

Telefone: (31) 3612 2334

Fax:

Email: propriedadeintelectual@ufv.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 13/07/2022 às 17:05, Petição 870220061854

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 23070659000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Diogo de Vasconcelos

Cidade: Ouro Preto

Estado: MG

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: nite@ufop.edu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Histonas deacetilases recombinantes de *Leishmania* spp., Kit diagnóstico e usos

Resumo: A presente invenção refere-se às proteínas recombinantes pertencentes à classe das histonas deacetilases (HDACs) de cinco espécies de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana*). A presente invenção refere-se também ao Kit diagnóstico e ao uso das proteínas recombinantes e de suas partes imunogênicas, mapeadas nesta invenção, para aplicação em diagnóstico em amostras biológicas de humanos ou animais, por exemplo por ensaio imunoenzimático tipo ELISA ou teste rápido; prognóstico, produção de kits de diagnóstico imunológico, para a busca por anticorpos anti-histonas deacetilases, ou contra as partes imunogênicas destas proteínas mapeadas nesta invenção, e vacinas contra a leishmaniose tegumentar e visceral, pois há reatividade cruzada com ambas as doenças. Os objetos da presente invenção são de potencial aplicação nas indústrias farmacêuticas e de saúde animal para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar e visceral, controle epidemiológico e avaliação de vacinas experimentais e comerciais, e podem ser utilizados para a produção de kits de diagnóstico sorológico rápido em indivíduos ou cães, infectados e/ou vacinados, contra a leishmaniose tegumentar e/ou visceral na busca por anticorpos anti-HDACs.

Figura a publicar: 18

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 13/07/2022 às 17:05, Petição 870220061854

RELATÓRIO DESCRITIVO

Histonas deacetilases recombinantes de *Leishmania spp.*, Kit diagnóstico e usos

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

1. A presente invenção refere-se às proteínas recombinantes pertencentes à classe das histonas deacetilases (HDACs) de cinco espécies de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana*).
2. A presente invenção refere-se também ao kit diagnóstico e ao uso das proteínas recombinantes e de suas partes imunogênicas, mapeadas nesta invenção, para aplicação em diagnóstico em amostras biológicas de humanos ou animais, por exemplo, por ensaio imunoenzimático tipo ELISA ou teste rápido; prognóstico, produção de kits de diagnóstico imunológico, para a busca por anticorpos anti-histonas deacetilases, ou contra as partes imunogênicas destas proteínas mapeadas nesta invenção, e vacinas contra a leishmaniose tegumentar e visceral, pois há reatividade cruzada com ambas as doenças.
3. Os objetos da presente invenção são de potencial aplicação nas indústrias farmacêuticas e de saúde animal para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar e visceral, controle epidemiológico e avaliação de vacinas experimentais e comerciais, e podem ser utilizados para a produção de kits de diagnóstico sorológico rápido em indivíduos ou cães, infectados e/ou vacinados, contra a leishmaniose tegumentar e/ou visceral na busca por anticorpos anti-HDACs.

ESTADO DA TÉCNICA

4. As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias causadas por protozoários patogênicos do gênero *Leishmania*. As leishmanioses podem ser divididas em dois grupos principais: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. Mais de 20 espécies patogênicas de parasitos do gênero *Leishmania* foram identificadas, sendo transmitidas por fêmeas de flebotomíneos infectadas (BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, 2018). Diferentes espécies de *Leishmania* podem causar diversas manifestações clínicas que juntamente com outros fatores, como o vetor flebotomíneo envolvido e o tipo de resposta imune do hospedeiro irão determinar o tipo e a gravidade da doença (PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10–S18, 2014).

5. A leishmaniose tegumentar (LT) compreende três manifestações clínicas diferentes: a leishmaniose cutânea, cutânea difusa e mucocutânea, que são causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. A leishmaniose cutânea (LC) é provocada principalmente pela *Leishmania braziliensis*, espécie com ampla distribuição geográfica nas Américas, sendo caracterizada como a forma mais grave de LC, com formação de nódulos subcutâneos e comprometimento de linfonodos, sendo o tratamento essencial para a cura da doença (HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015).

6. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave das leishmanioses, por comprometer baço, fígado, provocar anemia, febre e se não tratada é fatal. A principal espécie que provoca a LV nas Américas é *L. infantum chagasi* (PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10–S18, 2014).

7. As leishmanioses tegumentar e visceral são doenças de grande importância para a saúde pública mundial; o Brasil é um dos países do mundo onde mais ocorrem as leishmanioses, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Apesar de ser uma doença de notificação compulsória, acredita-se que a maioria dos casos de leishmaniose não sejam registrados por falta de informação, controle da doença e acesso ao tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of leishmaniasis**, 2007).

8. O ciclo de transmissão das leishmanioses se inicia quando um vetor flebotomíneo infectado se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado e transmite o parasito, infectando este hospedeiro. Após a transmissão dos parasitos, estes serão capturados por células do sistema imune e no interior destas células, os parasitos sofrem uma diferenciação para uma forma parasitária mais resistente e se replicam a ponto de infectar outras células imunes e estabelecerem a infecção no hospedeiro. O ciclo se completa quando um novo flebotomíneo não infectado, se infecta durante o repasto sanguíneo a partir de um hospedeiro vertebrado previamente infectado (ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recente progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017).

9. Diversos fatores são relacionados ao aumento do número de casos de leishmanioses em todo o mundo, tais como mudanças climáticas, desmatamento, urbanização e a migração de refugiados de áreas de conflito (BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, 2018). Entretanto, no meio urbano, o ciclo da doença possui um importante hospedeiro do parasito, o cão. Além de ser um animal doméstico, o cão apresenta um polimorfismo clínico, passando por um longo período assintomático (CAVALCANTI, A. *et al.* Canine cutaneous leishmaniasis caused by neotropical *Leishmania infantum* despite of systemic disease: A case report. **Parasitology International**, v. 61, n. 4,

p. 738–740, 2012). Dessa forma, a leishmaniose cutânea canina (LCC) e a leishmaniose visceral canina (LVC) são grandes problemas do ponto de vista veterinário e também de saúde pública, pois cães infectados favorecem a transmissão do parasito a humanos (SASANI, F. *et al.* Canine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 40, n. 1, p. 57–60, 2016).

10. No Brasil, parte da estratégia de controle da leishmaniose visceral é baseada na prática da eutanásia de animais soropositivos. No entanto, este sacrifício em massa não se comprovou eficaz no controle da doença, devido a atrasos entre a sorologia e a eutanásia e à baixa sensibilidade dos testes sorológicos para detectar os animais infectados assintomáticos. Os métodos de diagnóstico atuais recomendados pelo Ministério da Saúde são o teste rápido DPP® (Bio-Manguinhos) para rastreio dos animais infectados, baseado no antígeno quimérico rK28, e o ensaio imuno enzimático (EIE / Bio-Manguinhos) para confirmação da infecção, que utiliza antígenos totais de *L. major* (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde, 3ª. ed., Brasília, 2019). No entanto, esses testes possuem importantes limitações, o que foi mostrado em um recente artigo de revisão, em que DPP (Bio-Manguinhos) apresentou sensibilidade de 21,74% [intervalo de 95% confiança (CI) 13,64% a 32,82%] e EIE (Bio-Manguinhos) apresentou sensibilidade igual a 11,59% (intervalo de 95% de confiança 5,9% a 21,25%) (TEIXEIRA, A. I. P. *et al.* Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a challenge for current and future tests. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 0, 2019). Essas limitações ilustram a necessidade de desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico da LVC.

11. Em análise do estado da técnica encontrou-se diversos documentos referentes a antígenos recombinantes de *Leishmania* aplicados ao diagnóstico e outras formulações terapêuticas para a leishmaniose.

12. A dissertação intitulada "Busca de inibidores de histonas deacetilases com atividade leishmanicida na infecção de macrófagos por *Leishmania braziliensis*", não retira a novidade do presente pedido de patente por tratar de compostos com potencial ação de inibição das HDACs de *L. braziliensis* e não do uso destas recombinantes.

13. O documento de patente BR1020200155911 intitulado "Proteína quimérica recombinante, kit e método para diagnóstico de leishmaniose tegumentar e usos", se refere a uma proteína quimérica cuja sequência é diferente das sequências recombinantes deste pedido de patente.

14. O documento de patente BR1020200093665 intitulado "Kit e método ELISA para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral e cutânea humana e leishmaniose visceral canina utilizando novo antígeno peptídeo sintético PSLi409" que foi produzido a partir de uma sequência da proteína recombinante sintética cinesina de *L. braziliensis*, que pertence a uma outra classe de proteínas motoras, diferente da classe das histonas deacetilases.

15. O documento de patente BR1320170281441 intitulado "Proteína recombinante, kit para diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina, composição vacinal contra leishmaniose e usos" também se trata da proteína recombinante cinesina, diferindo dos objetos deste pedido de patente.

16. Outro documento de patente BR1020130336270, intitulado "Peptídeos sintéticos, método e kit para imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina e das leishmanioses tegumentar e visceral humana", trata da síntese de peptídeos que diferem das sequências de proteínas recombinantes abordadas neste presente pedido de patente.

17. O documento de patente BR1020200084607 "Kit, método para diagnóstico de leishmaniose visceral e uso" trata de um kit desenvolvido a partir de uma proteína hipotética de *L. infantum*, que difere das proteínas

recombinantes envolvidas neste pedido de patente. Outros documentos relacionados, BR1020190233540 "Proteína recombinante, método e kit para diagnóstico da leishmaniose visceral e uso" e BR1020180731912 "Proteína recombinante, método e kit para diagnóstico da leishmaniose visceral" tratam do uso de uma proteína recombinante que também se difere das proteínas deste pedido de patente.

18. O documento de patente BR1020190042125, intitulado "Proteína quimérica recombinante multiepítipo e suas aplicações para leishmanioses" trata de uma proteína sintética produzida a partir de partes imunogênicas de proteínas de diferentes espécies de *Leishmania*, diferente das proteínas recombinantes deste presente pedido de patente. Outros documentos de patentes relacionados, BR1020180708074 intitulado "Proteína quimérica recombinante, vacina contra a leishmaniose tegumentar e visceral e usos"; BR1020170256219 "Proteína quimérica recombinante, vacina contra leishmanioses e uso"; BR1020150161620 "Proteína recombinante multiepítipo e seu uso para o diagnóstico e tratamento de leishmaniose" e BR1020140313311 "Proteína multiepítipo recombinante, seu processo de obtenção e suas aplicações relacionadas à leishmaniose" também tratam de proteínas quimeras sintetizadas, a partir de proteínas distintas das proteínas recombinantes deste presente pedido de patente.

19. O documento de patente BR102018017162, intitulado "Proteína recombinante, processo de produção da mesma, uso da proteína na preparação de um imunógeno contra leishmaniose visceral canina ou humana e uso da proteína em teste de detecção ou kit de detecção para detectar leishmaniose visceral assintomática ou sub-clínica em uma amostra biológica", trata de uma proteína recombinante diferente das proteínas histonas deacetilases recombinantes, abordadas neste presente pedido de patente.

20. Os documentos de patentes BR1020170227448 "Antígeno recombinante de *Leishmania braziliensis* e sequência de nucleotídeos que o codifica"; BR1020170051358 "Método, kit para diagnóstico de leishmanioses e uso" e BR1020130319813 "Proteína recombinante de *Leishmania* e uso em vacina contra leishmaniose" tratam de outras proteínas recombinantes diferentes das proteínas abordadas neste presente pedido de patente. Assim como a patente BR1020120324997 "Processo de produção e uso da proteína rk39-KDDR e kit para diagnóstico da leishmaniose" e o documento de patente WO1994016331 "Diagnosis of leishmaniasis" tratam do uso da proteína recombinante rk39, que não se relaciona às HDACs deste presente pedido de patente.

21. O documento de patente WO2001079276, intitulado "*Leishmania* antigens for use in the therapy and diagnosis of leishmaniasis" trata de outra proteína recombinante diferente das proteínas abordadas neste presente pedido de patente.

22. O documento de patente BR102016005090 de título "Peptídeos, método e kit para imunodiagnóstico de leishmaniose tegumentar e uso", refere-se a um método de diagnóstico de leishmaniose tegumentar, envolvendo a metalopeptidase da família M3 recombinante e outras sequências de peptídeos não especificadas, porém sem relação com os objetos do presente pedido de patente, as proteínas HDACs de *Leishmania*.

23. O documento WO2011153602 intitulado "Recombinant ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase used for obtaining diagnostic kit for detecting antibodies against leishmaniasis, is homologous natural proteins", refere-se à família das E-NTPDases de *Leishmania* e suas diversas aplicações para a terapia, desenvolvimento de produtos a serem empregados na prevenção e diagnóstico das leishmanioses. Essa

família de proteínas não possui relação com a família de HDACs de *Leishmania*, objeto de pedido do atual pedido de patente.

24. O documento de patente BR102015017724, intitulado "Peptídeos miméticos de *Leishmania spp.*, processo para sua obtenção e aplicações", trata de peptídeos diferentes das proteínas recombinantes tratadas neste presente pedido de patente.

25. O documento WO2005044301 intitulado "Use of at least one of the histones H2A, H2B, H3 or H4 for preparing a medicament, preferably a vaccine for treating, diagnosing, or preventing a parasitic disease, e.g., leishmaniasis or malaria" se refere ao uso das proteínas histonas e não das proteínas histonas deacetilases recombinantes. As histonas são proteínas estruturais nas quais o DNA se enovela pra fazer a estrutura dos nucleossomos. As histonas deacetilases (HDACs) são enzimas de outra família proteica que têm a função de deacetilar as caudas das histonas regulando a interação do DNA com os nucleossomos. Desta forma, este documento não retira a atividade inventiva deste pedido de patente.

26. O documento de patente WO1995030006, intitulado "*Leishmania major* protein, nucleic acid coding therefor, and uses thereof" trata de outra proteína diferente das proteínas deste pedido de patente.

27. Os documentos BR132012033559, intitulado "Peptídeos poliméricos, processo de obtenção e uso para imunodiagnóstico de leishmaniose"; BR1020140041079, "Método e kit para diagnóstico das leishmanioses utilizando peptídeos sintéticos" e BR102015031862 "Peptídeos sintéticos, método e kit para diagnóstico da leishmaniose visceral humana, e uso" tratam do uso de peptídeos sintéticos que não se relacionam com as HDACs recombinantes deste pedido de patente.

28. O documento de patente WO8901045 "Non-cross-reacting *Leishmania* antigens" trata do preparo e uso de antígenos a partir de cultura prévia do parasito, diferindo deste presente pedido de patente.

Outro documento de patente, WO2015097654 "Synthetic peptide used for diagnosing canine visceral leishmaniasis, cutaneous and human visceral leishmaniasis, comprises amino acid sequence" trata de peptídeos que não se relacionam com as proteínas recombinantes deste presente pedido de patente.

29. Os documentos de patente WO2017136480 "Increasing satellite cell proliferation, by contacting satellite cell with compound e.g. inhibitors, G protein coupled receptor modulators, histone deacetylases modulators, epigenetic modifiers, ion channel modulators and their combinations" e WO2007048830 "Screening histone deacetylases (HDAC) 1 or 2 inhibitor by incubating HDAC enzyme with a protein that contains SANT and ELM2 regions, and with potential HDAC inhibitor, and determining effect of HDAC inhibitor on enzyme activity" tratam, respectivamente, de moduladores de HDACs e de inibidores das mesma em outro contexto, não relacionado às leishmanioses, como este presente pedido de patente.

30. O documento de patente BR1020150105193 intitulado "Kit para diagnóstico sorológico das leishmanioses, baseado em imunoproteômica e uso" trata de proteínas isoladas do parasita *Leishmania braziliensis* para aplicação no diagnóstico sorológico, não tratando das proteínas recombinantes abordadas neste presente pedido de patente.

31. Os documentos de patente US2009291099 "Novel fusion polypeptide useful for stimulating immune response and including protective immunity against leishmaniasis in mammal, and detecting Leishmania infection in sample, comprises immunogenic portion of Leishmania antigens" e WO200179276 "*Leishmania* antigens for use in the therapy and diagnosis of leishmaniasis" tratam de peptídeos oriundos de proteínas que diferem das proteínas recombinantes, objetos deste presente pedido de patente.

10/32

32. O documento de patente CA2248684 "Immunity to Trypanosomatids species" trata das histonas de tripanossomatídeos, mas não da classe das enzimas histonas deacetilases, HDACs, como este presente pedido de patente.

33. Outro documento de patente encontrado, WO2014091463 "Method for producing *Leishmania* recombinant proteins and use in a diagnostic kit and vaccine against leishmaniasis", aborda proteínas diferentes das proteínas deste presente pedido de patente.

34. O documento de patente CA2256125 "Chimeric gene formed of the DNA sequences that encode the antigenic determinants of four proteins of *L. infantum*, useful for serologic diagnosis of canine leishmaniosis and protein obtained" trata de um polipeptídeo diferente das proteínas recombinantes abordadas neste presente pedido de patente. Outro documento relacionado ao diagnóstico de leishmaniose, WO0140755, intitulado "A novel and practical serological assay for the clinical diagnosis of leishmaniasis" utiliza antígenos preparados a partir de cultura de parasitos para a detecção de imunoglobulinas específicas, diferindo deste presente pedido de patente.

35. Outros documentos de patentes encontrado envolvendo o diagnóstico de leishmanioses, ES2391562T3 "Antígenos de *Leishmania* para su uso em la terapia y el diagnóstico de leishmaniasis" e WO2015029002 "Modified gene from *Leishmania* ssp., method for producing a protein and use as an antigen in vaccine composition or in immunodiagnostics" não utilizam as proteínas recombinantes tratadas neste presente pedido de patente.

36. Nos documentos acima identificados não foi encontrado nenhuma tecnologia que utilize as proteínas recombinantes propostas neste pedido de patente.

11/32

37. A novidade deste pedido de patente é a utilização das proteínas histonas deacetilases de *Leishmania braziliensis* e/ou dos peptídeos imunogênicos mapeados como antígenos recombinantes para uso no diagnóstico por ELISA indireto, ou por outras técnicas de diagnóstico, para a detecção de leishmaniose tegumentar e/ou visceral, para a produção de kit de diagnóstico rápido para humanos ou animais, incluindo cães. Também faz parte desta proteção o uso das proteínas e peptídios isolados, ou em combinações, em proteínas e peptídios recombinantes para uso em composto vacinal ou de tratamento ou prognóstico das leishmanioses humana e animal, incluindo cão como espécie alvo.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

38. Figura 1 – Árvore filogenética das HDACs de *L. braziliensis* recombinantes e demais HDACs naturais das espécies *L. mexicana*, *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum*. Em azul estão destacadas as sequências recombinantes de *L. braziliensis*. As distâncias entre os ramos estão indicadas na figura. O agrupamento feito através da ferramenta Geneious Tree Builder (Geneious Prime ® v. 2021.0.3), utilizando o modelo de distância genética Jukes-Cantor e o método Neighbor-Joining de construção de árvores filogenéticas. Nesta figura é possível ver como as HDACs de diferentes espécies de *Leishmania* apresentam um grau de conservação entre si e com proteínas recombinantes produzidas a partir delas, mostrando o potencial que estas proteínas recombinantes possuem para a aplicação no diagnóstico de leishmaniose.

39. Figura 2A – Alinhamento das sequências de HDACs das espécies de *Leishmania* tratadas neste pedido de patente. Foi feito o alinhamento global entre as sequências de aminoácidos recombinantes SEQ. ID NO:2, SEQ. ID NO:4, SEQ. ID NO:6, SEQ. ID NO:8 e as sequências naturais das HDACs de outras espécies, utilizando o alinhamento default do Clustal

12/32

Omega (1.2.2) no programa Geneious Prime. Os parâmetros do alinhamento obtido foram 30,5% de identidade de pares e 4,6% de sítios idênticos. A fim de melhorar este alinhamento e diminuir a quantidade de gaps presentes, foi realizado um realinhamento com o Geneious Alingment (figura 2B), utilizando a matriz de substituição BLOSUM 62 alinhando as sequências em blocos. Os parâmetros do novo alinhamento foram 69,7% de identidade de pares e 59,4% de sítios idênticos. Em ambos os alinhamentos é possível notar que as HDACs recombinantes possuem, cada uma delas, uma similaridade a diferentes sequências naturais das HDACs das outras espécies.

40. Figura 3 – Construção para a expressão heteróloga em *Escherichia coli* das proteínas recombinantes em pET30b e o cassete de expressão de DNA.

41. Figuras 4 e 5 – Construção para a expressão heteróloga em *E. coli* das proteínas recombinantes em pET21b e os cassetes de expressão de DNA.

42. Figura 6 – Representa a confirmação em gel de agarose 1% da clonagem do gene sintético da proteína recombinante de *Leishmania braziliensis* (SEQ. ID NO:3) em vetor de clonagem, pUC57. Na canaleta 1 encontra-se o plasmídeo (2710pb) com o gene da SEQ. ID NO:3 (1305pb) inserido, na canaleta 2 está o plasmídeo digerido com as enzimas EcoRI e BamHI e o fragmento de 1305pb liberado e na canela M está o marcador de peso molecular (pb).

43. Figura 7 – Mostra a análise em gel de agarose 1% da confirmação da subclonagem do gene sintético da SEQ. ID NO:3 em vetor de expressão pET30b (5421pb) entre os sítios de restrição das enzimas NdeI e KpnI. Na canaleta 1 está o plasmídeo com o gene inserido, na canaleta 2 o plasmídeo digerido e o fragmento do gene SEQ. ID NO:3 de

13/32

aproximadamente 1305pb liberado e na canaleta M encontra-se o marcador de peso molecular.

44. Figura 8 – Representa a confirmação em gel de agarose 1% da clonagem do gene sintético da proteína recombinante SEQ. ID NO:1 *Leishmania braziliensis* em vetor de clonagem, pUC57. Na canaleta 1 encontra-se o plasmídeo (2710pb) com o gene sintético da SEQ. ID NO:1 (1887pb) inserido, na canaleta 2 está o plasmídeo digerido com as enzimas EcoRI e HindIII e o fragmento de 1887pb liberado e na canaleta M está o marcador de peso molecular.

45. Figura 9 – Mostra a análise em gel de agarose 1% da confirmação da subclonagem do gene sintético SEQ. ID NO:1, que expressa a SEQ. ID NO:2, em vetor de expressão pET30b (5421pb) entre os sítios de restrição das enzimas NdeI e KpnI. Na canaleta 1 está o plasmídeo com o gene inserido, na canaleta 2 o plasmídeo digerido e o fragmento do gene SEQ. ID NO:1 de aproximadamente 1887pb liberado e na canaleta M encontra-se o marcador de peso molecular.

46. Figura 10 – Representa a análise em gel de agarose 1% da reação de PCR feita com as construções em vetor pET30b com os primers do vetor, T7 promotor e T7 terminador. Na canaleta M está o marcador molecular 1 kb DNA ladder, na canaleta 1 a construção da proteína recombinante LbHDAC1 em vetor pET30b, na canaleta 2 a construção da proteína recombinante SEQ. ID NO:1 em vetor pET30b e a canaleta 3 é o controle negativo.

47. Figura 11 – Traz a análise em gel de agarose 1% da reação de PCR das construções das proteínas recombinantes com os primers específicos de cada gene. Na canaleta M encontra-se o marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder, na canaleta 1 está o produto da PCR da construção em vetor pET30b com os primers da SEQ. ID NO:3, as canaletas 2 e 3 são os controles negativos das reações de ambas as construções e na canaleta

14/32

4 o produto da reação entre a construção SEQ. ID NO:1 e seus primers específicos.

48. Figura 12 – Gel de poliacrilamida 10% da confirmação da expressão das proteínas recombinantes SEQ. ID NO:3 e SEQ. ID NO:1 em *E. coli* e a confirmação por *western blotting* com anticorpo anti-his que se liga a cauda de histidina presente nas proteínas recombinantes. As canaletas da proteína soro albumina bovina (BSA) e LicNTPDase 2 (E-NTPDase 2 de *L. infantum chagasi*) foram as referências de peso molecular utilizadas na eletroforese. As canaletas das frações obtidas no processo de lise para purificação das proteínas estão identificadas com "CI" para corpos de inclusão, "FS" para a fração solúvel e L1 e L2 para as lavagens feitas durante o processo de purificação. O *western blotting* foi realizado com as frações dos corpos de inclusão das duas proteínas recombinantes.

49. A Figura 13 e a Figura 14 trazem, respectivamente, os perfis de purificação das proteínas recombinantes SEQ. ID NO:1 e SEQ. ID NO:3, a partir dos corpos de inclusão (CI), realizada em cromatografia de afinidade e a análise em gel de poliacrilamida 10% de cada uma das frações obtidas ao longo do processo de purificação: lise, lavagens, corpos de inclusão, filtrado, volume não ligado e proteína purificada. No cromatograma, a linha azul contínua (pico), representa a absorção em UV a 280 nm e a linha verde representa a eluição das proteínas recombinantes com imidazol, que ocorre na concentração no ponto máximo da linha verde, correspondente à concentração máxima de imidazol.

50. A Figura 15 e a Figura 16 apresentam a análise da reatividade das proteínas recombinantes SEQ. ID NO:3 e SEQ. ID NO:1, respectivamente, nos testes de ELISA com soros de cães saudáveis e de cães com LVC. Diferentes concentrações e diluições de soros de cães saudáveis e infectados com *Leishmania* foram testados. A linha que liga os soros positivos e negativos de uma mesma diluição representa a diferença entre as médias

15/32

de positivos e negativos (valores indicados nos gráficos). A leitura das placas foi realizada a 492 nm em leitora de microplacas e os dados analisados utilizando o programa GrapPad PRISM 7.

51. Figura 17 – análise da reatividade de uma proteína recombinante, utilizando 48 cães saudáveis, denominados como negativos, 80 cães positivos para LVC, denominados como positivos e 24 cães positivos para Doença de Chagas e negativos para LVC. O ELISA foi feito utilizando o antígeno recombinante SEQ. ID NO:1 0,1 µg/µL e a diluição de soro 1:80. O eixo y representa a DO492nm, os quadrados se estendem dos percentuais de 25 a 75 dos resultados, a linha no meio em cada quadrado, representa a média dos resultados e as hastes representam o ponto mais alto e o mais baixo de cada grupo de soros. O *cut-off* usado foi 0,6405; representado no gráfico pela linha pontilhada, e foi definido pelo maior valor para o Índice de Youden ($J = (\text{sensibilidade} + \text{especificidade}) - 1$). Desta forma, o diagnóstico apresentou sensibilidade igual a 85,14% e especificidade igual a 95,83%.

52. Figura 18 – Resultado da técnica do mapeamento de epítomos da proteína recombinante SEQ. ID NO:3. Em A está o microarranjo do conjunto de soros negativos; em B o microarranjo do conjunto de soros positivos para a doença de chagas (DC); em C o microarranjo do conjunto de soros positivos para a leishmaniose visceral canina (LVC).

53. Figura 19 – Resultado do mapeamento de epítomos da proteína recombinante SEQ. ID NO:1. Em A o microarranjo do conjunto de soros negativos; em B o microarranjo do conjunto de soros positivos para a DC e em C o microarranjo do conjunto de soros positivos para a LVC.

54. Figura 20 – Gráficos das partes imunogênicas mapeadas, sendo o eixo y a intensidade de fluorescência emitida (a.u.) e no eixo x a sequência de aminoácidos das proteínas SEQ. ID NO:1 e SEQ. ID NO:3, ressaltando as principais sequências reconhecidas nos diferentes grupos de soros.

16/32

55. A Figura 21 e a Figura 22 trazem o alinhamento das partes imunogênicas mapeadas, com as suas respectivas proteínas recombinantes, feito com o programa Geneious Alingment, utilizando a matriz de substituição BLOSUM 62.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

56. Esta invenção refere-se à família das HDACs de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana*, em suas formas recombinantes, bem como o uso destas proteínas recombinantes e de suas partes imunogênicas. Através de processos de amplificação gênica com primers específicos, as sequências de nucleotídeos dos genes codificantes das HDACs são amplificadas e clonadas em vetores de expressão com as modificações necessárias para a aplicação antigênica. Assim, os genes destas proteínas são expressos de forma heteróloga, permitindo a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade. Após serem purificadas, estas proteínas recombinantes e suas partes imunogênicas podem ser utilizadas de forma satisfatória no diagnóstico de leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral canina por ELISA indireto, em kits de diagnóstico imunológico e busca de anticorpos anti-histonas deacetilases, ou contra as partes imunogênicas, em amostras biológicas de humanos ou animais. Além disso, estas proteínas recombinantes e suas partes imunogênicas podem ser aplicados em composições vacinais, que servem para o tratamento ou prognóstico de leishmaniose tegumentar e/ou leishmaniose visceral em humanos e cães.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

57. A presente invenção refere-se a proteínas recombinantes da família de histona deacetilases de *L. braziliensis*, produzidas em *E. coli*, representadas pelas sequências SEQ. ID NO:1, SEQ. ID NO:2, SEQ. ID

17/32

NO:3, SEQ. ID NO:4, SEQ. ID NO:5, SEQ. ID NO:6, SEQ. ID NO:7, SEQ. ID NO:8, e de *Leishmania* de outras quatro espécies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. major*, *L. donovani* e *L. mexicana*) representadas pelas sequências SEQ. ID NO:9, SEQ. ID NO:10, SEQ. ID NO:11, SEQ. ID NO:12, SEQ. ID NO:13, SEQ. ID NO:14, SEQ. ID NO:15, SEQ. ID NO:16, SEQ. ID NO:17, SEQ. ID NO:18, SEQ. ID NO:19, SEQ. ID NO:20, SEQ. ID NO:21, SEQ. ID NO:22, SEQ. ID NO:23, SEQ. ID NO:24, SEQ. ID NO:25, SEQ. ID NO:26, SEQ. ID NO:27, SEQ. ID NO:28, SEQ. ID NO:29, SEQ. ID NO:30, SEQ. ID NO:31, SEQ. ID NO:32, SEQ. ID NO:33, SEQ. ID NO:34, SEQ. ID NO:35, SEQ. ID NO:36, SEQ. ID NO:37, SEQ. ID NO:38, SEQ. ID NO:39, SEQ. ID NO:40.

58. A invenção refere-se também ao uso das proteínas recombinantes (SEQ. ID NO:1 a SEQ. ID NO:40) e das partes imunogênicas mapeadas das proteínas recombinantes de *L. braziliensis*, SEQ. ID NO:2 e SEQ. ID NO:4, identificadas pelas sequências SEQ. ID NO:41, SEQ. ID NO:42, SEQ. ID NO:43, SEQ. ID NO:44, SEQ. ID NO:45, SEQ. ID NO:46, SEQ. ID NO:47, SEQ. ID NO:48, SEQ. ID NO:49, SEQ. ID NO: 50, SEQ. ID NO:51, SEQ. ID NO:52, SEQ. ID NO:53 e SEQ. ID NO:54, para aplicação em diagnóstico, prognóstico e vacinas contra leishmaniose tegumentar e visceral, pois há reatividade cruzada com ambas doenças.

59. A invenção refere-se ainda a Kit diagnóstico que compreende pelo menos umas das proteínas recombinantes HDAC SEQ ID Nº 1 a SEQ ID Nº 40 e/ou pelo menos uma das partes imunogênicas SEQ ID Nº 41 a SEQ ID Nº 54, ou quimeras derivadas como antígeno, o soro ou sangue do indivíduo (homem ou animal) como fonte de anticorpos primários e um sistema de revelação do reconhecimento antígeno com os anticorpos primários. O sistema de revelação pode ser variável, como por exemplo, mas não restrito a estes: o uso de anticorpo secundário conjugado a enzima, molécula colorida ou fluorescente e o uso de ouro coloidal.

18/32

60. Abaixo, a descrição de um possível kit de diagnóstico por ELISA envolvendo as proteínas recombinantes deste pedido de patente, assim como suas partes imunogênicas mapeadas. As proteínas recombinantes e suas partes são passíveis de uso em outras versões de Kits de diagnóstico para leishmanioses, como por exemplo, testes rápidos de detecção de anticorpos específicos:

Descrição de kit de diagnóstico para Leishmanioses tegumentar e visceral canina

61. O kit de diagnóstico desenvolvido é um ensaio imunoenzimático (ELISA), capaz de identificar cães soropositivos para leishmaniose. O kit é composto por:

1. Placa de 96 poços, ou tiras de poços, sensibilizadas com o antígeno HDAC – 1;
2. Solução de Lavagem: PBS 10x – 10-500 mL, por tiras ou placas.
3. Diluente da amostra: PBS + agente bloqueante (caseína, albumina ou leite desnatado) 0,1-10% - 100 – 500 mL.
4. Conjugado – solução preparada: anticorpo anti IgG de cão conjugado com molécula reveladora como peroxidase, ou molécula fluorescente ou ouro coloidal + tampão.
5. Soro padrão positivo e soro padrão negativo.
6. Substrato - cromóforo – 1- 100 mL.
7. Solução Ácido sulfúrico 1,5 M – 1- 100 mL.
8. Manual de Procedimento do kit de diagnóstico:

Procedimento para Realização do Teste de Diagnóstico para Leishmaniose Canina

62. Os componentes do kit armazenados em temperatura de 2°C a 8°C, assim como os componentes armazenados à temperatura de -20°C,

19/32

devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste, retornando-os à temperatura ambiente após seu uso.

63. **Importante:** O conjugado deve ser preparado e retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento de sua utilização, sendo necessário o completo descongelamento para o seu preparo.

1. Vortexar a solução de bloqueio e acrescentar a cada um dos poços 100 µL da solução de bloqueio. Incubar a 25° C por 1 hora.

2. Durante o tempo de incubação do bloqueio, prepare a solução de lavagem e as amostras / controles:

- 2.1 Preparo da Solução de Lavagem: Verter o conteúdo dos dois frascos do tampão de Lavagem (10x) em 900 mL de água destilada.

- 2.2 Preparo das Amostras e dos controles: Fornecer 10 µL de amostras positivas e negativas. Dar um spin nos tubos contendo as amostras, e, posteriormente, acrescentar 790 µL do diluente de amostra/conjugado 1x em cada tubo contendo as amostras (diluição 1:80).

3. Após o tempo de incubação do bloqueio, verter o conteúdo da placa e lavar 4 vezes com tampão de lavagem preparado acima (200 µL / poço). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

4. Distribuir nas placas sensibilizadas, 100 µL das amostras e dos controles preparados na etapa 2, em duplicata.

OBS.: os controles negativos serão usados para o cálculo do cut-off, portanto, é recomendado anotar qual a localização dos controles para facilitar a identificação.

5. Incubar a placa com as amostras a 37 ° C por 1 hora.

6. Verter o conteúdo e lavar 4 vezes com tampão de lavagem (200 µL / poço). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

20/32

7. Preparo do Conjugado: Após o completo descongelamento do conjugado 10x, adicioná-lo a 13,5 mL de Diluente de amostra/Conjugado 1x. Homogeneizar a solução preparada.
8. Distribuir 100 µL do conjugado preparado em cada poço.
9. Incubar a placa a 37 ° C por 1 hora. Verter o conteúdo e lavar conforme descrito no item 6.
10. Distribuir 100 µL do substrato - cromóforo rapidamente em todos os poços. O substrato - cromóforo está pronto para uso. Deixar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 10 minutos.
11. Bloquear a reação adicionando 50 µL do ácido sulfúrico 1,5 M. Em seguida, proceder com a leitura a 450 nm.
12. Os resultados obtidos na leitura a 450 nm devem ser interpretados de acordo com o cut-off calculado para cada placa de ELISA. Animais que apresentam valores inferiores ao cut-off são considerados negativos para leishmaniose, enquanto que animais que apresentam valores acima do cut-off são considerados positivos para leishmaniose. Animais com valores dentro da zona cinza do experimento são considerados indeterminados e devem ser submetidos a uma nova avaliação.

Cálculo do *Cut-off* do experimento:

64. $Cut-off = \bar{X} + (2 \times DP)$, sendo que:

\bar{X} = média das leituras do controle negativo;

DP = Desvio Padrão das leituras do controle negativo.

65. O *cut-off* deve ser calculado para cada uma da placa.

Cálculo da Zona Cinza do experimento:

66. Limite inferior = $(cut-off) - (0,1 \times cut-off)$

67. Limite superior = $(cut-off) + (0,1 \times cut-off)$

68. Nessa faixa da zona cinza, os resultados são considerados indeterminados e devem ser submetidos a uma nova avaliação.

69. A sequência de aminoácidos da proteína recombinante SEQ. ID NO:4 HDAC1de *Leishmania braziliensis* apresenta homologia com as proteínas de *L. major* (LmjF.21.0608), *L. mexicana* (LmxM.21.0608), *L. infantum* (LINF_210012400) e *L. donovani* (LdBPK_210740.1) que apresentam, respectivamente, 91,88%, 86,71%, 91,69% e 91,69% de identidade quando comparadas com as sequências de aminoácidos naturais. A proteína recombinante SEQ. ID N° 2HDAC3 de *L. braziliensis* possui como homólogas as sequências de aminoácidos naturais de outras proteínas da família das HDACs em *L. mexicana* (LmxM.21.1870), *L. major* (LmjF.21.1870), *L. donovani* (LdBPK_081300.1), *L. infantum* (LINF_210028600), apresentando 79,62%, 80,25%, 80,41% e 80,89% de identidade, respectivamente.

70. Como *L. braziliensis* apresenta outras duas enzimas da família de HDACs identificadas em seu genoma, a sequência destas proteínas recombinantes também foi comparada com as demais HDACs identificadas nas outras espécies (Figuras 1 e 2). Quando comparada a SEQ. ID NO:8 de *L. braziliensis*, com as demais proteínas de outras espécies, esta apresenta os seguintes valores de identidade: *L. mexicana* (LmxM.08.1090) 79,41%, *L. major* (LmjF.08.1090) 80,13%, *L. donovani* (LdBPK_081000.1) 79,97% e *L. infantum* (LINF_080015600) 78,01%. Já a SEQ. ID NO:6 de *L. braziliensis* possui 90,07% de identidade com a *L. mexicana* (LmxM.24.1370), 93,09% com a *L. major* (LmjF.24.1370) e *L. donovani* (LdBPK_241410.1) e 93,55% com a *L. infantum*

22/32

(LINF_240019100). Assim, as identidades de sequência de aminoácidos entre as HDACs das diferentes espécies de *Leishmania* varia de cerca de 70% à mais de 90%.

71. As sequências naturais dos genes de HDACs das diferentes espécies de *Leishmania* citadas neste documento de patente podem ser encontradas no banco de dados de tripanossomatídeos TriTrypDB. Para a obtenção das proteínas recombinantes, foram feitas virtualmente construções em vetores de expressão para a produção das HDACs recombinantes (Figuras 3, 4 e 5). Através de processos de digestão e clonagem *in silico*, utilizando o programa Geneious Prime (v. 2021.0.3), as sequências de interesse foram inseridas entre os sítios de enzimas de restrição desejadas.

72. Em comparação às sequências naturais, as sequências recombinantes das HDACs de *Leishmania*, deste pedido de patente, possuem modificações nas porções amino e carboxi terminal. As HDACs recombinantes de *L. major*, *L. donovani*, e três HDACs de *L. braziliensis* e *L. mexicana* sofreram as mesmas modificações ao terem as suas sequências adicionadas no vetor de expressão pET30b, entre os sítios das enzimas de NdeI e KpnI. Na porção amino terminal são adicionados 5 pares de base (pb) antes da sequência codificante das proteínas e na porção carboxi terminal 102 pb após a sequência gênica. Dessa forma, as proteínas clonadas entre estes sítios de restrição possuirão 34 aminoácidos a mais em sua sequência recombinante. Entre estes aminoácidos adicionados está presente uma cauda de seis histidinas (carboxi terminal), que permite a purificação destas proteínas recombinantes através de cromatografia de afinidade por níquel.

73. A SEQ. 07 de *L. braziliensis* sofre diferentes modificações em sua sequência por ser adicionada em outro vetor de expressão, o pET21b, entre os sítios das enzimas de restrição BamHI e XhoI. Assim, são adicionados 42 pb na porção amino terminal e 27 pb na porção carboxi

23/32

terminal, resultando em 22 aminoácidos a mais em sua sequência. Já a SEQ. 35 de *L. mexicana* é adicionada entre os sítios de restrição de NheI e BamHI, resultando em 9 pb adicionados na porção amino terminal e 69 pb na porção carboxi terminal, o que adiciona 25 aminoácidos em sua sequência proteica. Em ambas as construções são adicionadas uma cauda de seis histidinas carboxi terminal.

74. A presente tecnologia pode ser mais bem compreendida através das informações a seguir, que apresentam formas de concretização não limitantes da invenção.

Construção dos genes sintéticos para expressão das proteínas recombinantes SEQ ID. NO:1 e SEQ ID. NO:3 de *L. braziliensis*

75. As sequências gênicas das proteínas recombinantes de *L. braziliensis*, foram enviadas para a síntese química da sequência de DNA codificante com códons otimizados para expressão em sistema de *E. coli*, e estes foram sub-clonados no vetor de expressão por uma empresa especializada neste tipo de síntese e sub-clonagem (Figuras 6 a 9).

Manipulação dos genes sintéticos

76. Os vetores de clonagem e de expressão contendo os genes sintéticos das proteínas recombinantes foram recebidos liofilizados. Em seguida, os micro tubos contendo as construções em vetor de clonagem foram armazenados a -20°C e os micro tubos contendo a construção em vetor de expressão pET30b foram centrifugados a $6.000 \times g$ por 1 minuto a 4°C , suspensos em $20 \mu\text{L}$ de água estéril, homogeneizados em vórtex por 1 minuto, incubados a 55°C por 15 minutos e armazenados a -20°C .

77. Logo depois, para cada construção foi feita uma transformação por choque térmico em culturas de células *E. coli* DH5 α competentes. Os tubos de células foram colocados em banho de gelo por 30 minutos e após este tempo foi realizado o choque térmico a 42°C por 1 minuto e meio, seguido de resfriamento em gelo. Após o choque térmico foram

24/32

acrescentados 800 µL de meio de cultura Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1% NaCl, pH 7.5) a cada micro tubo e estes foram incubados sob agitação por 1 h, a 37 °C, a 180 rpm. Passado o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto a 4°C e o precipitado foi plaqueado em meio LB sólido (LB e 2% de ágar), com antibiótico (Canamicina 50 µg/mL) e incubado a 37°C *overnight* (SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

78. Após a incubação, colônias isoladas de cada placa foram selecionadas e inoculadas em 4 mL de meio de cultura LB com antibiótico (Canamicina 50 µg/mL). Os tubos foram incubados à 37°C *overnight*, sob agitação de 180 rpm. Com os inóculos foi feita extração de DNA plasmidial com o Kit de extração, segundo as instruções do fabricante.

79. Após a extração do DNA plasmidial contendo os genes sintéticos, as construções foram confirmadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando 1 µL do DNA plasmidial, 10 µL Green PCR Master Mix (2x), 1 µL iniciador T7 promotor SEQ. IDNO: 55, 1 µL iniciador T7SEQ. IDNO: 56 e 7 µL de água para completar 20 µL de reação. A reação foi realizada em termociclador da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento de primers a 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e 30 segundos; finalizando com uma extensão final 72°C por 7 minutos. Também foi feito um controle negativo da reação, com todos os seus componentes, menos o DNA plasmidial.

80. Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X (0,89 M Tris; 0,02 M EDTA e 0,89 M ácido bórico, em água deionizada, pH 8,4) e corado em solução de brometo de etídio (SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) para a verificação da formação de uma banda

correspondente ao tamanho 1705pb para a SEQ. ID NO:3 e o 3120pb para SEQ. ID NO:1 aproximadamente, utilizando os primers específicos do vetor pET30 (Figura 10). A mesma reação foi feita para os primers específicos das proteínas recombinantes SEQ. ID NO:1 e SEQ. ID NO:3 (Figura 11). A eletroforese foi feita a 100 V, utilizando como tampão de corrida TBE 1X.

Produção das proteínas recombinantes SEQ. ID NO:1 e SEQ. ID NO:3 de *Leishmania braziliensis* em sistema procarioto

81. A fim de avaliar qual seria a melhor condição de expressão heteróloga das proteínas, foram testadas diferentes concentrações de IPTG (0,25 mM, 0,5 mM, 0,8 mM e 1,0 mM), diferentes tempos de indução (1 a 4 h de indução) e meios de cultivo, LB ou SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose). Após a indução da expressão das recombinantes, foram feitas análises por quantificação de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248–254, 1976) e análises do perfil proteico por SDS PAGE 10% de acordo com (SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

82. A partir dos testes de expressão das proteínas recombinantes foi realizada uma maior produção de proteínas para posterior purificação. Um pré-inóculo correspondente a 2% do volume final de indução foi feito em meio LB contendo 50 µg/mL de Canamicina (SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) e incubado a 37°C, por 16 h sob agitação a 180 rpm. Em seguida, o pré-inóculo de cada proteína foi transferido para 2 L de meio LB até atingir DO600 entre 0,6 – 0,8. Então foi feita a indução com 0,25 mM de IPTG por 2 h a 37° a 180 rpm de agitação. Logo depois,

os pellets de 400 mL de indução foram separados e armazenados a -80°C para posterior purificação.

Purificação das proteínas recombinantes

83. Cada pellet de cultura induzida foi suspenso em 4 mL de tampão de lise (tris pH 8,0 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, 1 mg/mL de lisozima e inibidores de protease – aprotinina, leupeptina e pepstatina) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram sonicadas em 6 ciclos de 10 segundos On/Off em potência de 10 watts e banho de gelo. Após serem sonicados, os lisados foram centrifugados por 15 minutos, 12500 x g a 4°C . O pellet obtido nesta etapa foi suspenso em 20 mL de tampão de lavagem (tris pH 8,0 50 mM, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 10 mM e ureia 2 M) e mais uma vez sonicado nas mesmas condições anteriores e centrifugado por 10 minutos, a 4°C a 12000 x g. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Por fim, o pellet foi suspenso em 25 mL de tampão de solubilização (tris pH 8,0 50 mM, NaCl 500 mM, ureia 8 M) e incubado a 55°C por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi sonicada novamente em condições já citadas e centrifugada por 20 minutos a 12000 x g, 4°C . Feito isso, a amostra foi filtrada em membrana 0,42 μm e purificada por cromatografia de afinidade.

84. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada em cromatografia de afinidade. Para a purificação foram utilizados dois tampões: Tampão A (tris pH 8,0 50 mM, NaCl 500 mM, ureia 8 M, 10 mM de imidazol) – utilizado para equilibrar a coluna e auxiliar na interação das proteínas com a resina; Tampão B de mesma composição do tampão A contendo 300 mM de imidazol, utilizado na eluição das proteínas recombinantes purificadas.

85. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of

27/32

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248–254, 1976) em microplacas e a análise das proteínas recombinantes feita por SDS-PAGE 10%, eletroforese capilar e Western Blotting (SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

86. Para o Western Blotting foi feita uma eletroforese em SDS-PAGE 10% com as proteínas recombinantes, seguida de transferência para a membrana de nitrocelulose (Figura 12). A transferência ocorreu com amperagem fixa em 210 mA por 2 h em sistema de transferência. Após a transferência foi realizado o bloqueio da membrana de nitrocelulose com 5% de leite em pó solução salina (Phosphate-buffered saline – PBS) por 16 h, a temperatura ambiente. Depois do bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS e Tween20 – 0,05% (PBS-T) e incubada com o anticorpo primário anti-his (produzido em camundongo) na diluição de 1:3000 por 2 h. Após a incubação com o primeiro anticorpo, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T e incubada com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com peroxidase na diluição 1:5000 por 2 h. A revelação foi realizada com o substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,1%, 0,01% de H₂O₂ em Tris 50 mM pH 7,6 até a visualização de precipitado marrom. Os mesmos procedimentos de construção de proteínas recombinantes, expressão, purificação e uso feito seguindo os passos descritos para as SEQ ID N° 1 e 3 pode ser feito para as demais proteínas e peptídeos objetos desta patente, variando-se somente a sequência proteica da HDAC específica e dos peptídeos antigênicos mapeados que podem ser combinados em quimeras de novas proteínas recombinantes (SEQ. ID NO 5 a 40).

Experimento de Demonstração

Padronização do uso das proteínas recombinantes como antígenos no ELISA indireto para detecção de cães com leishmaniose

28/32

87. As proteínas recombinantes foram diluídas em tampão carbonato 0,1 M pH 9,6 em diferentes quantidades (0,1, 0,3 e 0,5 µg/poço) e adicionados em placas de 96 poços. A sensibilização das placas ocorreu à temperatura de 4°C por 16 h. Passado o período de sensibilização foi feito o bloqueio de sítios inespecíficos por 1 h com solução BSA 3% em PBS pH 7,6. Em seguida, foram adicionadas diferentes diluições dos soros de cães a serem testados (1:40, 1:80 e 1:160), em PBS contendo 1% de BSA. Os soros foram incubados por 1 h à temperatura ambiente. Os volumes de soros e antígenos para cada poço foram fixados em 100 µL.

88. Após a incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com 200 µL de solução PBS-T. Após as lavagens, o anticorpo secundário anti-IgG de cão conjugado com peroxidase foi incubado para reagir à temperatura ambiente por 1 h. O anticorpo foi diluído a 1:5000 em PBS com BSA 1%. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes, como já citado. Logo depois, a revelação foi realizada com 100 µL de substrato OPD (o-fenilenodiamina 3,75 mM e 0,01% H₂O₂) em tampão citrato fosfato (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M fosfato de sódio pH 5,0) por 10 minutos e a reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 0,5 M. A leitura das placas foi realizada a 492 nm em leitora de microplacas e os dados analisados utilizando o software GrapPad PRISM 7.

Mapeamento de Epítomos Lineares Imunogênicos nas HDACs

89. O mapeamento dos epítomos lineares das proteínas recombinantes foi realizado com o objetivo de investigar os determinantes da ligação antígeno-anticorpo, e assim possibilitar o aperfeiçoamento tanto do antígeno alvo, quanto do diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Foram avaliadas as interações desses dois antígenos com amostras de soros negativos, soros positivos-LVC e soros positivos para a Doença de Chagas (positivos-DC). Os padrões de interação obtidos foram completamente distintos entre os grupos (Figura 18 e 19). A figura

29/32

18A apresenta o microarranjo com a recombinante SEQ. ID NO:3 contra um conjunto de soros negativos, e foi observada uma resposta fraca de anticorpos contra peptídeos únicos, representada por pontos vermelhos no microarranjo. Além disso, os padrões de manchas foram semelhantes a epítomos formados por peptídeos adjacentes com um motivo de consenso. Um padrão semelhante foi observado usando o conjunto de positivos-DC (Figura 18B). De maneira oposta, o conjunto de soros positivos-LVC apresenta resposta de anticorpo forte e complexa contra vários peptídeos únicos. Os padrões de manchas são semelhantes aos epítomos formados por peptídeos adjacentes com um motivo de consenso (Figura 18C). É importante notar que o sinal de fluorescência dos epítomos positivos foi muito maior que os conjuntos de soros negativos-LVC e positivos-DC, o que é evidenciado pela medida de intensidade de fluorescência, no eixo Y de cada gráfico. O aspecto semelhante pode ser observado nas Figuras 19 A, B e C, que apresentam os microarranjos com a proteína recombinante SEQ. ID NO:1.

90. A Figura 20 compara as respostas dos anticorpos de cada conjunto de soros (negativo, positivo-DC e positivo-LVC) contra peptídeos únicos dos antígenos recombinantes. O grupo de soros positivos-LVC (vermelho) mostrou uma resposta IgG significativamente mais forte e mais complexa com vários epítomos únicos, em comparação com as respostas fracas a moderadas do conjunto sérico de cães negativo (roxo) e positivo para a doença de Chagas (verde). Este último grupo interagiu predominantemente com peptídeos únicos, o que sugere eventos de ligação menos específicos ou reações cruzadas de anticorpos.

91. As principais interações presumidas dos conjuntos de soros estão resumidas na Tabela 1. Foram identificadas duas sequências presumidas no conjunto de soros negativos (EHSIATASGTL e DDDKA) e uma sequência de peptídeo única (VEELMAYHTDTYLAN) para a SEQ. ID NO:3. Considerando que a sequência DDDKA é um artefato do vetor de

30/32

expressão utilizado para produzir o antígeno recombinante, supõe-se que essa, juntamente com as demais regiões sejam as principais responsáveis pela ocorrência de falso-positivos no diagnóstico utilizando este antígeno, tendo impacto sobre a especificidade do teste. Já a SEQ. ID NO:1 não apresentou nenhuma interação nesse grupo de soros negativos.

Tabela 1: Epítopos mapeados nas proteínas recombinantes e suas principais interações presumidas nos conjuntos de soros testados.

Conjunto de soros	Epítopos Presumidos	Interações Peptídicas Únicas	Antígeno Avaliado
Negativos	EHSIATASGTL, *DDDKA	VEELMAYHTDTYLAN	SEQ. ID NO:3
	-	-	SEQ. ID NO:1
Positivos – DC	-	PRDVGYGRGRYYSMN, *TDDDDKAMADIGSEF	SEQ. ID NO:3
	LVRPPGHHAG PDN, AALLSADAVEP	ESPLIRPSLLPPLTP, PTLAAWSKSGVAPTP, AGEYERPARLQSTID, AEMPTADKEDVTAED, AVMRALLESSGFPGD	SEQ. ID NO:1
Positivos – LVC	YIDID	-	SEQ. ID NO:3
	MLDHVSPDA, TID, DTIDQLD, DGTESVFYD, DDTEIAALFGV DL	-	SEQ. ID NO:1

*Sequências que pertencem ao vetor de expressão pET utilizado para produzir as proteínas recombinante.

31/32

92. Em relação ao conjunto de soros positivos para doença de Chagas, a proteína recombinante SEQ. ID NO:3 apresentou duas interações peptídicas únicas, PRDVGYGRGRYYSMN e TDDDDKAMADIGSEF, sendo a última sequência também um artefato do vetor de expressão utilizado para expressar a proteína recombinante, que foi mapeado pela técnica utilizada. A proteína recombinante SEQ. ID NO:1 apresentou cinco sequências com interações peptídicas únicas (ESPLIRPSLLPPLTP, PTLAAWSKSGVAPTP, AGEYERPARLQSTID, AEMPTADKEDVTAED, AVMRALLESSGFPGD) e duas sequências de epítomos presumidos (LVRPPGHHAGPDN, AALLSADAVEP). Supõe-se que essas regiões sejam as principais responsáveis pela ocorrência de falso-positivos e reações cruzadas para a doença de Chagas no diagnóstico.

93. No conjunto de soros positivos-LVC foi identificada uma sequência de epítomo presumida para SEQ. ID NO:3 (YIDID) e cinco para a SEQ. ID NO:1 (MLDHVSPDA, TID, DTIDQLD, DGTESVFYD, DDTEIAALFGVDL). O mapeamento de epítomos e os experimentos de diagnóstico por ELISA mostram que existe uma resposta imune de anticorpos contra as proteínas alvo desta patente, sendo elas então imunogênicas. Assim as mesmas podem ser usadas para composições vacinais, pois induzem resposta imune específica.

Utilização das proteínas recombinantes como antígenos no ELISA indireto para detecção de cães com leishmaniose

94. Após a purificação das proteínas recombinantes, quantificação e análise da pureza, as proteínas foram diluídas em tampão carbonato 0,1 M pH 9,6 em diferentes quantidades (0,1 µg, 0,3 µg e 0,5 µg/poço) e adicionados às placas de 96 poços. A sensibilização das placas ocorreu à temperatura de 4°C por 16 h. Passado o período de sensibilização foi feito o bloqueio de sítios inespecíficos com solução BSA 3% em PBS pH 7,6 por 1 h. Em seguida, foram adicionadas diferentes diluições dos soros de

32/32

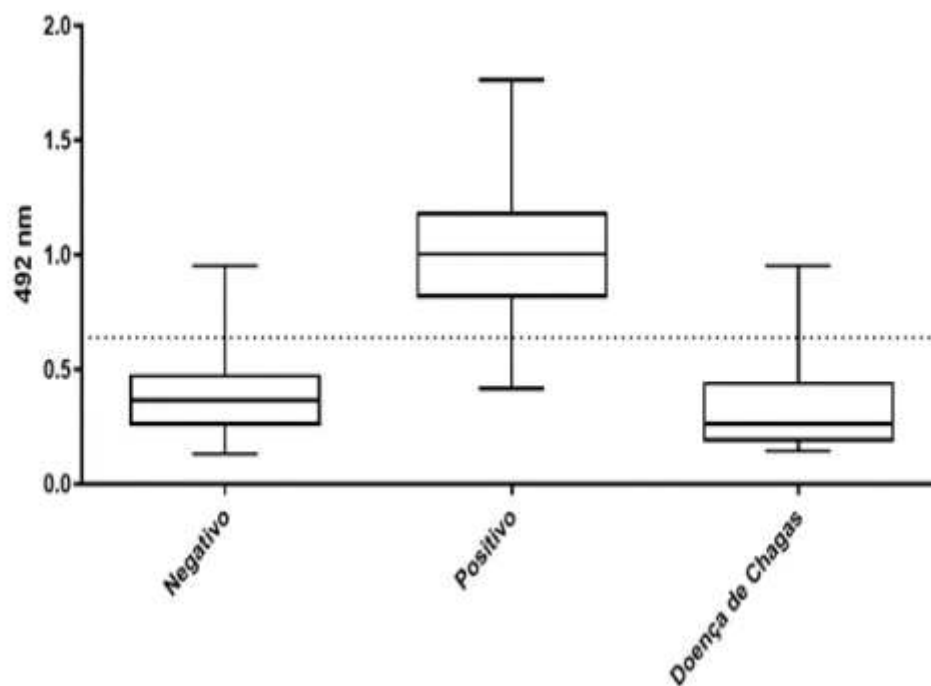
cães (1:40, 1:80 e 1:160) e a placa foi incubada por 1 h à temperatura ambiente.

95. A reatividade da proteína recombinante SEQ. ID NO:1 foi avaliada utilizando 48 soros de cães saudáveis (negativos), 80 soros de cães positivos para LVC (positivos) e 24 soros de cães positivos para a doença de Chagas e negativos para LVC.

96. Após a incubação foram feitas 4 lavagens em cada placa com 200 μ L de solução PBS-T. Depois das lavagens o anticorpo secundário anti-IgG de cão conjugado com peroxidase, diluído 1:5000 em PBS/BSA 1% foi incubado para reagir à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, foram feitas mais 4 lavagens como citado. Logo depois, a revelação foi realizada com 100 μ L de substrato OPD em tampão citrato fosfato por 10 minutos. A reação foi interrompida com 50 μ L de H_2SO_4 0,5 M. A leitura das placas foi realizada a 492 nm em leitora de microplacas e os dados analisados utilizando o programa GrapPad PRISM 7.

97. A Figura 17 demonstra a reatividade da proteína recombinante com os soros testados e o maior coeficiente de reatividade para os soros positivos, ao mesmo tempo que os soros negativos permanecem abaixo do valor de *cut-off* estabelecido, 0,6405. Este diagnóstico apresentou uma sensibilidade de 85,14% e especificidade de 95,83% e acurácia geral de 96,74%.

Análise de reatividade de uma proteína recombinante utilizando 48 soros de cães saudáveis, denominados como negativos, 80 soros de cães positivos para LVC, denominados como positivos e 24 soros de cães positivos para Doença de Chagas e negativos para LVC



O ELISA utilizando o antígeno recombinante SEQ. ID NO:1 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, diluição de soros 1:80. O eixo y representa a DO492nm, os quadrados se estendem dos percentuais de 25 a 75 dos resultados, a linha no meio em cada quadrado, representa a média dos resultados e as hastes representam o ponto mais alto e o mais baixo de cada grupo de soros. *Cut-off*: 0,6405 (linha pontilhada) definido pelo maior valor para o Índice de Youden ($J = (\text{sensibilidade} + \text{especificidade})$). Fonte: Figura 17 da patente.

ANEXO

Artigos publicados em colaboração ao longo do doutorado



Histone deacetylases inhibitors as new potential drugs against *Leishmania braziliensis*, the main causative agent of new world tegumentary leishmaniasis

Luciana Ângelo de Souza^{a,*}, Matheus Silva e Bastos^{b,c,1}, Joice de Melo Agripino^{b,c}, Thiago Souza Onofre^{b,c,2}, Lourdes Fanny Apaza Calla^{a,c}, Tino Heimbürg^f, Ehab Ghazy^f, Theresa Bayer^f, Victor Hugo Ferraz da Silva^a, Paula Dutra Ribeiro^a, Leandro Licursi de Oliveira^a, Gustavo Costa Bressan^{b,c}, Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo^{b,c}, Abelardo Silva-Júnior^c, Raphael de Souza Vasconcellos^b, Ana Márcia Suarez-Fontes^d, Juliana Almeida-Silva^d, Marcos André Vannier-Santos^d, Raymond Pierce^{e,g}, Wolfgang Sippl^{h,i}, Juliana Lopes Rangel Fietto^{b,c,3}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Virologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^d LITEP, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

^e Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIL - Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, 59000 Lille, France

^f Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University of Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

^g Consortium A-ParadiseE- Anti-Parasite Drug Discovery in Epigenetics - <http://a-paradise.cebs.br>

ARTICLE INFO

Keywords:

Tegumentary leishmaniasis
Leishmania braziliensis
 Epigenetics
 Histone deacetylases inhibitors
 Hydroxamic acid derivatives
 Drug discovery

ABSTRACT

The protozoan parasite *Leishmania braziliensis* is a major causative agent of the neglected tropical diseases Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the New World. There are no vaccines to prevent the infection and the treatment relies on few drugs that often display high toxicity and costs. Thus, chemotherapeutic alternatives are required. Histone Deacetylases (HDACs) are epigenetic enzymes involved in the control of chromatin structure. In this work, we tested an in-house library of 78 hydroxamic acid derivatives as putative inhibitors of *L. braziliensis* HDACs (HDACi). The compounds were evaluated in relation to the toxicity to the host cell macrophage and to the leishmanicidal effect against *L. braziliensis* during in vitro infection. Eight HDACi showed significant leishmanicidal effects and the top 5 compounds showed effective concentrations (EC₅₀) in the range of 4.38 to 10.21 μM and selectivity indexes (SI) from 6 to 21.7. Analyses by Transmission Electron Microscopy (TEM) indicated induction of apoptotic cell death of *L. braziliensis* amastigotes with a necrotic

Abbreviations: HDACs, Histone deacetylases; HDACi, HDACs inhibitors; FC, flow cytometry; TEM, Transmission Electron Microscopy; NO, nitric oxide; CL, cutaneous leishmaniasis; DCL, diffuse cutaneous leishmaniasis; DsCL, disseminated cutaneous leishmaniasis; ML, mucocutaneous leishmaniasis; ATL, American Tegumentary Leishmaniasis; HMEs, histone modifying enzymes; HATs, histone acetyltransferases; CC₅₀, cytotoxic concentration; EC₅₀, effective concentration; PS, phosphatidylserine; PI, propidium iodide

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) – Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais CEP: 36570-000, Brazil.

E-mail addresses: luciana.angelosz@gmail.com (L. Ângelo de Souza), matheusbastos@gmail.com (M. Silva e Bastos), joicebqi@gmail.com (J. de Melo Agripino), thiagosouzaonofre@gmail.com (T. Souza Onofre), lourdes.fanny@gmail.com (L.F. Apaza Calla), Tino.Heimbueg@pharmazie.uni-halle.de (T. Heimbürg), Ehab.ghazy@pharmazie.uni-halle.de (E. Ghazy), Theresa.bayer@pharmazie.uni-halle.de (T. Bayer), vhferraz@gmail.com (V.H. Ferraz da Silva), pauladutra@gmail.com (P. Dutra Ribeiro), leandro.licursi@ufv.br (L. Licursi de Oliveira), gustavo.bressan@ufv.br (G. Costa Bressan), mrlamemgo@hotmail.com (M.R. de Almeida Lamêgo), abelardo.junior@ufv.br (A. Silva-Júnior), raphael.vasconcellos@ufv.br (R. de Souza Vasconcellos), anamarcia@gmail.com (A.M. Suarez-Fontes), jub_biomed@yahoo.com.br (J. Almeida-Silva), marcos.vannier@ioc.fiocruz.br (M.A. Vannier-Santos), Raymond.Pierce@pasteur-lille.fr (R. Pierce), wolfgang.sippl@pharmazie.uni-halle.de (W. Sippl), jufietto@ufv.br (J. Lopes Rangel Fietto).

¹ Present address: Matheus Silva e Bastos: Department of Pharmacology & Toxicology Indiana University School of Medicine 635 Barnhill Drive MS A405 Indianapolis, IN, 46202, USA.

² Present address: Thiago Souza Onofre: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114191>

Received 15 May 2020; Received in revised form 1 August 2020; Accepted 3 August 2020

Available online 07 August 2020

0006-2952/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications



Walmir da Silva¹, Nancy da Rocha Torres², Joice de Melo Agripino¹, Victor Hugo Ferraz da Silva², Anna Cláudia Alves de Souza¹, Isadora Cunha Ribeiro¹, Tatiana Aparecida de Oliveira¹, Luciana Angelo de Souza², Leticia Kelly Ramos Andrade¹, João Victor Badaró de Moraes², Marcel Arruda Diogo¹, Raissa Barbosa de Castro¹, Marcelo Depolo Polêto², Luis Carlos Crocco Afonso³ and Juliana Lopes Rangel Fictto^{1,4}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil;

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; ³Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: May 21, 2020

Revised: July 27, 2020

Accepted: August 24, 2020

DOI:

10.2174/1568026620662008125144



CrossMark

Abstract: ENTPDases are enzymes known for hydrolyzing extracellular nucleotides and playing an essential role in controlling the nucleotide signaling via nucleotide/purinergic receptors P2. Moreover, ENTPDases, together with Ecto-5'-nucleotidase activity, affect the adenosine signaling via P1 receptors. These signals control many biological processes, including the immune system. In this context, ATP is considered as a trigger to inflammatory signaling, while adenosine (Ado) induces anti-inflammatory response. The trypanosomatids *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*, pathogenic agents of Leishmaniasis and Chagas Disease, respectively, have their own ENTPDases named "TpENTPDases," which can affect the nucleotide signaling, adhesion and infection, in order to favor the parasite. Besides, TpENTPDases are essential for the parasite nutrition, since the Purine *De Novo* synthesis pathway is absent in them, which makes these pathogens dependent on the intake of purines and nucleopurines for the Salvage Pathway, in which TpENTPDases also take place. Here, we review information regarding TpENTPDases, including their known biological roles and their effect on the purinergic signaling. We also highlight the roles of these enzymes in parasite infection and their biotechnological applications, while pointing to future developments.

Keywords: ENTPDases, Purinergic signaling, Leishmaniasis, Chagas Disease, Parasites, Biotechnology.

1. INTRODUCTION

Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) belong to the CD39 gene family. They have been characterized by the presence of five apyrase conserved regions (ACR1 to ACR5). They also catalyze the hydrolysis of tri- and diphosphate nucleosides to their monophosphate forms. Ecto-5'-nucleotidases (5'-NTs), which belong to the CD73 gene family, take these monophosphate nucleosides to hydrolyze them to nucleoside. In a highly controlled manner, ENTPDases and 5'-NTs are able to modulate the nucleotide purinergic signaling [1, 2].

These enzymes are ubiquitously expressed from mammals to unicellular pathogens, such as the protozoan *Leishmania* genus [3], *Trypanosoma cruzi* [4], and the bacteria *Legionella pneumophila* [5]. In the CD39 gene family, some enzymes are localized at the cell surface (named Ecto-NTPDases or ENTPDases), while others are localized in

internal compartments of the cells [3]. In mammalian, these ENTPDases are involved in the control of nucleotide/purinergic signaling, which controls diverse biological systems, such as blood clotting and the immune system [6]. These enzymes are also present in pathogens and have been described as participants in the purine uptake by Purine Salvage Pathway and in infection and virulence mechanisms [5-10].

The roles of ENTPDases in adhesion, infection and virulence of pathogens have been studied by many research groups. The current understanding is that enhanced ENTPDase hydrolysis of ATP and ADP is associated with the production of Ado by 5'-NT, which leads to higher virulence and plays a pivotal role on the subversion or blockage of host-defense mechanisms [1, 3-6, 11-17]. At least part of these effects is a consequence of the control of nucleotide/purinergic signaling on host cells and tissues (Fig. 1).

It has been demonstrated that nucleotides are able to stimulate the purinergic P1 and P2 receptors on the host cell membrane [14]. These events play an important role in the

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil; E-mail: jufictto@ufv.br



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

High Performance of ELISA test using recombinant rLiNTPDase2 from *Leishmania infantum*: a Phase II diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis



Anna Cláudia Alves de Souza^{a,*}, Raissa Barbosa de Castro^b, Yaro Lucio dos Santos^b, Nancy da Rocha Torres Pavione^d, Joice de Melo Agripino^b, Maria Terezinha Bahia^b, George Luiz Lins Machado-Coelho^b, Ronny Francisco de Souza^c, Leandro Licursi de Oliveira^d, Celeste da Silva Freitas de Souza^c, Gustavo Costa Bressan^b, Raphael de Souza Vasconcellos^b, Márcia Rogéria de Almeida^a, Juliana Lopes Rangel Fietto^b

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-000 Viçosa, MG, Brazil

^b Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPCB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, CEP: 35400-000, MG, Brazil

^c Coordenação do Curso de Biologia, Centro Universitário de Caratinga-UNEC, Fundação Educacional de Caratinga FUNEC, Rua Niterói S/N, Campus Caratinga, (Unidade II), CEP 35300-345, Caratinga/MG, Brazil

^d Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP: 36570-000 Viçosa, MG, Brazil

* Laboratório de Imunomodulação e Parasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
rLiNTPDase2
recombinant
antigen
ELISA
Canine Leishmaniasis

SUMMARY

Canine visceral leishmaniasis (CVL) has been the theme of several studies given the importance of dog as natural reservoir of the pathogen *Leishmania infantum* in endemic regions and its role on dissemination of CVL and human visceral Leishmaniasis (VL). The current immunodiagnosis of CVL has limitations concerning accuracy, specificity and sensitivity. Therefore, improvements are required. rLiNTPDase2 has been previously highlighted as a new recombinant antigen from *L. infantum* to the CVL diagnosis by ELISA assay (rLiNTPDase2-ELISA). In this study, we aimed to evaluate rLiNTPDase2-ELISA in a Phase II study with 651 dog sera samples, also comparing it with methodologies previously established and used in epidemiology surveillance in Brazil, an endemic country of CVL and VL. The rLiNTPDase2-ELISA using standard control sera showed high capability to distinguish between positive and negative sera, sensitivity of 92.6% and specificity of 88.5%. The test was reproducible and the kappa statistics judgement "substantial agreement". rLiNTPDase2-ELISA does not show cross-reactivity with chagasiosis-reagent sera. However, we verified 15.3% of cross-reactivity with Chagas disease-reagent sera. The performance of rLiNTPDase2-ELISA was evaluated using sera samples from vaccinated dogs (Leish-Tec®). The results showed high agreement with parasitological and PCR results (sensitivity of 100.0% and specificity of 91.7%). Furthermore, we compared the performance of rLiNTPDase2-ELISA in CVL-reagent sera samples from endemic areas, which were previously diagnosed using other tests for CVL: immunofluorescent (IFI-LVC-Bio-Manguinhos), IFI-LVC-Bio-Manguinhos coupled to ELISA (EIE-LVC-Bio-Manguinhos) and the Rapid Dual Path Platform® (TR-DPP®-Bio-Manguinhos) coupled to EIE-LVC-Bio-Manguinhos. rLiNTPDase2-ELISA showed high level of concordance with IFI-LVC-Bio-Manguinhos (88.6%) and with IFI-LVC-Bio-Manguinhos coupled to EIE-LVC-Bio-Manguinhos (82.9%) but not with TR-DPP®-Bio-Manguinhos coupled to EIE-LVC-Bio-Manguinhos (33.3%), which casts doubts on the effectiveness of this latest test. In addition, the rLiNTPDase2 antigen adsorbed in 96-well plate was stable enough to be used at least for three months. Taken together, our data confirmed, by Phase II study using hundreds samples, the good potential of rLiNTPDase2-ELISA to be used in the field as a new diagnostic assay for CVL.

1. Introduction

Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by protozoan

parasites of *Leishmania* spp. genus. These diseases are a major concern for public health, classified as tropical neglected diseases by the World's Health Organization (WHO) (Alvar et al., 2012; Otranto and Dantas-

* Corresponding author. DrSouza, A. C. A. Fone: +55 (31) 3612-2464; Fax: +55 (31) 38992374
E-mail addresses: anna.alves@ufv.br, annaalves@gmail.com (A.C.A. de Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105535>

Received 29 January 2020; Received in revised form 8 May 2020; Accepted 8 May 2020

Available online 23 May 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Urea, salts, and Tween 20 influence on adsorption of IgG and *Leishmania* rNTPDase2 to nitrocellulose

Raissa Barbosa de Castro ^a, Anna Cláudia Alves de Souza ^a, Nancy da Rocha Torres Pavione ^b, João Victor Badaró de Moraes ^b, Isadora Cunha Ribeiro ^a, Joice de Melo Agripino ^a, Gustavo Costa Bressan ^a, Raphael de Souza Vasconcellos ^a, Abelardo Silva-Júnior ^c, Juliana Lopes Rangel Fietto ^{a,*}

^a Biochemistry and Molecular Biology Department, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil

^b General Biology Department, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil

^c Veterinarian Department, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Protein adsorption
Adsorption interferents
Nitrocellulose membranes
Lateral flow immunoassay

ABSTRACT

Lateral flow immunochromatography is a widely used technique for immunological assays. Construction of test and control lines is mostly done by antigen adsorption to nitrocellulose membranes, a process not fully understood. This study aimed to evaluate the influence of urea, salts, and Tween 20, on adsorption. The performance of canine IgG in water and in buffer containing urea and salts (pH 8.3) were compared to observe if the interferents would lead to protein stripping when challenged with increasing concentrations of Tween 20 in the lateral flow buffer. Immobilization of the rLnNTPDase2, an antigen for Canine Leishmaniasis diagnosis, was evaluated and compared to the rLbNTPDase2 by the same method. There were no differences between adsorption coefficients of IgG in water and in buffer, but high salt and urea concentrations seems to stabilize and enhance IgG immobilization. Adsorption performance between canine IgG and rNTPDases had different patterns, but was highly similar between rNTPDases, indicating that protein identity may have an important role. Also, low concentrations of Tween 20 in the flow solution may aid the maintenance of rNTPDase2 on the strips. Our results bring insights about protein adsorption and perspectives about the influence of urea, salts and Tween 20 on this process.

1. Introduction

Lateral flow immunochromatography is a technique used to perform immunological assays on solid surfaces. This method has been used for the development of diagnostic tests, given its low cost, easy handling, speed, robustness, independence of equipment and availability for direct point of care use [1–4]. The immunochromatographic system is composed by different matrices, each one with specific roles. Generally, the reaction matrix consists of a nitrocellulose membrane [3,5]. Nitrocellulose is a polymer synthesized by the reaction of cellulose with nitric acid, in which the cellulose hydroxyl groups are replaced by nitrate groups [6]. The main advantages of this material are high protein binding capacity, high capillary flow and low cost [7,8].

The performance of lateral flow devices is highly dependent on the capture agent's immobilization on the test and control lines. The

immobilization has been mostly done by direct adsorption but there is still some debate about the mechanism of this process [9,10]. It has been theorized that it could be a result of hydrophobic interactions between the membrane and hydrophobic regions of the protein, and electrostatic interactions between the dipoles of nitrocellulose nitrate groups and those intrinsic to the protein molecule; both these interactions could be tightened by hydrogen bonds [6,10–12]. It is important to note that these hypotheses are not self-excluding and that they may be more or less involved in the process, according to the specific characteristics of the protein to be immobilized.

Considering the nature of the interactions involved in adsorption, substances that might impose obstacles on the interactions between protein and membrane can be expected as interferents of the binding process. Some of these substances have been reported: for example, reagents that interfere with hydrogen bonding, such as formamide and

* Corresponding author.

E-mail address: jufietto@ufv.br (J.L.R. Fietto).

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114648>

Received 26 January 2022; Received in revised form 3 March 2022; Accepted 7 March 2022

Available online 9 March 2022

0003-2697/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.



Immunomodulatory activity of trifluoromethyl arylamides derived from the SRPK inhibitor SRPIN340 and their potential use as vaccine adjuvant

Flávia Carneiro Mendes^a, Janine Cerqueira de Paiva^a, Elói Quintas Gonçalves da Silva^a, Marcus Rebouças Santos^d, Graziela Domingues de Almeida Lima^a, Gabriela Alves Moreira^a, Lucas Viana Gomes Silva^a, Joice de Melo Agripino^a, Ana Paula Martins de Souza^c, Tiago Antônio de Oliveira Mendes^a, Mariana Machado-Neves^b, Róbson Ricardo Teixeira^c, Abelardo Silva-Júnior^d, Juliana Lopes Rangel Fietto^a, Leandro Licursi de Oliveira^b, Gustavo Costa Bressan^{a,*}

^a Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Viçosa, MG, Brazil

^b Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Viçosa, MG, Brazil

^c Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Viçosa, MG, Brazil

^d Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Viçosa, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Immunomodulator
SRPK inhibition
Vaccine adjuvant
Inflammation

ABSTRACT

The serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) specifically phosphorylate their substrates at RS-rich dipeptides, which are abundantly found in SR splicing factors. SRPK are classically known for their ability to affect the splicing and expression of gene isoforms commonly implicated in cancer and diseases associated with infectious processes. Non-splicing functions have also been attributed to SRPK, which highlight their functional plasticity and relevance as therapeutic targets for pharmacological intervention. In this sense, different SRPK inhibitors have been developed, such as the well-known SRPIN340 and its derivatives, with anticancer and antiviral activities. Here we evaluated the potential immunomodulatory activity of SRPIN340 and three trifluoromethyl arylamide derivatives. In *in vitro* analysis with RAW 264.7 macrophages and primary splenocytes, all the compounds modulated the expression of immune response mediators and antigen-presentation molecules related to a tendency for M2 macrophage polarization. Immunization experiments were carried out in mice to evaluate their potential as vaccine immunostimulants. When administered alone, the compounds altered the expression of immune factors at the injection site and did not produce macroscopic or microscopic local reactions. In addition, when prepared as an adjuvant with inactivated EHV-1 antigens, all the compounds increased the anti-EHV-1 neutralizing antibody titers, a change that is consistent with an increased Th2 response. These findings demonstrate that SRPIN340 and its derivatives exhibit a noticeable capacity to modulate innate and adaptive immune cells, disclosing their potential to be used as vaccine adjuvants or in immunotherapies.

1. Introduction

SRPK are one of the main families of kinases responsible for phosphorylating serine arginine-rich residues, being SR proteins their principal targets. SR proteins are important family of splicing factors, SRPK are known by their capacity of regulating the expression of gene isoforms implicated to cancer [1–3] and diseases associated to infectious processes [4]. In cancer, SRPK modulate the expression of pro-oncogenic isoforms of genes such as VEGF, MKNK2, TGF- β and S6K1, which can

also have a role in the context of immune modulation [5–12]. SRPK activity has also been related to replication capacity of different virus, including hepatitis B virus, human papillomavirus, hepatitis C virus, SARS-CoV, Ebola virus, and herpes simplex virus-1, SARS-CoV-2 [13–21].

SRPK1 and SRPK2 are part of the pathway EGFR/PI3K/AKT/SRPK/SR, which is known to connect the EGF signal to splicing activity in the nucleus [22]. Both SRPK1 and SRPK2 have also been related to NF κ B transcription factor control [11,12,23–25], wherein the most recent

* Corresponding author.

E-mail address: gustavo.bressan@ufv.br (G.C. Bressan).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120849>

Received 17 February 2022; Received in revised form 8 July 2022; Accepted 26 July 2022

Available online 1 August 2022

0024-3205/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.