



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELIZABETH MAGIOLO COSER

IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO FUNCIONAL DE GENES
ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE E RESISTÊNCIA À
PAROMOMICINA EM *Leishmania* spp.

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL VALIDATION OF
GENES ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY AND
RESISTANCE TO PAROMOMYCIN IN *Leishmania* spp.

CAMPINAS
(2024)

ELIZABETH MAGIOLO COSER

**IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO FUNCIONAL DE GENES
ASSOCIADOS À SUSCETIBILIDADE E RESISTÊNCIA À
PAROMOMICINA EM *Leishmania* spp.**

**IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL VALIDATION OF GENES
ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE TO
PAROMOMYCIN IN *Leishmania* spp.**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Doutora em Genética e Biologia Molecular,
na área de Genética de Microrganismos.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the
University of Campinas in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Doctor in
Genetics and Molecular Biology, in the area of
Genetics of Microorganisms.*

Orientador: Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

Coorientador: Prof. Dr. João Marcelo Pereira Alves

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ELIZABETH MAGIOLO COSER,
ORIENTADA PELO PROF. DR. ADRIANO
CAPPELLAZZO COELHO E PELO PROF. DR. JOÃO
MARCELO PEREIRA ALVES

CAMPINAS

(2024)

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

C82i Coser, Elizabeth Magiolo, 1996-
Identificação e validação funcional de genes associados à suscetibilidade e resistência à paromomicina em *Leishmania* spp. / Elizabeth Magiolo Coser. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Adriano Cappellazzo Coelho.
Coorientador: João Marcelo Pereira Alves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Paromomicina. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Resistência a medicamentos. I. Coelho, Adriano Cappellazzo, 1978-. II. Alves, João Marcelo Pereira. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Identification and functional validation of genes associated with susceptibility and resistance to paromomycin in *Leishmania* spp.

Palavras-chave em inglês:

Paromomycin

Leishmania amazonensis

Drug resistance

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Adriano Cappellazzo Coelho [Orientador]

Angela Kaysel Cruz

Maria Fernanda Laranjeira da Silva

Marielton dos Passos Cunha

Marlene Tiduko Ueta

Data de defesa: 18-07-2024

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8664-2009>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5854178258813975>

Campinas, 18 de julho de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho

Prof.^a Dra. Angela Kaysel Cruz

Prof.^a Dra. Maria Fernanda Laranjeira da Silva

Prof.^a Dra. Marlene Tiduko Ueta

Prof. Dr. Marielton dos Passos Cunha

Os membros da Comissão examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

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

Este trabalho é dedicado aos pacientes com leishmaniose e suas famílias, que anseiam por melhores opções de tratamento.

AGRADECIMENTOS

“We cannot change the cards we are dealt, just how we play the hand.”

Agradeço à minha família, aos meus amigos e àqueles que estiveram comigo nos melhores e, principalmente, piores momentos durante todo esse processo. Vocês estavam comigo a todo momento e não me deixaram desistir.

Agradeço a Deus por estar viva e por me permitir ter todas as oportunidades que tive em minha vida. Passei por muitas provas e hoje sei o valor de cada uma delas. O amadurecimento vem com a dor e hoje entendo que ela é necessária para mudanças acontecerem. Essas mudanças foram essenciais para ser o que sou hoje.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano C. Coelho pela oportunidade de ter me aceitado como sua aluna de iniciação científica, mestrado e doutorado. Também agradeço pela orientação e ensinamentos em todos os anos que estive no laboratório. Muito obrigada por acreditar no meu potencial. Acredito que crescemos como profissionais e pessoas juntos e nunca esquecerei disso, pois foi uma parte muito marcante na minha vida.

Ao Prof. Dr. João Marcelo P. Alves e à Profa. Dra. Sandra R. C. Maruyama pelo auxílio nas análises de bioinformática, que foi de extrema importância para alcançar o principal objetivo deste trabalho, e especialmente ao Prof. Dr. João Marcelo pela coorientação e contribuição.

Aos meus pais Paulo e Sonia, por todo o esforço, amor e suporte. Sem vocês, eu não seria nada. Todos esses vinte e sete anos (quase vinte e oito) de amor por mim (e eu por vocês) me ajudaram não apenas a terminar e defender essa tese, mas sempre me esforçar para ser a minha melhor versão todos os dias. Amo muito vocês!

Ao meu namorado, Fernando, que me apoiou, me ajudou a ser quem sou hoje e me amou muito. Sempre esteve comigo nos meus melhores e piores dias. Muitas noites chorando e você sempre lembrando o quão incrível eu posso ser se eu quiser ser. Se agora estou defendendo essa tese, é porque você teve uma grande contribuição nisso. Obrigada por não me deixar desistir e estar sempre ao meu lado. Te amo!

Às minhas amigas Bianca, Cristiele e Stephane, que me acompanharam, me ajudaram e me apoiaram. A amizade de vocês levarei para toda a vida. Sempre torci e sempre torcerei muito pela felicidade de vocês. Nunca esquecerei os dias que convivi com cada uma de vocês. Sempre serei grata a Deus por ter colocado vocês na minha vida. “Com um amigo verdadeiro ao lado, a jornada da vida se torna mais leve e significativa”.

À minha terapeuta, Taisa, que está comigo desde que entrei no mestrado. Com o seu auxílio, hoje entendo a vida um pouco melhor do que entendia há alguns anos. Você viu o pior de mim, mas também viu o melhor. Mesmo me sentindo vulnerável muitas vezes, me senti abraçada por você. Você abriu exceções para me atender e sempre serei grata! Muito obrigada por seu trabalho excepcional, é por causa dele que hoje estou bem e uma pessoa melhor do que era antes.

A todos aqueles que contribuíram para que esse trabalho se concretizasse. Luana e Carol, que além de terem me ajudado, também são amigas incríveis. Muito obrigada por terem me dado a oportunidade de aprender com vocês e por tê-las conhecido. Juliana, que me ajudou muito no meu crescimento profissional e pessoal e que sempre acreditou no meu potencial. Carlos Robello e Gonzalo Greif, que foram parte importante desse projeto. Gostaria de ter aprendido com vocês as técnicas de sequenciamento de nova geração, porém a pandemia inviabilizou essa oportunidade. De qualquer forma, vocês são ótimos profissionais e desejo todo o sucesso. Silvio e Lizandra, que me ajudaram com a microscopia eletrônica com resultados incríveis. Vocês fizeram (e fazem) um excelente trabalho. Yazmin e Steven, que não falam português, mas obrigada por sintetizarem o composto fluorescente que foi usado nos nossos experimentos com resultados muito interessantes descritos nessa tese. Victor, muito obrigada pelo auxílio na correção do manuscrito, suas sugestões melhoraram significativamente nosso trabalho.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Protozoologia, Ticiane, Victor, Leonardo e Guilherme pelo convívio e momentos descontraídos diários.

Aos amigos e colegas do departamento de Biologia Animal, da pós graduação e até mesmo da graduação. Agradeço em especial à Karen por estar sempre por perto, me ajudar em tudo que preciso e ser uma ótima amiga.

Aos funcionários do Departamento, Nilson, Cirene, Victor e Camilo. Cirene se aposentou em 2022, mas nunca esquecerei das nossas conversas e de todo o carinho que sempre teve por mim. Nilson, obrigada por todo o auxílio; sem você nós do laboratório não seríamos nada. Victor e Camilo, obrigada por todo o auxílio técnico e conversas.

Aos professores do Departamento, Marlene, Silmara, Patrícia, Fernando, Fernanda e Danilo. Marlene, muito obrigada pela oportunidade de poder conhecer a senhora, além de todos os seus ensinamentos e momentos de descontração. Silmara, sempre serei grata das vezes que me ajudou e pela pessoa e profissional que você é. Nunca esquecerei de vocês. Patrícia e Fernando, obrigada pela companhia e conversas nos almoços.

Aos professores e funcionários de outros departamentos que permitiram o uso de equipamentos para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma me auxiliaram em todo esse período.

Por fim, não poderia esquecer de dedicar esse trabalho a todos os pacientes com leishmaniose. Vocês sofrem as consequências dessa doença, mas permanecem firmes e esperançosos de que nós, de alguma forma, conseguiremos ajudá-los. Espero que esse trabalho de certa forma contribua para a diminuição do seu sofrimento e permita melhores opções de tratamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro que me forneceu no processo nº 2019/22175-3, em forma de bolsa e reserva técnica. É importante ressaltar que as hipóteses ou conclusões neste material são de minha responsabilidade e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

À rede internacional “*A Global Network for Neglected Tropical Diseases*”, pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa e pelas oportunidades que precederam os resultados que aqui apresentamos. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*"Our greatest glory is, not in never falling,
but in rising every time we fall" – Nelson Mandela*

*"You must be the change you wish to
see in the world" – Mahatma Gandhi*

RESUMO

Identificação e validação funcional de genes associados à suscetibilidade e resistência à paromomicina em *Leishmania* spp.

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e responsáveis por milhares de novos casos reportados anualmente em todo o mundo. O tratamento das leishmanioses possui limitações, que se estendem desde o alto custo e número limitado de fármacos, até efeitos colaterais muitas vezes graves. O crescente aumento de falha terapêutica, associado a emergência de parasitos resistentes, principalmente aos antimoniais, tem sido responsável pela busca de fármacos alternativos e pela implementação de novos esquemas terapêuticos contra a doença. A paromomicina (PM), um antibiótico aminoglicosídeo de baixo custo aprovado para o tratamento da leishmaniose visceral na África e no Sudeste Asiático, tem demonstrado boa eficácia clínica por monoterapia ou em combinação com a anfotericina B e a miltefosina. Além disso, a PM apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* contra espécies endêmicas causadoras da leishmaniose tegumentar no Brasil, principalmente *L. (Leishmania) amazonensis*, a segunda espécie mais prevalente no país e agente etiológico da leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa. Diante do potencial de utilização da PM no tratamento da leishmaniose tegumentar e dos mecanismos de ação e resistência a esse fármaco ainda não estarem completamente elucidados, neste estudo foram geradas linhagens resistentes à PM de *L. (L.) amazonensis* selecionadas por métodos distintos, e que juntamente com isolados clínicos altamente suscetíveis à PM desta mesma espécie, foram caracterizados fenotípica e genotipicamente, com o intuito de identificar potenciais genes relacionados com a suscetibilidade e resistência à PM. As linhagens resistentes selecionadas por mutagênese *in vitro* e pressão seletiva nas formas promastigota e amastigota intracelular do parasito foram consideradas resistentes em ambos os estágios do ciclo de vida do parasito, com exceção da linhagem resistente selecionada por pressão seletiva na forma promastigota, que perdeu a capacidade de infecção no hospedeiro mamífero *in vitro* e *in vivo*. A linhagem resistente selecionada na forma amastigota por pressão seletiva, por outro lado, mostrou alta capacidade infectiva *in vitro* e *in vivo*, e resposta refratária ao tratamento *in vivo* com PM. O sequenciamento do genoma completo das linhagens resistentes à PM, assim como dos isolados clínicos altamente suscetíveis ao fármaco, permitiu identificar polimorfismos genéticos que foram validados funcionalmente e associados ao fenótipo de resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*. Os genes identificados codificam proteínas envolvidas no tráfego de vesículas,

tradução, metabolismo de lipídeos, e metilação de RNA. A identificação dos mecanismos de ação e resistência à PM pode contribuir para a implementação de esquemas de tratamento mais eficientes, além de rastrear o surgimento e disseminação de cepas do parasito resistentes a este fármaco. Finalmente, este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de derivados de aminoglicosídeos mais eficazes para o tratamento da leishmaniose.

ABSTRACT

Identification and functional validation of genes associated with susceptibility and resistance to paromomycin in *Leishmania* spp.

Leishmaniasis is a complex of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which are responsible for thousands of new cases reported annually around the world. The treatment of leishmaniasis has limitations, which range from the high cost and limited number of drugs to serious side effects. The increase in therapeutic failure associated with the emergence of resistant parasites, mainly to antimonials, was responsible for the search for alternative drugs and implementation of new therapeutic schemes against the disease. Paromomycin (PM), a low-cost aminoglycoside antibiotic approved for the treatment of visceral leishmaniasis in Africa and Southeast Asia, has demonstrated good clinical efficacy as monotherapy or in combination with amphotericin B and miltefosine. In addition, PM has *in vitro* and *in vivo* activity against endemic species that cause tegumentary leishmaniasis in Brazil, including *L. (Leishmania) amazonensis*, the second most prevalent species in the country and the etiological agent of localized and diffuse cutaneous leishmaniasis. Given the potential use of PM in the treatment of tegumentary leishmaniasis and the limited knowledge on the mechanisms of action and resistance to this drug, in this study, PM-resistant lines of *L. (L.) amazonensis* were generated using different methodologies of selection and, with clinical isolates highly susceptible to PM from this same species, were phenotypically and genotypically characterized with the aim of identifying potential genes related to susceptibility and resistance to PM. The resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis and stepwise selection at the promastigote and intracellular amastigote stages were considered resistant in both stages of the parasite, with exception of a resistant line selected by stepwise selection at the promastigote stage, which lost the capacity for *in vitro* and *in vivo* infection in the mammalian host. The resistant line selected in the amastigote form by stepwise selection, on the other hand, showed high infective capacity *in vitro* and *in vivo* and a refractory response to *in vivo* treatment with PM. Whole-genome sequencing of PM-resistant lines and clinical isolates highly susceptible to the drug led to the identification of genetic polymorphisms that were functionally validated and associated with the PM resistance phenotype in *L. (L.) amazonensis*. The genes identified encode proteins involved in vesicle trafficking, translation, lipid metabolism, and RNA methylation. Identification of the mechanisms of action and resistance to PM may contribute to the use and implementation of more efficient treatment regimens, in addition to allowing surveillance of the emergence and dissemination of parasites resistant to this drug.

Finally, this study may contribute to the development of more effective aminoglycoside derivatives for the treatment of leishmaniasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AG	Aminoglicosídeo
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AmB	Anfotericina B
AmB-L	Anfotericina B lipossomal
AQP1	Aquagliceroporina
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatases
BCAT	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada
BMDM	Macrófagos derivados de medula óssea
C	Citosina
C5DS	Esterol C-5-desaturase
C14DM	Esterol C-14-alfa-demetilase
C24SMT	Esterol C-24-metiltransferase
Cas	Proteína associada a CRISPR
CDPK1	Proteína quinase dependente de cálcio 1
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas
CRK3	<i>Cdc2-related kinase 3</i>
ddNTP	Dideoxynucleotídeos trifosfatados
D-LDH	D-lactato desidrogenase
dNTP	Desoxynucleotídeos trifosfatos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Concentração de fármaco que inibe a proliferação celular em 50%
FI-PM	PM fluorescente
G	Guanina
Gb	Giga base
HDR	Reparo dirigido por homologia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
InDel	Inserção e deleção
iNOS	Óxido nítrico sintase
kb	Quilobase
kg	Quilograma
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LRV1	Leishmania RNA vírus

LSU	Subunidade maior
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
Mb	Mega base
MF	Miltefosina
mg	Miligrama
MMEJ	Junção mediada por microhomologia
MNNG	Agente mutagênico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
MDR1	Gene de resistência a múltiplos fármacos 1
MNP	Polimorfismo de nucleotídeo múltiplo
MRPA	Proteína de resistência a múltiplos fármacos A
MT	Transportador de miltefosina
NEM	N-etilmaleimida
NGS	Sequenciamento de nova geração
NHEJ	Junção final não homóloga
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
ONT	<i>Oxford Nanopore Technologies</i>
PacBio	<i>Pacific Biosciences RS II</i>
PAM	Motivo adjacente ao protoespaçador
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDF	Proteína polipeptídeo deformilase
PEN	Pentamidina
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar
PM	Paromomicina
PRP1	Proteína de resistência à pentamidina
PTP	Proteína tirosina fosfatase
RBP	Proteína de ligação ao RNA
RISC	Complexo silenciador indutor de RNA
rMETTL	RNAr metiltransferase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAg	RNA guia único
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossômico
RNAt	RNA transportador
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SbIII	Antimonial trivalente
SbV	Antimonial pentavalente
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNV	Variante de nucleotídeo único
SOLiD	<i>Sequencing by Oligo Ligation Detection</i>

SSA	Anelamento de fita simples
SSU	Subunidade menor
T	Timina
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	T <i>helper</i> 1
Th2	T <i>helper</i> 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
μ M	Micromolar
UTR	Região não traduzida

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1 Gênero <i>Leishmania</i>.....	18
1.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>.....	20
1.3 Genética de <i>Leishmania</i>.....	24
1.4 Tecnologias para estudo de genomas de <i>Leishmania</i>.....	27
1.5 Manipulação genética em <i>Leishmania</i>.....	32
1.6 Inseto vetor.....	34
1.7 Leishmanioses.....	36
1.8 Epidemiologia.....	39
1.9 Tratamento das leishmanioses.....	42
1.9.1 Paromomicina.....	48
1.10 Mecanismos de resistência aos fármacos em <i>Leishmania</i>.....	51
2. Justificativa.....	55
3. Objetivos.....	56
4. Resultados.....	57
5. Discussão.....	142
6. Conclusão.....	158
7. Referências bibliográficas.....	160
8. Anexos.....	198
8.1 Certificado da aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	198
8.2 Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio).....	201
8.3 Declaração de direitos autorais.....	203
9. Produção Científica.....	204

1. Introdução

1.1 Gênero *Leishmania*

As leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais consideradas negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Estes organismos são parasitos heteroxenos que pertencem ao supergrupo Excavata, grupo Euglenozoa e subgrupo Kinetoplastea (Lukeš, Butenko et al. 2018, Adl, Bass et al. 2019). Já foram descritas mais de 50 espécies de *Leishmania*, divididas em quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia* (Akhoundi, Kuhls et al. 2016). Lainson e colaboradores descreveram três classificações de *Leishmania*, baseadas no desenvolvimento do parasito no trato intestinal do vetor: hipopilária, peripilária e suprapilária (Lainson, Ready et al. 1979). Os hipopilários (*Sauroleishmania*) se desenvolvem na porção posterior do intestino dos flebotomíneos, enquanto os que possuem comportamento peripilário, pertencentes ao subgênero *Viannia*, estabelecem a infecção inicial na região do intestino posterior, na região pilórica e no intestino médio, migrando para as porções anteriores durante o seu desenvolvimento. Os suprapilários, que pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Mundinia*, se desenvolvem na porção anterior ao piloro do inseto (Lainson, Ready et al. 1979, Paranaíba, Pinheiro et al. 2017, Becvar, Vojtkova et al. 2021). Entre as 30 espécies conhecidas por parasitarem mamíferos, 21 delas são patogênicas ao ser humano (Pace 2014, Akhoundi, Kuhls et al. 2016).

Esses protozoários possuem duas principais formas ao longo do seu ciclo de vida: os promastigotas, que são formas alongadas e com flagelo único móvel, que habitam o interior do tubo digestivo de flebotomíneos fêmea; e os amastigotas intracelulares, que têm forma oval, sem mobilidade e flagelo aparente, estando presentes no interior de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) de mamíferos (Burza, Croft et al. 2018). Os promastigotas metacíclicos, forma infectante para o hospedeiro mamífero, possuem corpo celular fusiforme, flagelo alongado e não se multiplicam (Serafim, Coutinho-Abreu et al. 2021). São móveis e encontrados no lúmen do intestino do inseto, podendo migrar ao longo do intestino anterior e alcançar a faringe e a probóscide, possibilitando a transmissão do parasito durante o repasto sanguíneo do vetor flebotomíneo para o hospedeiro mamífero (Murray, Berman et al. 2005, Pace 2014).

Leishmania, assim como outros tripanossomatídeos, possui organelas exclusivas ao grupo, como os acidocalcissomos e glicossomos. Os acidocalcissomos estão envolvidos na resposta à pressão osmótica e às mudanças de pH, estando presentes em menor quantidade nas formas promastigotas procíclicas e em maiores níveis em promastigotas metacíclicos,

evidenciando a sua importância na infecção do parasito no hospedeiro mamífero. Além disso, os acidocalcisomos são capazes de acumular uma grande quantidade de íons magnésio, zinco e cálcio (Kornberg, Rao et al. 1999, Docampo and Moreno 2001). Os glicosomos, por sua vez, são peroxissomos modificados, com capacidade de compartimentalizar vias metabólicas, como a via glicolítica, β -oxidação de ácidos graxos, biossíntese de pirimidinas e o metabolismo de purinas. Essa compartimentalização das vias metabólicas permite a regulação desse processo, capacitando a célula a enfrentar períodos curtos de anaerobiose e para adaptação a ambientes diferentes, como os encontrados nos diferentes hospedeiros (Michels, Bringaud et al. 2006).

Os tripanossomatídeos também possuem o cinetoplasto, que corresponde ao ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial destes organismos e está presente na mitocôndria única do parasito, localizando-se em posição adjacente ao corpo basal do flagelo. O cinetoplasto é constituído de DNAs circulares: os minicírculos e os maxicírculos, e compõe todo o DNA extranuclear destes organismos (Shapiro and Englund 1995, Lukes, Guilbride et al. 2002). Os maxicírculos contêm os genes que codificam os ácidos ribonucleicos (RNA) ribossomais (RNAr) da mitocôndria, além de alguns genes que codificam proteínas envolvidas no complexo respiratório mitocondrial (Simpson 1997, Simpson, Douglass et al. 2015, Camacho, Rastrojo et al. 2019). Já os minicírculos são compostos por uma região conservada que contém as origens de replicação e uma região variável que contém os genes que codificam os RNAs guias únicos (RNAg), envolvidos no processo de edição dos RNA mensageiros (RNAm) da mitocôndria (Simpson 1997, Simpson, Douglass et al. 2015, Camacho, Rastrojo et al. 2019).

1.2 Ciclo de vida de *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida que envolve formas de desenvolvimento distintas, que são consideradas adaptações às mudanças nas condições ambientais sofridas dentro do hospedeiro mamífero e no inseto vetor, como temperatura, sobrevivência a variações de pH e disponibilidade de nutrientes (Dostálová and Volf 2012). Há alguns anos, acreditava-se que *Leishmania* se reproduzia apenas assexuadamente por divisão binária, entretanto estudos recentes demonstraram que o parasito tem a capacidade de se reproduzir de forma sexuada, havendo troca de material genético entre indivíduos, e que esse processo ocorre no interior do tubo digestivo do vetor flebotomíneo (Inbar, Shaik et al. 2019).

Após realizar o repasto sanguíneo, o vetor flebotomíneo fêmea ingere sangue contendo células do SMF do hospedeiro mamífero infectadas, contendo amastigotas intracelulares do parasito. No interior do tubo digestivo do vetor, os amastigotas sofrem diferenciação em promastigotas procíclicos, que possuem alta capacidade replicativa (Dostálová and Volf 2012). Para escapar das diversas enzimas digestivas no intestino médio do vetor, como por exemplo tripsina, aminopeptidases, glicosidases, carboxipeptidases e quimiotripsina, que são secretadas após a ingestão de sangue, os promastigotas procíclicos escapam do interior do saco alimentar, e mediante interações entre os lipofosfoglicanos (LPGs) presentes na membrana plasmática do parasito e as lectinas presentes no epitélio digestivo do vetor, instalam-se na região do intestino anterior (subgênero *Leishmania*) ou intestino posterior (subgênero *Viannia*) (Pimenta, Modi et al. 1997, Dostálová and Volf 2012, Rogers 2012). Aderidos ao epitélio, os promastigotas se replicam e, após alguns dias, com a redução de nutrientes no intestino, ocorre a diferenciação dos promastigotas procíclicos em promastigotas metacíclicos (Ramalho-Ortigao, Saraiva et al. 2010, Dostálová and Volf 2012). As moléculas presentes na superfície do parasito são alteradas, levando ao desprendimento do parasito do epitélio intestinal do vetor (Ramalho-Ortigao, Saraiva et al. 2010, Serafim, Figueiredo et al. 2012). Os promastigotas metacíclicos livres fazem uma migração retrógrada até as porções anteriores do esôfago do inseto e formam uma substância capaz de obstruir parcialmente a válvula estomodeal, por onde é conduzido o sangue ingerido no próximo repasto sanguíneo. O flebotomíneo fêmea, ao realizar um novo repasto sanguíneo, regurgita saliva e promastigotas metacíclicos (Rogers, Chance et al. 2002, Bates 2007, Rogers and Bates 2007, Serafim, Coutinho-Abreu et al. 2018).

No hospedeiro mamífero, muitos neutrófilos são atraídos precocemente para o local de inoculação dos promastigotas metacíclicos para realizar a fagocitose (Séguin and Descoteaux 2016). Os parasitos fagocitados, em sua maioria, são destruídos no interior do

vacúolo parasitóforo dos neutrófilos. Os promastigotas que se instalam no neutrófilo em compartimentos não líticos retardam a apoptose e prolongam a vida da célula, fazendo com que os parasitos permaneçam viáveis, enquanto os macrófagos e células dendríticas são progressivamente atraídos para o local da infecção. Por terem curto período de vida, os neutrófilos então transferem os parasitos para o interior dos macrófagos, ao serem fagocitados por eles ou por liberarem os parasitos próximos aos macrófagos que chegam ao sítio da lesão (Peters, Egen et al. 2008, Peters and Sacks 2009, Beattie and Kaye 2011, Ribeiro-Gomes, Peters et al. 2012). O ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania* está representado na Figura 1.

Para haver a interação entre a célula hospedeira e o parasito, ocorrem modificações nos domínios da membrana de macrófagos no momento da interação entre os promastigotas metacíclicos e essas células. As principais moléculas responsáveis pelo sucesso da invasão do parasito e seu estabelecimento no interior do vacúolo parasitóforo são a glicoproteína gp63 e os LPGs (Isnard, Shio et al. 2012, Moradin and Descoteaux 2012). Essas moléculas interagem com os receptores do complemento, CR1 e CR3, presentes na membrana dos macrófagos, que é ativado pelo parasito, e por fatores inflamatórios presentes na saliva do inseto. A gp63 está envolvida na infectividade do parasito e na forma como ele vai se ligar à membrana da célula hospedeira, protegendo os amastigotas de degradação no início do processo de entrada e estabelecimento do parasito no ambiente intracelular. Essa molécula converte Cb3 do sistema complemento em uma forma inativa, C3bi. Assim, os promastigotas conseguem escapar da opsonização pelo complemento, evitando a degradação mediada pela via alternativa (Da Silva, Hall et al. 1989, Brittingham, Morrison et al. 1995, Joshi, Kelly et al. 2002, Gómez and Olivier 2010, Isnard, Shio et al. 2012). A presença de LPGs na membrana de promastigotas é determinante para o atraso da fusão dos lisossomos ao vacúolo contendo o parasito. Esta molécula é transportada para a membrana do vacúolo parasitóforo, o que impede a fusão dos lisossomos. Entretanto, o número de moléculas de LPG diminui no processo de diferenciação para a forma amastigota, permitindo assim a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos (Desjardins and Descoteaux 1997, Vinet, Fukuda et al. 2009, Moradin and Descoteaux 2012).

No momento da invasão do parasito, o vacúolo é formado e torna-se acidificado minutos após sua formação. Isto é superado pelo parasito através da ação de uma adenosinatrifosfatase (ATPase) translocadora de prótons presente na membrana do parasito, mantendo o pH neutro no seu interior (Moradin and Descoteaux 2012, Batista, Nájera et al. 2020). Os amastigotas são metabolicamente ativos em pH ácido, conseguindo sobreviver e se dividir no ambiente acidificado do fagolisossomo. O pH ácido e o aumento da temperatura relacionado à temperatura corpórea do mamífero (37 °C) funcionam como fatores

desencadeadores para a diferenciação na forma amastigota do parasito (Podinovskaia and Descoteaux 2015). A acidificação do vacúolo parasitóforo ocorre através do processo de fusão de endossomos e lisossomos, que pode ser acelerada pela secreção de proteinases de cisteína pelo parasito, acelerando assim a aquisição de nutrientes (Burchmore and Barrett 2001). Desse modo, os amastigotas otimizam a utilização de ácidos graxos e aminoácidos como fonte de carbono (McConville, de Souza et al. 2007). Contudo, a membrana externa do parasito é adaptada a resistir ao meio ácido e, ao mesmo tempo, essa membrana possui receptores e canais que permitem a entrada de nutrientes e transportadores de membrana do tipo simporte, para a aquisição de macromoléculas (Burchmore and Barrett 2001).

Como o vacúolo parasitóforo é um ambiente pobre em hexoses, como a glicose, o parasito depende da gliconeogênese para a produção de glicose a partir de outras fontes de carbono (Naderer, Ellis et al. 2006, Naderer, Heng et al. 2010). Quando a gliconeogênese não é o suficiente, a via das pentoses é ativada, além da produção intracelular de mananoligossacarídeos, que são reservas energéticas de curto prazo do parasito (Ralton, Naderer et al. 2003, McConville, de Souza et al. 2007). Além disso, *Leishmania* necessita de transferrina, como fonte de ferro; tripanotona, responsável pela aquisição de nutrientes e atividades metabólicas; e purinas, importantes no desenvolvimento e sobrevivência do parasito ao longo do ciclo de vida, e como fonte nutricional (Oza, Shaw et al. 2005, Laranjeira-Silva, Hamza et al. 2020, Fernández-García, Mesquita et al. 2023).

No macrófago, os amastigotas conseguem inibir funções da célula hospedeira, como a produção de radicais livres, apresentação de antígenos e produção de citocinas, decorrentes da ativação de moléculas imunossupressoras pelos parasitos, como a citocina interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Kane and Mosser 2001, Shio, Hassani et al. 2012, Buxbaum 2013, Abdoli, Maspi et al. 2017). A produção de óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio (ROS) são importantes para a degradação de patógenos no meio intracelular (Van Assche, Deschacht et al. 2011). O ON é produzido através da atividade da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e a atividade dessa enzima pode ser inibida pelos LPGs presentes na superfície do parasito em resposta à produção de interferon gama (IFN- γ) pelos macrófagos infectados (Santos, Andrade et al. 2006, Podinovskaia and Descoteaux 2015). Os parasitos do gênero *Leishmania* ainda são capazes de prevenir a ativação de resposta imune efetiva através da inibição na produção de citocinas (IL-1 e fator de necrose tumoral alfa [TNF- α]) ou a ativação de linfócitos T por IL-12 (Shio, Hassani et al. 2012).

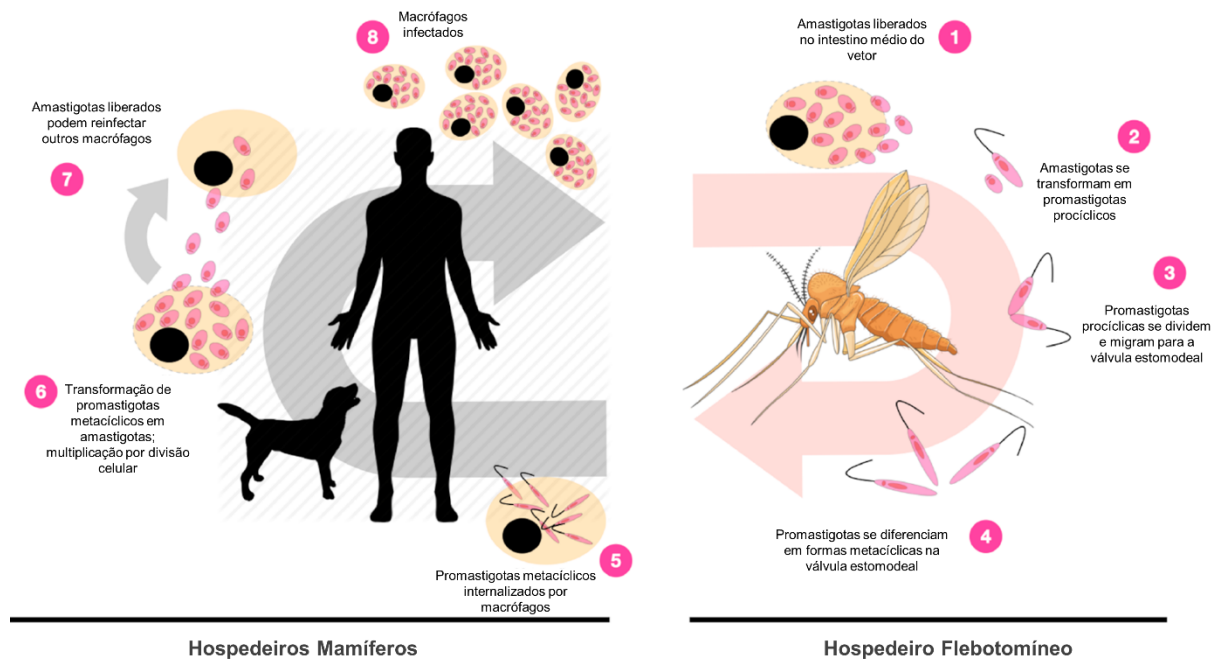


Figura 1. Resumo do ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania* spp. Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, o flebotomíneo fêmea ingere amastigotas intracelulares presentes no interior de células do SMF do hospedeiro que são liberadas no intestino médio do vetor (1). Os amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicos (2), se dividem e migram para a válvula estomodeal do vetor (3), onde se diferenciam em promastigotas metacíclicos (4). Durante um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita os promastigotas metacíclicos no local da picada, que são então fagocitados por células do SMF do hospedeiro (5). Dentro dessas células, ocorre a diferenciação dos promastigotas metacíclicos em amastigotas intracelulares que se multiplicam (6) até o rompimento da célula hospedeira (7). Os amastigotas são liberados e infectam novas células (7-8). O ciclo reinicia-se quando o flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo, ingerindo as células do SMF contendo amastigotas (1). Fonte: (Assis, Andrade-Silva et al. 2021) (modificado).

1.3 Genética de *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* são organismos eucarióticos, anteriormente descritos como diploides e atualmente descritos por apresentarem um genoma aneuploide. Possuem conjuntos de 34 a 36 cromossomos, dependendo da espécie do parasito (Wincker, Ravel et al. 1996, Britto, Ravel et al. 1998, Peacock, Seeger et al. 2007, Mannaert, Downing et al. 2012, Real, Vidal et al. 2013, Llanes, Restrepo et al. 2015). Os cromossomos de *Leishmania*, assim como de outros tripanossomatídeos, não se condensam totalmente ao longo do ciclo celular, o que impede de individualizá-los durante o processo de divisão celular (Belli 2000). Estruturalmente, os genes estão distribuídos ao longo do cromossomo e nas extremidades estão localizadas regiões com sequências repetitivas teloméricas e subteloméricas, que podem variar entre as diferentes espécies e cepas do parasito (Lira, Giardini et al. 2007, Giardini, Segatto et al. 2014).

O genoma de *Leishmania* spp. tem em média 32 mega bases (Mb), cerca de 8.000 genes e um conteúdo G+C em torno de 59%, além de ser altamente conservado entre as espécies e possuir poucos genes espécie-específicos (Peacock, Seeger et al. 2007, Smith, Peacock et al. 2007). Os genes codificadores de proteínas estão organizados em grandes unidades de transcrição policistrônicas. A transcrição ocorre de modo unidirecional a partir de regiões de início da transcrição localizados em regiões de troca de fita, podendo ser divergentes, quando a transcrição ocorre em direção aos telômeros, ou convergentes, quando a transcrição ocorre dos telômeros para o centro do cromossomo (Martínez-Calvillo, Yan et al. 2003). Devido à ausência de promotores de RNA polimerase II, a transcrição por essa polimerase nesses organismos é policistrônica e os RNAm individuais são processados por *trans-splicing* e poliadenilação. O processamento dos RNAm maduros ocorre por meio da adição de um RNA *spliced leader* de 39 nucleotídeos às extremidades 5' de cada RNAm a ser traduzido por *trans-splicing*, que se inicia no sítio acceptor de *trans-splicing*, composto por um dinucleotídeo AG, localizado a jusante de um trato de polipirimidinas, além da poliadenilação da extremidade 3' do gene a montante, processo também mediado pela maquinaria de *trans-splicing* (Liang, Haritan et al. 2003, Mayer and Floeter-Winter 2005, LeBowitz, Smith et al. 1993). As regiões 3' não traduzidas (UTRs) são responsáveis pela estabilidade do RNAm e regulam as taxas de tradução do parasito (Martínez-Calvillo, Vizuet-de-Rueda et al. 2010). Em *Leishmania*, o fim da transcrição ocorre no final de cada unidade de transcrição policistrônica e é determinado pela presença de bases J, uma modificação de timinas por hidroxilação e glicosilação (van Luenen, Farris et al. 2012, Reynolds, Hofmeister et al. 2016, Kieft, Zhang et al. 2020).

Assim como os demais tripanossomatídeos, *Leishmania* apresenta mecanismos distintos de controle de expressão gênica, metabolismo de RNA e organização gênica em comparação com os demais eucariotos. Nestes parasitos a regulação da expressão gênica é pós-transcricional e envolve mecanismos como degradação de RNA, controle traducional e degradação de proteínas (Clayton and Shapira 2007, Grünebast and Clos 2020, Karamysheva, Gutierrez Guarnizo et al. 2020, Abdi Ghavidel, Jajarmi et al. 2022). Por carecer de controle transcricional, esse parasito possui uma variedade de proteínas de ligação ao RNA (*RNA-binding proteins* ou RBP), que auxiliam no controle pós-transcricional da expressão gênica. As RBPs têm papel importante na regulação dos níveis de RNAm causada pela modulação da estabilidade e degradação de RNAm, além de estarem envolvidas na diferenciação do parasito durante os diferentes estágios de vida e sobrevivência nos diferentes hospedeiros (Karamysheva, Gutierrez Guarnizo et al. 2020). Além das RBPs, RNAs não codificantes e sequências conservadas em UTRs atuam na estabilidade do RNAm e na regulação da expressão gênica (Haile, Dupé et al. 2008, Freitas Castro, Ruy et al. 2017, Terrão, Rosas de Vasconcelos et al. 2017).

Os ribossomos são essenciais na síntese de proteínas e cada ribossomo é composto por duas subunidades: uma maior, com coeficiente de sedimentação entre 50S e 60S, e uma menor, com coeficiente que varia entre 30S e 40S (Martínez-Calvillo, Florencio-Martínez et al. 2019). A subunidade maior do ribossomo (LSU) é fragmentada em seis moléculas, sendo duas moléculas maiores (LSU α e LSU β) e quatro moléculas menores (LSU γ , LSU δ , LSU ϵ e LSU ξ). Nessa subunidade, são encontrados RNAr com coeficientes de sedimentação que variam de 5S a 28S (Martínez-Calvillo, Sunkin et al. 2001, Fiebig, Kelly et al. 2015). Na subunidade menor do ribossomo (SSU), é encontrado apenas um RNAr com coeficiente de sedimentação de 16S e 18S (Hernández and Cevallos 2014, Shalev-Benami, Zhang et al. 2016). A síntese de proteínas é mediada por fatores de tradução, que reconhecem o RNAm maduro pela subunidade ribossomal 40S (Martínez-Calvillo, Florencio-Martínez et al. 2019). As modificações pós-traducionais estão envolvidas na regulação da expressão gênica ao influenciar a estabilidade e função de proteínas por processos como fosforilação, acetilação, metilação e glicosilação (Rosenzweig, Smith et al. 2008).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um genoma altamente plástico e, quando em condições desfavoráveis, como sob pressão medicamentosa, pode favorecer a seleção de alterações estruturais no genoma, como por exemplo: aumento ou diminuição do número de cópias dos cromossomos, como aneuploidias, assim como a amplificação ou deleção gênica, variando o número de cópias de *loci* ou genes específicos (Leprohon, Légaré et al. 2009,

Mannaert, Downing et al. 2012, Sterkers, Lachaud et al. 2012, Laffitte, Leprohon et al. 2016, Iantorno, Durrant et al. 2017). A estabilidade e manutenção do número de cromossomos são essenciais para o desenvolvimento de eucariotos, entretanto, para alguns organismos como *Leishmania*, a aneuploidia é fator importante para a rápida adaptação após mudanças ambientais. A existência de sequências repetitivas envolvendo conjuntos de genes e quebras de fita próximas ou dentro dessas sequências pode induzir à recombinação homóloga, associada ao aumento nos rearranjos gênicos (Ubeda, Raymond et al. 2014, Bussotti, Gouzelou et al. 2018, da Silva 2021). O aumento ou diminuição do número de cópias de um gene pode ocorrer pela inserção ou deleção de genes *in tandem* ou criando cópias extracromossomais lineares ou circulares de genes, e pode ocorrer conforme o ganho ou perda de função de alguns genes, em resposta a estresses ambientais ou medicamentosos (Leprohon, Légaré et al. 2009).

Além das variações no número de cópias, existem as variações de nucleotídeo único (SNVs), que são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e inserções e deleções (InDels). Os SNPs que ocorrem em regiões codificantes podem resultar em variantes sinônimas, no qual uma substituição de nucleotídeo não resulta em alteração no aminoácido; não sinônimas ou *missense*, no qual a substituição de nucleotídeos leva a uma alteração no aminoácido; e *nonsense*, no qual a substituição do nucleotídeo resulta em códon de parada e no término prematuro da proteína, geralmente levando a perda da função da proteína (Clark et al., 2019). Já os InDels são inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos que podem resultar em variantes *frameshift*, onde há mudança na fase de leitura; ou variantes não *frameshift*, no qual não há mudança na fase de leitura (Sheetlin, Park et al. 2014).

1.4 Tecnologias para estudo de genomas de *Leishmania*

Os avanços recentes em tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) impulsionaram o melhoramento do sequenciamento e anotação de genomas de referência de várias espécies de *Leishmania*, contribuindo para uma melhor compreensão da biologia do parasito e sua interação molecular com seus hospedeiros. Além disso, essas tecnologias também contribuíram para a compreensão de mecanismos de ação e resistência aos fármacos e desenvolvimento de novos fármacos, ao obter informações ou identificar alterações em potenciais alvos de medicamentos (Woollard, Mehta et al. 2011, Cantacessi, Dantas-Torres et al. 2015, Leprohon, Fernandez-Prada et al. 2015, Rabaan, Bakhrebah et al. 2022).

Os métodos de sequenciamento podem ser divididos em primeira, segunda e terceira gerações. O sequenciamento de Sanger é um método de primeira geração, que oferece boa acurácia de leitura e sequências com comprimentos de até cerca de 1 quilobase (kb). O primeiro método de Sanger baseava-se na adição de dideoxiribonucleotídeos trifosfatados (ddNTP) específicos para síntese de cadeias de DNA, em presença dos quatro desoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs [dATP, dGTP, dCTP e dTTP]) (Sanger, Nicklen et al. 1977, Heather and Chain 2016). A técnica atual, denominada sequenciamento *dye-terminator*, é baseada na utilização de ddNTPs fluorescentes. O produto da reação de PCR é composto por fragmentos de DNA marcados em suas extremidades com o fluoróforo acoplado a cada ddNTP incorporado, o que permite a distinção de cada nucleotídeo. A reação é separada por eletroforese capilar e a intensidade de fluorescência resulta em um eletroferograma, interpretado por *software* especializado (Minton, Flanagan et al. 2011). Este método é custoso e laborioso, porém, mesmo que apresente limitações, o sequenciamento Sanger é também utilizado para corrigir erros de nucleotídeos causados pela incorporação incorreta de bases, que podem ser geradas após montagem de longas sequências de DNA por técnicas de NGS (Hu, Chitnis et al. 2021).

O sequenciamento de segunda geração, como Illumina (Illumina), 454 (Roche), Ion torrent (Thermo Fisher Scientific) e *Sequencing by Oligo Ligation Detection* (SOLiD) (Thermo Fisher Scientific), permitiu a geração de leituras menores que as geradas pelo sequenciamento Sanger, de 50 a 500 pares de base (pb), aumentando a fidelidade de nucleotídeos e diminuindo as taxas de erro, além de diminuir o custo, tempo de reação e permitir o sequenciamento em grande escala. Entretanto, a montagem das sequências com leituras curtas é altamente fragmentada, levando à montagem de centenas a milhares de *scaffolds* (Goodwin, McPherson et al. 2016).

Illumina é a plataforma mais utilizada em estudos genéticos devido ao seu baixo custo, rapidez e rendimento da reação de sequenciamento (Buermans and den Dunnen 2014). As bibliotecas Illumina são geradas em uma superfície de uma célula de fluxo (ou *flow cell*) e os fragmentos gerados são sequenciados por incorporação de nucleotídeos com adaptadores marcados com fluorescência (Goodwin, McPherson et al. 2016). Os sequenciadores Illumina HiSeq (HiSeq2500, HiSeq3000/4000 e HiSeq X) e MiSeq (Miseqv2 e Miseqv3) são os mais utilizados para sequenciamento em grande e menor escala, respectivamente, e utilizam o sequenciamento por síntese (Slatko, Gardner et al. 2018). A plataforma 454 (454 GS Junior, 454 GS FLX Titanium XLR70 e XL+) baseia-se no pirosequenciamento, no qual uma cadeia de DNA é imobilizada e exposta a desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) individuais em presença de uma DNA polimerase, luciferase e ATP sulurilase, ocorrendo a liberação de um pirofosfato, proveniente da adição dos dNTPs. Esse pirofosfato é convertido em ATP pela ATP sulurilase, e a luciferase presente na reação utiliza o ATP para oxidar seu substrato, a luciferina, gerando um sinal luminescente capturado pelo sistema de sequenciamento (Goodwin, McPherson et al. 2016). Devido às altas taxas de erro em regiões homopoliméricas, esse método foi descontinuado (Slatko, Gardner et al. 2018).

A plataforma Ion Torrent (Ion PGM 314, Ion PGM 316, Ion PGM 318, Ion Proton, Ion S5 520, Ion S5 530 e Ion S5 540) se assemelha ao pirosequenciamento, entretanto ao invés de luz, são detectadas as alterações de pH que ocorrem devido à liberação de íons H⁺ à medida que os nucleotídeos são incorporados durante a elongação da reação (Slatko, Gardner et al. 2018). Os homopolímeros ou nucleotídeos múltiplos levam a maior taxa de incorporação de nucleotídeos, emitindo sinais mais fortes, o que leva a taxas de erro no sequenciamento (Slatko, Gardner et al. 2018). Já a plataforma SOLiD (SOLiD 5500 Wildfire e SOLiD 5500 xl) é baseada na hibridização e ligação de sondas com duas bases conhecidas e outras degeneradas a um fragmento de DNA (Goodwin, McPherson et al. 2016). As bibliotecas são geradas a partir da fragmentação do DNA e ligação de adaptadores. Esses fragmentos são ligados a nanoesferas (ou *beads*) e é realizado um PCR em emulsão. Após esse processo, o sequenciamento é realizado e ocorre a hibridização e liberação de fluorescência por fluoróforo (Goodwin, McPherson et al. 2016).

Finalmente, as tecnologias de sequenciamento de terceira geração, como *Pacific Biosciences RS II* (PacBio) e *Oxford Nanopore Technologies* (ONT), permitem o sequenciamento de leituras longas, o que facilitou montagens de alta qualidade a nível de *contigs*. As leituras longas contínuas sequenciadas por ONT alcançam comprimento de N50 de 10 a 100 kb, com acurácia de 87 a 98%, enquanto as leituras de PacBio alcançam comprimento

de N50 de 30 a 60 kb e acurácia de 87 a 92% (Goodwin, McPherson et al. 2016). Os sequenciamentos ONT e PacBio podem abranger regiões repetitivas com uma única leitura contínua, eliminando assim a ambiguidade de nucleotídeos em determinadas posições e o consequente impacto no tamanho do genoma, o que antes era limitado com leituras curtas de segunda geração. Isso permitiu a montagem de genomas menos fragmentados, com poucas ou nenhuma lacuna (Rhoads and Au 2015, Lu, Giordano et al. 2016).

PacBio utiliza a tecnologia de sequenciamento em tempo real de molécula única (ou *single-molecule real-time sequencing*), que permite a visualização da incorporação das bases em tempo real. À medida que as bases são incorporadas, há a liberação de um fluoróforo e sua detecção ocorre em tempo real, além da velocidade da reação de incorporação (Rhoads and Au 2015). Já a plataforma ONT utiliza o sequenciamento em nanoporo, a partir da detecção de sinais elétricos gerados por uma sequência de DNA que atravessa um poro proteico e é gerado um sinal elétrico. A ONT apresenta duas principais opções: o MinION, reduzido em tamanho e portátil, capaz de sequenciar longos fragmentos de DNA, em torno de 50 giga bases (Gb); e o PromethION, com capacidade para várias reações e mais nanoporos por célula, com média de 300 Gb de dados gerados. Os outros equipamentos ONT são o GridION e Flongle, que geram mais de 240 Gb e 2,8 Gb de dados, respectivamente (Lu, Giordano et al. 2016, Oxford Nanopore Technologies, 2024). As principais características das plataformas de NGS estão apresentadas na Tabela 2.

A Iniciativa Genoma de *Leishmania* foi lançada em 1994 e reuniu vários laboratórios para realizar o sequenciamento do genoma da cepa Friedlin de *L. (L.) major*, publicado em 2005 (Ivens, Peacock et al. 2005). A introdução de sequenciamentos de segunda, terceira e quarta gerações permitiu a remontagem dos genomas de outras espécies de *Leishmania* já sequenciados, o que levou ao melhoramento das sequências disponíveis e informações estruturais (Downing, Imamura et al. 2011, Rogers, Hilley et al. 2011, González-de la Fuente, Peiró-Pastor et al. 2017). Essas estratégias de montagens *de novo* (“desde o princípio” em latim) de genomas avançaram com o aparecimento de novas tecnologias de sequenciamento e podem resultar em montagens com apenas leituras curtas ou leituras longas, ou uma montagem híbrida contendo ambas as leituras. A montagem de genomas com leituras curtas é caracterizada pelo alto número de sequências fragmentadas e alta acurácia a nível de nucleotídeo. Já a montagem com leituras longas diminui drasticamente o número de sequências fragmentadas, entretanto pode haver uma taxa de erro maior de nucleotídeos comparados com o sequenciamento de leituras curtas. Por fim, a montagem híbrida de genomas, utilizando leituras curtas e longas, faz com que os *contigs* de baixa cobertura oriundos da montagem de

leituras longas sejam cobertos com leituras curtas, permitindo aumentar a fidelidade a nível de nucleotídeo (Goodwin, McPherson et al. 2016).

Tabela 2. Características das plataformas de NGS.

	Plataforma de NGS					
	Illumina	454	Ion Torrent	SOLiD	PacBio	Nanopore
Tipo de leitura	Curta	Curta	Curta	Curta	Longa	Longa
Abordagem de sequenciamento	Síntese / Detecção de fluorescência	Síntese / Pirosequenciamento	Síntese / Detecção de prótons	Ligação / Marcação de sondas	Tempo real de molécula única / Detecção de fluorescência	Tempo real de molécula única / Nanoporo
Tamanho médio de leituras (pb)	25-300	600-1.000	200-400	50-75	8.000-20.000	>200.000
Acurácia (%)	99-99,9	99	99	99,9	87	88
Rendimento (Mb)	540-750.000	35-700	30-15.000	80.000-320.000	500-7.000	1.500 a >4.000.000
Vantagens	Alta precisão, sequenciamento de múltiplas amostras simultaneamente, baixo custo	Leituras pouco maiores que os demais sequenciamentos de leituras curtas	Tempo de reação curto, alta capacidade, custo reduzido	Maior especificidade, menor taxa de erros	Leituras longas, detecção sem amplificação prévia por PCR	Leituras ultralongas, análise de dados em tempo real, portabilidade de dispositivos como MinION, sem amplificação prévia por PCR
Limitações	Leituras curtas, baixa precisão em regiões repetitivas ou ricas em GC e AT, bases falso-positivas	Taxas de erro em inserções e deleções em regiões homopoliméricas, alto custo	Taxas de erro em regiões homopolimérica, menor precisão, leituras curtas	Leituras muito curtas, erros de substituição em regiões ricas em GC	Maior taxa de erro, alto custo	Maior taxa de erro, problemas na precisão da base gerada, alto custo (PromethION)
Referências	(Nakamura, Oshima et al. 2011)	(Harrington, Lin et al. 2013)	(Merriman and Rothberg 2012)	(Goodwin, McPherson et al. 2016)	(Rhoads and Au 2015)	(Goodwin, Gurtowski et al. 2015, Lu, Giordano et al. 2016, Wang, Zhao et al. 2021)

Legenda: pb, pares de bases; Mb, mega bases.

1.5 Manipulação genética em *Leishmania*

Nos últimos anos, os métodos de manipulação genética em *Leishmania* utilizados para entender o papel dos genes envolvidos em diversas vias metabólicas e constitutivas do parasito se expandiram. Após o estabelecimento da técnica de transfecção e de recombinação homóloga, novas técnicas foram adotadas, como CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas), DiCre recombinase (Cre recombinase dimerizável), RNA de interferência (RNAi) e *tagging* de proteínas (Duncan, Jones et al. 2017). O sistema CRISPR/Cas é uma maquinaria de defesa de bactérias e Archaea, semelhante ao sistema imune adaptativo em eucariotos multicelulares, que permite sua proteção contra a invasão de elementos genéticos indesejados, como plasmídeos, transposons e bacteriófagos (Horvath and Barrangou 2010). CRISPR são sequências repetidas e espaçadoras intercaladas que, juntamente a um conjunto de genes próximo ao *locus* CRISPR, nomeado como genes *Cas* (*CRISPR associated protein* ou proteína associada a CRISPR) e composto por helicases, polimerases e nucleases, e sequências espaçadoras, são responsáveis pela clivagem da sequência-específica de DNA do vírus ou outros elementos genéticos (Liu, Lin et al. 2022). CRISPR/Cas9 é um sistema do tipo II, no qual o gene Cas9 é o único gene necessário para a clivagem do DNA invasor, baseando-se no domínio PAM (*Protospacer Adjacent Motif* ou Motivo Adjacente ao Protoespaçador), sequência curta de geralmente 2 a 5 nucleotídeos (Liu, Lin et al. 2022). Essa técnica de edição genética se baseia no direcionamento da Cas9 até o alvo específico por meio de um pequeno RNAg e clivagem da dupla fita de DNA na região interna. O DNA alvo, região de DNA na qual ocorrerá a clivagem pela Cas9, possui uma sequência PAM e o alvo propriamente dito. Cada RNAg tem aproximadamente 20 nucleotídeos, que irá direcionar a Cas9 até a sequência-alvo complementar. O complexo Cas9-RNAg interage com o alvo apenas na presença do motivo PAM e leva à alteração na estrutura da proteína, com formação do domínio de interação com a sequência PAM (Manghwani, Lindsey et al. 2019).

Essa técnica foi recentemente adaptada em *Leishmania* e consiste na expressão endógena do gene *Cas9*, seja integrado ou por meio de uma construção episomal; o RNAg que contém uma sequência complementar ao gene alvo, e o DNA doador. A enzima Cas9 e o RNAg formam um complexo ribonucleoproteico, que reconhece o DNA alvo e gera uma quebra da fita dupla seguida do reparo do DNA (Beneke, Madden et al. 2017). Em tripanossomatídeos, a quebra de fita dupla é reparada

por junção mediada por microhomologia (MMEJ), associação de fita simples (SSA) ou reparo dirigido por homologia (HDR). A junção de extremidades não homólogas (NHEJ) está ausente em *Leishmania* (Duncan, Jones et al. 2017, Zhang and Matlashewski 2019). A quebra de dupla fita é reparada com a molécula do DNA doador, principalmente por HDR (Zhang and Matlashewski 2019). O sistema CRISPR/Cas9 pode ser classificado como um sistema estável ou transitório, dependendo da expressão da Cas9 e/ou RNAg (Zhang, Lypaczewski et al. 2020).

DiCre recombinase é um sistema de recombinação derivado do bacteriófago P1 e baseia-se na indução da excisão de DNA flanqueado por duas sequências de 34 nucleotídeos, denominadas *LoxP*, pela enzima Cre (Nagy 2000). A dimerização da enzima Cre permite a regulação da ativação da enzima, expressa em duas subunidades inativas Cre59 e Cre60 fundidas aos peptídeos FRB e FKBP, que ao se ligarem à rapamicina, reestabelecem a atividade enzimática da Cre recombinase (Jullien, Sampieri et al. 2003, Santos, Silva et al. 2017). Em *Leishmania*, essa técnica foi utilizada para deletar genes essenciais do parasito, como o gene *CRK3* (*Cdc2-related kinase 3*) (Duncan, Myburgh et al. 2016). Esse método de deleção gênica em *Leishmania* requer a integração de cassetes de expressão contendo genes de resistência a antibióticos (Damasceno, Tosi et al. 2019, Duncan, Myburgh et al. 2019).

A metodologia de RNAi é utilizada para avaliar a regulação negativa da expressão gênica e funciona pela expressão de enzimas semelhantes a Dicer (DCL1 e DCL2), que clivam o RNA de fita dupla longa em pequenos RNAi de fita simples. Esses pequenos RNAi são processados pela enzima Argonauta, formando o complexo silenciador indutor de RNA (RISC), para degradar o transcrito (Kolev, Tschudi et al. 2011). Em *Leishmania*, o sistema de RNAi não é funcional em parasitos do subgênero *Leishmania* devido à ausência das proteínas Dicer e Argonauta. Por outro lado, essa maquinaria é funcional em parasitos do subgênero *Viannia* e pode ser utilizada para a análise funcional de genes nas espécies deste subgênero (Lye, Owens et al. 2010).

A localização de proteínas para investigação de seus possíveis papéis em processos biológicos em *Leishmania* pode ser feita por *tagging*, por meio de expressão da proteína em vetores de expressão episomal ou marcação na região C ou N-terminal de genes endógenos (Dean, Sunter et al. 2015). A marcação de genes com marcadores fluorescentes atualmente pode ser realizada pela tecnologia de CRISPR/Cas9, o que permite a integração eficiente de cassetes de 30 pb próximo à região de quebra da dupla fita de DNA (Beneke, Madden et al. 2017).

1.6 Inseto vetor

Os flebotomíneos são artrópodes que pertencem à classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. No mundo, foram descritas até o momento aproximadamente 1.000 espécies de flebotomíneos, sendo que cerca de 10% destas espécies são vetores potenciais ou comprovados das leishmanioses (Shimabukuro, de Andrade et al. 2017). Esses insetos estão presentes em zonas quentes da África, Américas, Oceania, Europa e Ásia (Killick-Kendrick 1999). Embora não exista um consenso quanto à classificação dos flebotomíneos, estes podem ser divididos em seis gêneros, sendo eles: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Chinius*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* (Akhoundi, Kuhls et al. 2016, Shimabukuro, de Andrade et al. 2017). Nas Américas, mais de 50 espécies de flebotomíneos, todas pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, estão envolvidas na transmissão de 15 espécies de *Leishmania*: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) venezuelensis*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) garnhami*, *L. (V.) pifanoi*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum* (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo et al. 2017). Os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* incluem as espécies antropofílicas, relevantes para a transmissão da doença em humanos. A maioria das espécies de flebotomíneos é exofágica, ou seja, realizam a hematofagia fora do domicílio, apesar de algumas espécies serem conhecidas por serem endofágicas e endofílicas, que repousam e realizam a hematofagia dentro do domicílio e peridomicílio (Killick-Kendrick 1999).

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, no qual o desenvolvimento ocorre a partir de ovos que originam as larvas, pupas e adultos (Ready 2013). A ovoposição das fêmeas ocorre no solo, onde as larvas eclodem e se alimentam de matéria orgânica e passam por quatro estádios (Cecílio, Cordeiro-da-Silva et al. 2022). Posteriormente, as larvas se transformam em pupas, que se fixam ao substrato e não se alimentam (Cecílio, Cordeiro-da-Silva et al. 2022). A umidade e a temperatura são fatores que influenciam o desenvolvimento dos flebotomíneos (Benkova and Volf 2007, Erguler, Pontiki et al. 2019). Os insetos adultos são pequenos, apresentam uma cabeça pequena e alongada e seu aparelho bucal é do tipo sugador-picador, com asas lanceoladas e corpo revestido por cerdas (Killick-Kendrick 1999). As antenas são longas e localizam-se entre os olhos; o aparelho bucal de machos é rudimentar, não sendo capazes de perfurar a pele de vertebrados e nem de se alimentar de sangue (Galati, 2019). Os flebotomíneos adultos

estão adaptados a viverem em ambientes úmidos e escuros e se alimentam de fontes naturais de açúcar, como a seiva de plantas e secreções de pulgões de plantas (Killick-Kendrick and Killick-Kendrick 1987, Cameron, Pessoa et al. 1995). As fêmeas também necessitam da alimentação sanguínea para a ovogênese. A expectativa de vida dos machos é de cerca de uma semana na natureza, enquanto as fêmeas podem viver por mais tempo, pois passam por um a três ciclos gonotróficos (Killick-Kendrick 1999, Ready 2013). A atividade sazonal desses insetos adultos é afetada principalmente pela precipitação e temperatura e, em sua maioria, possuem hábitos crepusculares e noturnos (Maroli, Feliciangeli et al. 2013).

Os critérios para considerar um vetor como potencial transmissor de uma doença são: ser oportunista, ou seja, se alimentar de sangue humano e de outros animais; se alimentar de hospedeiros reservatórios relevantes em casos de zoonoses; ser encontrado na natureza infectados com o mesmo parasito circulante em humanos de uma mesma área geográfica; permitir o desenvolvimento completo do parasito em seu interior; e ser capaz de transmitir o parasito a hospedeiros suscetíveis ao realizar o repasto sanguíneo (Ready 2013).

1.7 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas que podem se apresentar em duas principais manifestações clínicas: a forma visceral, que acomete órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea; e a forma tegumentar, que acomete a pele e as mucosas (Burza, Croft et al. 2018). As manifestações das diferentes formas clínicas da leishmaniose no homem estão relacionadas com a espécie do parasito infectante e da resposta imune do hospedeiro humano (Burza, Croft et al. 2018, Ait Maatallah, Akarid et al. 2022).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave das leishmanioses, podendo ser letal se não tratada. Ela é caracterizada pela presença de febre, perda de apetite, perda de peso e hepatoesplenomegalia. No Brasil, a LV é causada por *L. (L.) infantum*. Já a leishmaniose tegumentar (LT) pode se apresentar em quatro formas clínicas distintas: cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LD), mucocutânea (LMC) ou cutânea difusa (LCD) (Reithinger, Dujardin et al. 2007, Burza, Croft et al. 2018). A LCL é caracterizada pelo aparecimento de uma ou mais lesões ulceradas que causam cicatrizes permanentes, geralmente atróficas. Além de úlceras, em alguns casos pode ocorrer o aparecimento de lesões verrucosas, nodulares ou acneiformes (Scorza, Carvalho et al. 2017). No Brasil, essa manifestação pode ser causada principalmente por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, além de outras espécies endêmicas no país, como *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi*. A LD é definida pela presença de várias lesões mistas, sejam elas ulceradas, papulosas, nodulares ou acneiformes em duas ou mais regiões do corpo e é causada por *L. (V.) braziliensis*. A maioria dos indivíduos com essa forma da doença apresentam disseminação generalizada, que também pode levar ao aparecimento de lesões mucosas (Turetz, Machado et al. 2002, Goto and Lindoso 2010, Scorza, Carvalho et al. 2017). A LMC é causada principalmente por *L. (V.) braziliensis* e em menor proporção por *L. (V.) guyanensis* e leva ao acometimento das mucosas, como boca, palato e faringe e perfuração do septo nasal (Machado-Coelho, Caiaffa et al. 2005, Amato, Tuon et al. 2008, Goto and Lindoso 2010). Por fim, a LCD é caracterizada pelo aparecimento de múltiplos nódulos não ulcerados em regiões extensas do corpo e está relacionada com a deficiência da resposta imune do indivíduo aos antígenos do parasito (Goto and Lindoso 2010). Essa forma clínica é refratária aos tratamentos disponíveis e é causada por *L. (L.) amazonensis*.

As espécies de *Leishmania* que causam a LT são denominadas dermatrópicas, enquanto as que causam a LV são viscerotrópicas. A transmissão de espécies

dermotrópicas e viscerotrópicas ocorre de forma distinta, através da geração de uma ação diferencial no comportamento alimentar do vetor, levando a liberação variável de parasitos, que conseqüentemente pode influenciar a imunidade local da pele e o curso da infecção (Maia, Seblova et al. 2011, Ribeiro-Romão, Moreira et al. 2014, Rostamian, Jafari et al. 2018). A saliva de vetores que transmitem espécies dermotrópicas tem capacidade vasodilatadora menor em comparação com as espécies de vetores que transmitem parasitos viscerotrópicos (Warburg, Saraiva et al. 1994). Foi sugerido que os promastigotas regurgitados por flebotomíneos contendo saliva sem atividade vasodilatadora são abrigados por monócitos dérmicos residentes, levando a lesões cutâneas, enquanto os parasitos de espécies viscerotrópicas regurgitados por flebotomíneos contendo saliva com atividade vasodilatadora infectam monócitos circulantes que se infiltraram no local da picada, o que favorece a visceralização da infecção (Warburg, Saraiva et al. 1994).

A resposta imune do hospedeiro também pode afetar o tropismo do parasito. As espécies viscerotrópicas induzem resposta T *helper* 2 (Th2), enquanto espécies dermotrópicas geralmente induzem resposta T *helper* 1 (Th1) (Gradoni and Gramiccia 1994, Gradoni, Gramiccia et al. 2004). Os monócitos do hospedeiro reduzem a sobrevivência do parasito na pele e estimulam a disseminação da infecção ou aumentam a proliferação dos parasitos após indução de resposta Th2 através da produção de IL-4 (Scorza, Carvalho et al. 2017). A resposta de IFN- γ , principal citocina envolvida na resposta Th1, está associada aos casos de LT (Kariyawasam, Selvapandiyani et al. 2018). Os níveis elevados de IFN- γ e níveis baixos de IL-10 foram detectados em esplenócitos e linfócitos infectados com *L. (L.) donovani* de caráter dermotrópico (Kariyawasam, Selvapandiyani et al. 2018). Alterações na composição de LPGs do parasito podem resultar em alta resposta pró-inflamatória em casos de *L. (L.) infantum* de caráter dermotrópico (Cardoso, Araujo et al. 2020). Estudos indicam que as diferentes espécies de *Leishmania* alteram diferencialmente a capacidade de migração de células do SMF ao local da picada. A citocina anti-inflamatória IL-10 diminui a produção de IL-17 pelas células de pacientes com LT, levando à diminuição no recrutamento de neutrófilos e produção de mediadores inflamatórios, o que acarreta a redução da disseminação do parasito (Oliveira, Ribeiro et al. 2014). Além disso, espécies viscerotrópicas suportam temperaturas superiores em comparação às espécies dermotrópicas, uma vez que as vísceras apresentam temperatura superior à pele (Callahan, Portal et al. 1996, Quiñonez-Díaz, Mancilla-Ramírez et al. 2012). As espécies viscerotrópicas também apresentam

composição lipídica diferente de espécies dermatrópicas, o que permite a sobrevivência e proliferação dessas espécies nas vísceras (Zhang and Matlashewski 2001, Zhang, Mendez et al. 2003, Negrão, Abánades et al. 2017, Lypaczewski, Hoshizaki et al. 2018).

A imunossupressão, com ênfase à coinfeção das leishmanioses com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), tem sido relacionada com o aumento do risco de severidade e manifestação clínica das leishmanioses, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de LCD e LMC, além de aumentar a probabilidade de recaídas e falha terapêutica (van Griensven, Carrillo et al. 2014). Como o HIV e *Leishmania* infectam as mesmas células do hospedeiro, fagócitos como macrófagos e células dendríticas, além do vírus também infectar linfócitos T CD4+, ambos os patógenos podem aumentar reciprocamente a sua multiplicação (Garg, Trudel et al. 2007, Alvar, Aparicio et al. 2008). A coinfeção induz aumento da carga do HIV e progressão da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) através do aumento da produção de citocinas induzidas pelo parasito, além das alterações imunológicas causadas pelo vírus favorecerem a multiplicação do protozoário (Zhao, Papadopolou et al. 2004, Alvar, Aparicio et al. 2008). No caso de coinfeção, os parasitos perdem o tropismo com o aumento da imunossupressão do hospedeiro, podendo levar a visceralização de espécies dermatrópicas, agravar a progressão da doença causada por espécies viscerotrópicas ou ainda apresentar manifestações cutâneas e viscerais concomitantes (Alvar, Cañavate et al. 1997, Alvar, Aparicio et al. 2008, Jafari, Hajiabdolbaghi et al. 2010, Zijlstra 2014, Liautaud, Vignier et al. 2015).

1.8 Epidemiologia das leishmanioses

Nas últimas décadas, foi observada a reemergência de muitas doenças transmitidas por vetores já conhecidas, como as leishmanioses. O ressurgimento dessas doenças pode estar associado a alterações climáticas e ecológicas que favorecem o aumento na densidade populacional de vetores flebotomíneos, além de sua adaptação aos ambientes peridomésticos, como o crescente desmatamento, construção de barragens, irrigação e urbanização em áreas florestais, introduzindo a doença nas cidades e modificando o perfil rural da doença (Rangel and Vilela 2008, Colwell, Dantas-Torres et al. 2011). Além dessas alterações, o aumento na migração humana permitiu a propagação de agentes infecciosos em áreas nas quais até então estavam ausentes, com aumento considerável em áreas urbanas (Jeronimo, Duggal et al. 2004, Oliveira, Lacerda et al. 2004, Colwell, Dantas-Torres et al. 2011).

As leishmanioses são doenças infecciosas que ocorrem em áreas tropicais e subtropicais do globo e são endêmicas em mais de 100 países da Europa, Ásia, África e Américas, sendo consideradas um problema de saúde pública. No mundo, cerca de 350 milhões de pessoas estão sob risco de adquirir leishmaniose e 700.000 a 1 milhão de novos casos são notificados por ano (WHO, 2023, Alvar, Vélez et al. 2012). A doença afeta as classes mais pobres da população em países em desenvolvimento, que têm dificuldade em obter diagnóstico e tratamento adequados. Os tratamentos mais eficazes muitas vezes não estão disponíveis ou são inacessíveis para pacientes em áreas endêmicas. O número de casos reportados de LV anualmente é de cerca de 50.000 a 90.000, com apenas 25 a 45% reportados à OMS. Em 2022, em torno de 85% dos novos casos foram reportados no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2023).

A forma tegumentar é a forma mais prevalente da doença, com uma estimativa de 600.000 a 1 milhão de novos casos por ano em todo o mundo (WHO, 2023). Na LCL, 95% dos casos reportados ocorrem nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central e mais de 85% de novos casos foram reportados no Brasil, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Irã, Iraque, Peru e Síria (WHO, 2023). Já para a LMC, mais de 90% dos casos foram reportados na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2023). Estudos têm reportado um aumento do número de casos de infecção na região Amazônica, por outras espécies do parasito, como *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi*, cujas infecções cutâneas não apresentam cura espontânea e a eficácia do tratamento nem sempre é satisfatória (Fagundes-Silva, Romero et al. 2015, Cantanhêde, Mattos et al. 2019).

As leishmanioses são doenças de caráter antroponótico e podem ser divididas em dois grupos epidemiológicos principais: zoonótica e antroponótica (Steverding 2017). A leishmaniose zoonótica é causada por quatro espécies de *Leishmania* [*L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (M.) martiniquensis*] na África, Ásia, Oceania e Europa e 15 espécies do parasito nas Américas. A leishmaniose antroponótica é restrita à Europa, África, Ásia e Oceania e é causada por duas espécies de *Leishmania* [*L. (L.) donovani* e *L. (L.) tropica*] (Steverding 2017). Além disso, essa doença apresenta ciclos de transmissão silvestre, periurbana e rural. A transmissão silvestre ocorre em áreas de vegetação primária, enquanto a transmissão periurbana acontece quando houve adaptação do vetor ao peridomicílio e a transmissão rural ocorre em áreas de matas residuais. Além do ser humano, seus principais hospedeiros mamíferos são canídeos, roedores e marsupiais (Bern, Maguire et al. 2008, Alvar, Vélez et al. 2012).

Nas Américas, os hospedeiros reservatórios são mamíferos silvestres e sinantrópicos, considerados como fonte de infecção para o parasito, permitindo sua manutenção por um longo período e sua transmissão para outros hospedeiros, incluindo o ser humano (Roque and Jansen 2014). Para um animal ser incriminado como reservatório, este deve apresentar capacidade de infectar flebotomíneos experimentalmente, serem abundantes durante longo período e com longa duração de vida, além de apresentarem comportamento gregário, ou seja, viverem agrupados com outros animais, e serem capazes de sobreviver durante o período em que não ocorre a transmissão (Haydon, Cleaveland et al. 2002, Roque and Jansen 2014). Os hospedeiros reservatórios primários ou naturais raramente apresentam sinais da doença, enquanto alguns animais domésticos e pequenos roedores podem ser considerados como reservatórios secundários, uma vez que podem ser fonte de infecção para flebotomíneos, mas não são capazes de manter o ciclo de transmissão natural por um longo período (Ashford 1996).

O principal reservatório primário de *L. (L.) amazonensis*, espécie do parasito com distribuição geográfica no Brasil, Colômbia, Bolívia, Paraguai e Guiana Francesa em áreas florestais primárias e secundárias da Amazônia, é o rato-de-espinho *Proechimys guyanensis*, além de outros roedores, marsupiais e raposas dos gêneros *Proechimys*, *Oryzomys*, *Nectomys*, *Neacomys*, *Dasyprocta*, *Marmosa*, *Metachirus*, *Didelphis*, *Micoaureus*, *Philander* e *Cerdocyon* (Lainson and Shaw 1968, Lainson and Shaw 1974, Lainson, Shaw et al. 1981, Dedet, Pajot et al. 1985, Kerr, Emmons et al. 2006, Quintal, Ribeiro Ede et al. 2011, Cardoso, de Araújo et al. 2015, Lainson, 2010). Já *L. (V.)*

braziliensis tem sido reportada na maioria dos países da América Latina e pode ser encontrada em mamíferos silvestres, como roedores, marsupiais e xenartros dos gêneros *Necromys*, *Nectomys*, *Rattus*, *Akodon*, *Proechimys*, *Dasyprocta*, *Kannabateomys*, *Agouti*, *Oryzomys*, *Rhipi*, *Sigmodon*, *Didelphis*, *Micoureus* e *Choloepus* (Mayrink, Williams et al. 1979, Herrer and Christensen 1980, Lainson, Shaw et al. 1981, Rocha, Melo et al. 1988, De Lima, De Guglielmo et al. 2002, Brandão-Filho, Brito et al. 2003, Marcelino, Ferreira et al. 2011, Quintal, Ribeiro Ede et al. 2011, de Freitas, D'Andrea et al. 2012, Andrade, Courtenay et al. 2015, Silva, Alves et al. 2016, Pereira, Ferreira et al. 2017, Marinho-Júnior, Monteiro et al. 2023, Lainson, 2010). O cão doméstico é considerado como o principal reservatório doméstico de *L. (L.) infantum*, entretanto, já foram reportados casos desses animais naturalmente infectados por espécies de *Leishmania* que causam a LT em humanos (Reithinger and Davies 1999, Madeira, Schubach et al. 2006, Castro, Thomaz-Soccol et al. 2007, Dantas-Torres 2007, Tolezano, Uliana et al. 2007, Dantas-Torres 2009).

1.9 Tratamento das leishmanioses

Até o momento, nenhuma vacina protetora contra a leishmaniose em humanos foi aprovada. Em ausência de vacina, a quimioterapia é a única alternativa de controle disponível. No Brasil, os principais fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B (AmB), a pentamidina (PEN), além da miltefosina (MF), o primeiro fármaco oral aprovado para o uso clínico em humanos (Croft and Olliaro 2011, SUS, 2018). Além deste número limitado de fármacos disponíveis para o tratamento da doença no Brasil, esses fármacos apresentam uma série de limitações como toxicidade, custo do tratamento e administração parenteral, com exceção da MF (Uliana, Trinconi et al. 2018). No Brasil, os antimoniais são a primeira alternativa de tratamento tanto para a LT quanto para a LV, embora a resposta clínica seja altamente variável, chegando a taxas de cura de cerca de 50% em infecções por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, por exemplo (Machado, Ampuero et al. 2010, Chrusciak-Talhari, Dietze et al. 2011). No caso da LV, as taxas de cura chegam a 90% dos casos e relatos de cardiotoxicidade e hepatotoxicidade têm sido reportados (Burza, Croft et al. 2018) (Tabela 1). No distrito de Bihar na Índia, por exemplo, onde a LV é endêmica, as doses de antimoniais utilizadas para o tratamento aumentaram significativamente nos últimos 50 anos e as taxas de cura não atingem mais do que 50% dos pacientes tratados (Sundar 2001), o que fez com que esse fármaco fosse descontinuado para o tratamento desta forma clínica na Índia (Sundar, More et al. 2000, Burza, Croft et al. 2018). Os antimoniais são considerados pró-fármacos, pois sua formulação pentavalente (SbV) é convertida para a forma ativa trivalente (SbIII). Apenas os amastigotas intracelulares fazem essa conversão, sendo assim considerado um fármaco com ação estágio-específico, sendo também convertido pelos macrófagos (Croft, Sundar et al. 2006, Haldar, Sen et al. 2011). O SbIII inibe a tripanotiona redutase do parasito, que participa da detoxificação contra o dano oxidativo, além de levar à fragmentação do DNA do parasito (Serenio, Holzmuller et al. 2001, Ferreira Cdos, Martins et al. 2003, Yan, Li et al. 2003).

A AmB é um antibiótico antifúngico, derivado de *Streptomyces nodosus* (Ellis 2002), e é considerado como o fármaco de segunda escolha para o tratamento da LT e LV ou usado como primeira escolha em pacientes coinfectados HIV/*Leishmania* (Ministério da Saúde, 2017). Esse fármaco apresenta as formulações desoxicolato e lipossomal. A primeira é altamente tóxica, sendo necessária a hospitalização do paciente devido à administração intravenosa por infusão (Tabela 1). A AmB lipossomal (AmB-L),

comercializada como AmBisome, apresenta eficácia similar e sua toxicidade é significativamente menor quando comparada com a formulação de desoxicolato (Adler-Moore, Gangneux et al. 2016, Uliana, Trinconi et al. 2018). Os efeitos colaterais da AmB-L são os mesmos que a formulação desoxicolato, mas menos frequentes e com menor intensidade (Tabela 1) (Ministério da Saúde, 2017). O alto custo da AmB ainda limita a sua utilização em áreas endêmicas, principalmente no Brasil. Na Índia, essa formulação é administrada em dose única e é considerada como o fármaco de escolha juntamente com a MF no tratamento da LV (Sundar and Chakravarty 2013). Quanto ao mecanismo de ação, a AmB interage com o ergosterol, principal lipídeo presente na membrana plasmática de *Leishmania*, levando à formação de poros na membrana, que altera a permeabilidade a íons, e acúmulo de ROS (Lemke, Kiderlen et al. 2005, Kumari, Kumar et al. 2022).

A PEN, uma diamidina aromática, é utilizada com menor frequência, já que apresenta toxicidade maior do que aquela relatada para os antimoniais pentavalentes. No Brasil, sua utilização restringe-se essencialmente a casos de LT refratários aos fármacos mencionados previamente. Na Índia, houve um decréscimo de cerca de 40% na taxa de cura após cerca de 10 anos de uso e o fármaco foi descontinuado (Jha, Singh et al. 1991). Os principais efeitos colaterais incluem hipoglicemia, diabetes *mellitus*, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (Tabela 1). O mecanismo de ação de PEN ainda não é totalmente descrito, mas alguns estudos indicam que esse fármaco causa perturbação do potencial de membrana interna mitocondrial do parasito (Basselin and Robert-Gero 1998). Em *Leishmania*, o acúmulo da PEN se dá por um transportador de arginina ou poliamina, sendo considerado um inibidor competitivo do transporte de arginina e não competitivo de espermidina e putrescina (Basselin, Coombs et al. 2000), além de inibir a topoisomerase mitocondrial I (Jean-Moreno, Rojas et al. 2006).

A MF é um análogo de fosfatidilcolina e foi desenvolvida inicialmente como um composto antitumoral. Este fármaco mostrou-se eficaz no tratamento da LV na Índia, com taxas de cura superiores a 90% (Jha, Sundar et al. 1999, Bhattacharya, Jha et al. 2004, Sundar, Jha et al. 2006, Sundar, Singh et al. 2012). Em casos de LT na América Latina, os ensaios clínicos demonstraram eficácia de cerca de 90% em pacientes infectados por *L. (V.) panamensis* na Colômbia, enquanto na Guatemala, a taxa de cura foi de cerca de 53% [33% e 60% para pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana*, respectivamente] (Soto, Arana et al. 2004). No Brasil, dois estudos foram realizados e estes mostraram uma eficácia de cerca de 70% para infecções por *L. (V.)*

braziliensis e *L. (V.) guyanensis* em pacientes com LT, ambos com eficácia superior quando comparados com o tratamento utilizando o antimonial pentavalente (Machado, Ampuero et al. 2010, Chrusciak-Talhari, Dietze et al. 2011). Em 2018, esse fármaco foi aprovado para o tratamento da LT no Brasil (SUS, 2018). Os efeitos colaterais da MF incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade (Tabela 1). As principais limitações da MF são a seleção de parasitos resistentes devido à sua longa meia-vida; teratogenicidade, o que limita o seu uso por mulheres grávidas, e o alto custo (Dorlo, Balasegaram et al. 2012). O principal mecanismo de ação da MF é inibir a biossíntese e o metabolismo de fosfolipídeos (Barratt, Saint-Pierre-Chazalet et al. 2009, Spadari, Borba-Santos et al. 2023). A MF se liga à membrana do parasito e é internalizada através do transportador de MF (MT), uma ATPase do tipo P responsável pelo transporte de fosfolipídeos através da membrana plasmática do parasito. O MT se associa a uma subunidade não catalítica, a proteína Ros3, essencial para a entrada da MF no parasito (Pérez-Victoria, Sánchez-Cañete et al. 2006, García-Sánchez, Sánchez-Cañete et al. 2014). Além disso, a MF inibe a citocromo c oxidase mitocondrial, levando à diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) e consumo de oxigênio (Luque-Ortega and Rivas 2007).

Para a cura clínica da leishmaniose, é esperado a ausência de sinais inflamatórios e completa cicatrização da lesão em indivíduos com LT. Já em pacientes com LV, espera-se a normalização da temperatura, diminuição do fígado e baço, aumento da contagem de leucócitos, plaquetas e hemoglobina em sangue periférico, aumento do apetite e ganho de peso (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). Assim, o sucesso do tratamento é caracterizado pela cura clínica e parasitológica a longo prazo e o acompanhamento do paciente por pelo menos um ano deve ser realizado (Aronson, Herwaldt et al. 2017). A cura parasitológica pode ser confirmada pela ausência de parasitos por microscopia e cultivo *in vitro* de tecidos ou pela ausência de amplificação do DNA do parasito em amostras de tecido, como pele, linfonodos, medula óssea e baço, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Reimão, Coser et al. 2020). A cura clínica não é sinônimo de cura parasitológica, uma vez que pacientes clinicamente curados ainda podem albergar parasitos. Os parasitos podem permanecer nos tecidos em formas latentes ou dormentes e levar a recaídas, como casos de leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), que após o tratamento da LV podem levar ao aparecimento de máculas na pele; e leishmaniose recidiva cútis, ciclo crônico de retorno de lesões após cura inicial (Barrett, Kyle et al. 2019). Assim, as formas amastigotas de *Leishmania* podem entrar em estado

de quiescência e reativar a infecção quando em condições favoráveis (Kloehn, Saunders et al. 2015, Jara, Berg et al. 2017, Mandell and Beverley 2017).

Tabela 1. Principais características dos fármacos e esquemas utilizados no tratamento da LT e LV no Brasil e no mundo.

Fármaco	Dosagem e via de administração	Efeitos colaterais	Forma clínica	Vantagens	Desvantagens	Resistência	Referências
Antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina)	10 a 20 mg/kg/dia por 20 dias por via intravenosa ou intramuscular	Insuficiência renal e hepática aguda, pancreatite e cardiotoxicidade	LCL, LD, LCD, LMC, LV	Acessibilidade	Longa duração do tratamento, toxicidade, emergência de resistência clínica, resposta variável em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> , administração dolorosa	Comum	(Frézard, Demicheli et al. 2009) (Thakur, Sinha et al. 1998)
	3 a 5 infiltrações de 1-5mL até 7 dias por via intralesional	Reação local	LCL				
Anfotericina B desoxicolato	0,7 a 1 mg/kg/dia por 25 a 30 dias (LT) e 1 mg/kg/dia por 14 a 21 dias (LV) por via intravenosa	Nefrotoxicidade, hipocalemia, alterações cardíacas	LCL, LMC, LV	Resistência clínica não descrita	Hospitalização devido a infusão intravenosa lenta, instabilidade ao calor	Indução de resistência em laboratório	(Sundar and Chakravarty 2013, Sundar and Chakravarty 2015, Alpizar-Sosa, Ithnin et al. 2022, Kumari, Kumar et al. 2022)
Anfotericina B lipossomal	20-40 mg/kg de dose total de 7 a 14 dias (LT) e 20 mg/kg total por 7 dias (LV) por via intravenosa	Febre e temores durante a infusão, disfunção renal	LCL, LD, LMC, LV	Alta eficácia, baixa toxicidade, curta duração de tratamento	Hospitalização devido a infusão intravenosa lenta, instabilidade ao calor, alto custo	Não reportada	(Sundar, Mehta et al. 2004, Kumari, Kumar et al. 2022)
Pentamidina	4 a 7 mg/kg/dia por 3 dias por via intramuscular ou 2 mg/kg/dia em 3 a 4 doses em dias alternados por via intravenosa	Pancreatite, nefrotoxicidade, arritmias cardíacas, insuficiência renal aguda, taquicardia ventricular e choque	LCL, LCD	Curta duração do tratamento	Toxicidade, eficácia variável entre as espécies de <i>Leishmania</i>	Indução de resistência em laboratório	(Coelho, Gentil et al. 2008, Piccica, Lagi et al. 2021)

anafilático, indução de diabete <i>mellitus</i>							
Miltefosina	2,5 mg/kg/dia por 28 dias por via oral	Nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade e toxicidade gastrointestinal	LCL, LD, LCD, LV	Via de administração oral, efetivo e seguro	Custo, potencial para geração de parasitos resistentes, contraindicado para gestantes	Casos de resistência clínica reportados; indução de resistência em laboratório	(Dorlo, Balasegaram et al. 2012, Sundar, Singh et al. 2012, Hendrickx, Boulet et al. 2014, Coelho, Trinconi et al. 2015)
Paromomicina	Creme com 15% de sulfato de paromomicina uma vez por dia por 20 dias por via tópica (LT) e 11-20 mg/kg/dia por 21 dias por via intramuscular (LV)	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e ototoxicidade	LCL, LV	Efetivo, baixo custo e bem tolerado	Eficácia variável entre regiões e espécies de <i>Leishmania</i>	Não reportada na clínica; indução de resistência em laboratório	(Davidson, den Boer et al. 2009) (el-On, Halevy et al. 1992, Hendrickx, Boulet et al. 2014, Wargo and Edwards 2014)

1.9.1 Paromomicina

A paromomicina (PM) é um antibiótico de amplo espectro, isolado de *Streptomyces krestomuceticus*, utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias e protozoários intestinais (Davidson, den Boer et al. 2009). Esse fármaco é componente do grupo dos aminoglicosídeos (AGs), antibióticos que inibem a síntese proteica através da ligação no sítio A do RNAr 16S, componente da subunidade ribossomal menor 30S dos ribossomos de procariotos (Kotra, Haddad et al. 2000). A ligação dos AGs ao RNAr 16S causa várias interrupções na síntese de proteínas, ao desestabilizar a translocação do RNA transportador (RNAt) e reduzir a fidelidade da tradução, causando incompatibilidade no emparelhamento códon – anticódon (Lambert 2012). A internalização celular desse grupo de fármacos em procariotos é mediada pela ligação entre grupos nitrogenados com carga positiva dos AGs e os grupos fosfolipídeos ácidos de membrana com carga negativa, sendo um processo dependente de energia e mediado pelo transporte de elétrons (Krause, Serio et al. 2016, Webster and Shepherd 2022). No citoplasma de procariotos, os AGs interferem na síntese de DNA, RNA e proteínas, metabolismo energético, dentre outros processos (Matsunaga, Yamaki et al. 1986, Kirsebom, Virtanen et al. 2006, Webster and Shepherd 2022). Em eucariotos, os AGs podem comprometer a tradução mitocondrial, além de exercerem efeito nos ribossomos citoplasmáticos, alterando a terminação da tradução (Manuvakhova, Keeling et al. 2000, Hobbie, Akshay et al. 2008). A inibição da tradução em células eucarióticas está geralmente correlacionada com a afinidade dos AGs pela região de decodificação do sítio A do ribossomo, aumentando as taxas de erro da tradução, além de mudanças no sítio de decodificação (Hobbie, Kalapala et al. 2007, Fan-Minogue and Bedwell 2008, Prokhorova, Altman et al. 2017).

Quanto ao mecanismo de ação em *Leishmania*, a PM inibe a síntese proteica citoplasmática (Fernández, Malchiodi et al. 2011). Em um estudo baseado na estrutura do ribossomo citosólico, foi demonstrado que a PM se liga a sítios únicos e conservados do ribossomo do parasito, como o centro de decodificação, responsável pela tradução do RNAm e pela fidelidade da interação códon – anticódon (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017). Outros possíveis mecanismos de ação da PM em *Leishmania* incluem a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, alterações na fluidez de membrana e disfunção respiratória mitocondrial, além do possível papel do tráfego de vesículas, que pode ocorrer através na internalização do fármaco por endocitose e posterior sequestro em

compartimentos vesiculares (Maarouf, de Kouchkovsky et al. 1997, Maarouf, Lawrence et al. 1997, Jhingran, Chawla et al. 2009, Chawla, Jhingran et al. 2011).

Por apresentar baixa absorção na circulação sistêmica após administração oral, por ser uma molécula grande e de natureza altamente hidrofílica, a PM é administrada por via intramuscular em pacientes com LV (Tabela 1) (Murray, Berman et al. 2005). A PM não é metabolizada e é excretada quase que exclusivamente pelos rins de forma inalterada, apresentando tempo de meia-vida entre duas a três horas e eliminada dentro de quatro horas após administração (Kanyok, Killian et al. 1997, Kip, Schellens et al. 2018, Seyffart 1991). Por ser excretada pelos rins, o comprometimento na função renal pode levar à redução da taxa de excreção e consequentemente ao acúmulo dos AGs no sangue e tecidos, levando à ototoxicidade, um dos principais efeitos colaterais da PM (Tabela 1) (Selimoglu 2007, Davidson, den Boer et al. 2009). Além disso, a PM também pode causar dano hepático, evidenciado pelo aumento da enzima aspartato aminotransferase (Sundar, Jha et al. 2007, Sinha, Jha et al. 2011).

Estudos clínicos têm demonstrado alta eficácia da PM no tratamento da LV, com taxas de cura maiores que 90% quando administrada por via intramuscular na Índia e Bangladesh (Jha, Olliaro et al. 1998, Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015). A emergência de parasitos resistentes aos antimoniais nesta região fez necessária a implementação de esquemas terapêuticos alternativos como a combinação dos fármacos previamente aprovados para uso clínico, como MF, PM e AmB, com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento e minimizar a geração de parasitos resistentes (Sundar, Sinha et al. 2011, Sundar, Sinha et al. 2011, Sundar and Singh 2018, Pradhan, Schwartz et al. 2022). O uso da terapia combinada com MF e PM ou antimônio e PM como alternativa ao tratamento da LV na África demonstrou resultados satisfatórios, com taxas de cura acima de 90% (Musa, Mbui et al. 2023).

Para o tratamento da LT, a PM pode ser administrada na forma tópica contra *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major*, segundo recomendação da OMS (Burza, Croft et al. 2018). Casos de resistência clínica não foram descritos até o momento, o que demonstra o seu potencial de utilização no tratamento da doença (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). No Brasil, não há relatos de estudos clínicos utilizando a PM no tratamento de pacientes com LV causada por *L. (L.) infantum*, assim como da LT, causada por *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, as principais espécies causadoras da LT. Dentre as potenciais vantagens da PM para o tratamento das leishmanioses estão o seu baixo custo, a curta duração do tratamento, o que minimiza as chances da geração de parasitos

resistentes; além da sua boa eficácia clínica, o que a capacita como um potencial fármaco para o tratamento das leishmanioses.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que isolados clínicos de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) aethiopica* apresentam suscetibilidade variável à PM *in vitro* em ambos os estágios de vida do parasito (Kulshrestha, Singh et al. 2011, Prajapati, Mehrotra et al. 2012, Utaile, Kassahun et al. 2013). Isolados clínicos brasileiros de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, provenientes de pacientes que foram infectados em regiões geográficas distintas também apresentaram suscetibilidade variável ao fármaco *in vitro* nas formas promastigota e amastigota intracelular do parasito (Coser, Ferreira et al. 2021). A suscetibilidade variável de cepas das espécies endêmicas causadoras da LT no Brasil também foi observada (Coser, Ferreira et al. 2021). Em um estudo do nosso grupo de pesquisa, foi avaliada a eficácia da PM no tratamento *in vivo* contra *L. (L.) amazonensis* e foi observada uma correlação direta entre a suscetibilidade do parasito e a resposta ao fármaco *in vivo*. A PM demonstrou eficácia no tratamento contra LT causada por *L. (L.) amazonensis*, com redução expressiva no tamanho da lesão de animais infectados e redução na carga parasitária de animais infectados tratados com a maior dosagem do fármaco (Coser, Ferreira et al. 2020). Os animais infectados com um isolado clínico altamente suscetível à PM *in vitro* responderam melhor ao tratamento com PM que animais infectados com a cepa referência M2269, que possui menor suscetibilidade *in vitro* (Coser, Ferreira et al. 2020).

1.10 Mecanismos de resistência aos fármacos em *Leishmania*

O crescente número de casos não responsivos aos tratamentos disponíveis pode estar relacionado com a resistência do parasito aos fármacos e/ou a falha terapêutica. A falha terapêutica é caracterizada pela incompleta ou ausência de resposta clínica ao tratamento, ou reativação da doença, e está associada a fatores relacionados com o hospedeiro, o parasito, o próprio fármaco ou doenças concomitantes (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). A imunossupressão ou variações na imunidade podem influenciar a capacidade da ação do fármaco (van Griensven, Carrillo et al. 2014). O acesso do medicamento ao tecido no qual o parasito reside, a virulência e espécie do parasito, e a infecção pelo vírus de RNA de *Leishmania* (*LRV1*) podem estimular respostas imunes diferentes no hospedeiro (Vanaerschot, Huijben et al. 2014, Adai, Lye et al. 2016, Bourreau, Ginouves et al. 2016). Além disso, o armazenamento de fármacos em condições inadequadas e a administração de dosagens subterapêuticas por profissionais da saúde podem levar à seleção de parasitos resistentes, e são fatores importantes relacionados à falha terapêutica na quimioterapia das leishmanioses (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017).

A falha terapêutica é um fenótipo clínico, enquanto a resistência é fator determinante do resultado do tratamento, embora a falha terapêutica não esteja necessariamente associada com a resistência. A resistência aos fármacos é um fenótipo adaptativo adquirido por meio de mutações ou alterações estruturais no genoma do parasito, levando à suscetibilidade reduzida a um determinado fármaco (Laffitte, Leprohon et al. 2016). O estibogluconato de sódio foi abandonado em algumas áreas, como, por exemplo, no Sudeste Asiático, devido à falha terapêutica associada à resistência. Na Índia, altos níveis de arsênico na água potável proveniente de águas subterrâneas contaminadas com o metal induziu a geração de parasitos resistentes, uma vez que o antimônio e o arsênico compartilham características, sendo semimetais e apresentarem propriedades geoquímicas e toxicidade similares, além de apresentarem resistência cruzada (Gebel 1997, Chakraborti, Rahman et al. 2013, Perry, Wyllie et al. 2015, Perry, Prajapati et al. 2015, Ungureanu, Santos et al. 2015). Já na Índia e no Nepal, a eficácia da MF tem diminuído desde a sua implementação em 2002 devido à falha terapêutica não relacionada com a resistência do parasito (Sundar, Singh et al. 2012, Rijal, Ostyn et al. 2013, Ostyn, Hasker et al. 2014). Indivíduos coinfectados com HIV/*Leishmania* apresentam maiores chances de recaída e taxa de mortalidade quando comparado com indivíduos imunocompetentes, uma vez que o HIV aumenta o risco de

severidade da LT e LV, resultando em casos disseminados e falha terapêutica (Alvar, Aparicio et al. 2008, Lindoso, Barbosa et al. 2009, van Griensven, Carrillo et al. 2014). A falha terapêutica com AmB já foi reportada, especialmente em pacientes imunossuprimidos coinfectados com HIV (Ritmeijer, ter Horst et al. 2011, Cota, de Sousa et al. 2014, McQuarrie, Kasper et al. 2015, Tamiru, Tigabu et al. 2016, Eichenberger, Buechi et al. 2017, Camara, Queirós et al. 2019, Diro, Blesson et al. 2019).

Os mecanismos de resistência aos fármacos estão relacionados a mutações, amplificações e/ou deleções de determinados genes, ou até mesmo alteração no número de cópias de cromossomos inteiros (Leprohon, Fernandez-Prada et al. 2015). Estudos sugerem que parasitos resistentes podem reprogramar a sua maquinaria de tradução, quando em exposição ao fármaco, como parasitos resistentes ao antimonial trivalente, modulando a tradução do RNAm e ativando vias responsáveis pelo combate à presença do medicamento, e esse mecanismo pode se estender a outros fármacos (Karamysheva, Gutierrez Guarnizo et al. 2020, Gutierrez Guarnizo, Tikhonova et al. 2023).

Em estudos utilizando parasitos resistentes aos antimoniais selecionados *in vitro* de várias espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose humana, foram identificadas mutações ou amplificações em transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), envolvidos no transporte dependente de ATP, como a proteína de resistência a múltiplos fármacos A (MRPA), ABCI4 e ABCG2, além do transportador aquagliceroporina (AQP1), responsável pela entrada do fármaco no parasito (Gourbal, Sonuc et al. 2004, Leprohon, Légaré et al. 2009, Manzano, García-Hernández et al. 2013, Monte-Neto, Laffitte et al. 2015, Perea, Manzano et al. 2016, Boozhmehrani, Eslami et al. 2022). Em isolados clínicos provenientes de pacientes infectados com *L. (L.) donovani*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) tropica* resistentes aos antimoniais, mutações ou alterações nos níveis de expressão dos genes envolvidos na síntese de tripanotona, AQP1, superóxido dismutases e aumento da expressão dos genes *AMR56/AMR58*, dois marcadores de resistência ao antimônio, e tripanotona peroxidase foram encontradas, correlacionando seus papéis na resistência ao fármaco *in vitro* e na clínica (Decuypere, Rijal et al. 2005, Maharjan, Singh et al. 2008, Rugani, Gontijo et al. 2019, Potvin, Leprohon et al. 2021, Bahrami, Mohebbi et al. 2022, Nateghi-Rostami, Tasbihi et al. 2022, Valashani, Ahmadpour et al. 2024).

Raros casos de parasitos resistentes à AmB foram reportados, o que pode ser explicado pela AmB ser um fármaco de segunda escolha, sua alta eficácia e por não ser usado com frequência até a emergência de parasitos resistentes aos antimoniais

(Srivastava, Prajapati et al. 2011, Purkait, Kumar et al. 2012). Parasitos resistentes à AmB de *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) tropica* selecionados experimentalmente mostraram composição alterada de ergosterol, o principal esterol de membrana de tripanossomatídeos, e mutações em genes envolvidos na biossíntese de ergosterol, como a *esterol C-24-metiltransferase (C24SMT)*, *esterol C-14-alfa-demetilase (C14DM)* e *esterol C-5-desaturase (C5DS)* (Goad, Holz et al. 1984, Mbongo, Loiseau et al. 1998, Purkait, Kumar et al. 2012, Mwenechanya, Kovářová et al. 2017, Pountain, Weidt et al. 2019, Bansal, Sen et al. 2020, Ning, Frankfater et al. 2020, Morelle, Mukherjee et al. 2021, Alpizar-Sosa, Ithnin et al. 2022). Além disso, foi descrito que a resistência à AmB está associada com o aumento na sensibilidade ao estresse oxidativo (Alpizar-Sosa, Ithnin et al. 2022).

A resistência à PEN em *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* está associada a um transportador ABC, a proteína de resistência à PEN 1 (PRP1) ou ABCC7, que também confere resistência aos antimoniais *in vitro* (Coelho, Beverley et al. 2003, Coelho, Messier et al. 2007). A resistência a este fármaco pode também estar relacionada às mudanças nas concentrações intracelulares de arginina e poliaminas (Basselin, Badet-Denisot et al. 1997). Já o mecanismo de resistência *in vitro* à MF está associado ao MT, responsável pela translocação de fosfolipídeos. A função do MT depende da ligação à subunidade Ros3, que pertence à família de proteínas CDC50/LEM3 (Seifert, Pérez-Victoria et al. 2007, Coelho, Trinconi et al. 2014, Laffitte, Leprohon et al. 2016, Espada, Albuquerque-Wendt et al. 2021). A superexpressão dos transportadores ABC: ABCB4 (ou gene de resistência a múltiplos fármacos 1 [MDR1]), ABCG4 e ABCG6 também podem estar associadas com a redução da suscetibilidade à MF (Castanys-Muñoz, Alder-Baerens et al. 2007, Castanys-Muñoz, Pérez-Victoria et al. 2008, Pérez-Victoria, Bavchvarov et al. 2011). Além disso, foi demonstrado que a resistência clínica à MF de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* pode estar associada com a presença de mutações no gene *MT* (Cojean, Houzé et al. 2012). Outras alterações como o tamanho e níveis de insaturação de ácidos graxos, expressão alterada de genes envolvidos no metabolismo de tiol, síntese de proteínas, reparo do DNA e na maquinaria de replicação, maior habilidade de resistir ao estresse oxidativo e redução nos níveis de ergosterol, podem contribuir com a resistência à MF (Kulshrestha, Sharma et al. 2014, Vincent, Weidt et al. 2014, Deep, Singh et al. 2017).

Parasitos resistentes à PM de *L. (L.) donovani* selecionados *in vitro* apresentaram redução do acúmulo do fármaco (Jhingran, Chawla et al. 2009). Mutações

têm sido observadas na subunidade menor do RNAr em microrganismos resistentes à PM, mas não em parasitos do gênero *Leishmania* selecionados *in vitro*, indicando que os mecanismos associados à resistência são variáveis (Fong, Chan et al. 1994). Em uma linhagem resistente à PM de *L. (L.) donovani*, selecionada experimentalmente, foi observada a amplificação de uma região contendo dois genes, *LinJ.27.1940* e *LinJ.27.1950*, que codificam a enzima D-lactato desidrogenase (D-LDH) e uma aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAT), respectivamente (Rastrojo, García-Hernández et al. 2018). Em linhagens resistentes à PM de *L. (L.) infantum* selecionadas *in vitro* após tratamento com agente mutagênico metano sulfonato de etila, foram identificadas mutações no gene que codifica a proteína quinase dependente de cálcio 1 (CDPK1) (*LinJ.33.1810*), que foi considerado como marcador molecular de resistência nessa espécie (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Até o momento, apenas esses genes foram correlacionados com a resistência à PM em *Leishmania* spp.

Em estudos recentes, foram também identificadas possíveis mutações associadas com a resistência à PM em *L. (L.) donovani*, das quais muitas destas estavam localizadas em regiões intergênicas (Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021, Ghosh, Kumar et al. 2022). Foram encontradas mutações em regiões intergênicas dos genes *proteína chaperona DNAJ* (*LdBPK_181410.1*), *aspartato aminotransferase* (*LdBPK_350840.1*) e *C24SMT* (*LdBPK_362510.1*). Apesar de terem sido identificadas mutações, nenhum destes genes foi validado funcionalmente e correlacionado com a resistência à PM.

2. Justificativa

A urgente necessidade de implementação de novos fármacos no esquema terapêutico das leishmanioses no Brasil, associada ao crescente número de casos não responsivos aos fármacos atualmente utilizados para o tratamento, tem sido priorizada. Considerando a eficácia da PM no tratamento da LV no Sudeste Asiático e com base nos resultados obtidos que demonstraram atividade *in vitro* e *in vivo* da PM contra espécies causadoras da LT no Brasil, principalmente *L. (L.) amazonensis*, além da suscetibilidade variável de isolados clínicos não expostos previamente ao fármaco (Coser, Ferreira et al. 2020, Coser, Ferreira et al. 2021), o objetivo principal deste estudo foi identificar e validar funcionalmente genes relacionados com a suscetibilidade e resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*, uma das principais espécies responsáveis pela LT no Brasil. Através do NGS de parasitos resistentes selecionados *in vitro*, assim como de isolados clínicos suscetíveis à PM, potenciais marcadores moleculares de suscetibilidade e resistência à PM foram identificados e posteriormente validados funcionalmente, auxiliando na elucidação dos mecanismos de ação e resistência a este fármaco. Por fim, a identificação dos potenciais alvos moleculares e celulares para esse AG poderá estabelecer as bases para o desenvolvimento racional de novos e mais específicos derivados de AGs contra as leishmanioses.

3. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi identificar e validar funcionalmente genes associados com a suscetibilidade e resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*. Os objetivos específicos foram:

- Selecionar linhagens de *L. (L.) amazonensis* resistentes à PM *in vitro*, utilizando três estratégias de seleção: mutagênese *in vitro* e pressão seletiva nos estágios promastigota e amastigota intracelular do parasito;
- Determinar as concentrações inibitórias da PM *in vitro* para as formas promastigotas e amastigotas intracelulares das linhagens resistentes de *L. (L.) amazonensis* previamente selecionadas *in vitro*;
- Avaliar o acúmulo da PM utilizando um análogo fluorescente nas linhagens resistentes selecionadas *in vitro* e nos isolados clínicos com suscetibilidade diferencial;
- Avaliar a eficácia da PM *in vivo* contra linhagens resistentes à PM selecionadas por pressão seletiva em ambos os estágios do ciclo de vida do parasito, utilizando modelo de infecção murino de *L. (L.) amazonensis*;
- Sequenciar o genoma completo da cepa referência de *L. (L.) amazonensis* M2269 através dos sequenciamentos de Illumina e ONT, para montagem híbrida de genoma;
- Sequenciar o genoma completo de linhagens resistentes à PM selecionadas *in vitro*, assim como de isolados clínicos com suscetibilidade diferencial;
- Identificar polimorfismos/mutações, assim como alterações estruturais no genoma, como aneuploidias, amplificação e deleção gênica associados à suscetibilidade e resistência à PM;
- Avaliar funcionalmente os potenciais genes envolvidos na suscetibilidade e na resistência à PM utilizando técnicas de manipulação genética do parasito como superexpressão gênica e *knockout* gênico.

4. Resultados

Whole-genome sequencing of *Leishmania amazonensis* paromomycin-resistant and -susceptible lines reveals multiple genes associated with susceptibility and resistance mechanisms

Elizabeth M. Coser ¹, Luana A. Rogerio ², Caroline Torres ², Percy O. T. Vergara ³, Yazmin Santos ⁴, Gonzalo Greif ⁵, Lizandra Maia de Sousa ⁶, Cristiele Saborito ¹, Juliana I. Aoki ¹, Steven L. Cobb ⁴, Carlos A. Robello ⁵, Silvio R. Consonni ⁶, João M. P. Alves ³, Sandra R. C. Maruyama ², Adriano C. Coelho ^{1, §}

¹ Department of Animal Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

² Department of Genetics and Evolution, Biological and Health Sciences Center, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil.

³ Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Chemistry, Durham University, Durham, United Kingdom

⁵ Host-Pathogen Interactions Laboratory, Molecular Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

⁶ Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

⁷ Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Science, Pharmaceutical Sciences Program, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

[§] Corresponding author: Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 255, 13083-862, Campinas, Brazil.

E-mail address: accoelho@unicamp.br (A. C. Coelho).

Abbreviations: Aminoglycoside (AG), amphotericin B (AmB), aquaglyceroporin 1 transporter (AQP1), branched-chain amino acid aminotransferase (BCAT), base pair (bp), bone-marrow derived macrophages (BMDMs), calcium-dependent protein kinase 1

(CDPK1), cutaneous leishmaniasis (CL), copy number variation (CNV), clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), D-lactate dehydrogenase enzyme (D-LDH), fluorescent paromomycin (FI-PM), genomic DNA (gDNA), glycosylphosphatidylinositol (GPI), insertion and deletion (InDel), kilobase (kb), lipophosphoglycan (LPG), liposomal amphotericin B (L-AmB), liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS), localized cutaneous leishmaniasis (LCL), megabase (Mb), miltefosine (MF), *N*-methyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine (MNNG), multiple nucleotide polymorphism (MNP), *N*-ethylmaleimide (NEM), Oxford Nanopore Technologies (ONT), paromomycin (PM), pentamidine (PEN), pentavalent antimony (SbV), phosphate-buffered saline (PBS), polymerase chain reaction (PCR), quantitative real-time PCR (qPCR), single guide RNA (sgRNA), single nucleotide polymorphism (SNP), single nucleotide variant (SNV), tegumentary leishmaniasis (TL), trivalent antimony (SbIII), visceral leishmaniasis (VL), whole-genome sequencing (WGS).

ABSTRACT

The treatment options available for leishmaniasis in Brazil present several shortcomings, such as severe side effects and decrease in responsiveness. Paromomycin, a low-cost aminoglycoside antibiotic used for the treatment of visceral leishmaniasis in Southeast Asia and Africa, has shown potential in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* species endemic in Brazil. Since the mechanisms of action and resistance of paromomycin have not yet been completely elucidated, we generated paromomycin-resistant lines of *Leishmania amazonensis* using strategies of chemical mutagenesis and stepwise selection. Resistant lines were subjected to *in vitro* and *in vivo* phenotypic characterization assays and whole-genome sequencing, and compared with highly susceptible clinical isolates to identify potential molecular targets of the drug. Genes involved in translation, lipid metabolism, and RNA methylation were functionally validated as potential targets and their roles in paromomycin susceptibility and resistance were confirmed. Altogether, these findings indicate that the mechanisms of action and resistance to paromomycin in *Leishmania* are multifactorial and that beyond the translation machinery, other molecular markers contribute to the PM susceptibility and resistance phenotype in this parasitic protozoan.

1. Introduction

Leishmaniasis is a tropical neglected disease caused by the obligate intracellular parasite of the genus *Leishmania*, supergroup Excavata, group Euglenozoa and subgroup Kinetoplastea (Lukeš, Butenko et al. 2018, Adl, Bass et al. 2019). The disease is endemic in more than 100 countries worldwide, including Brazil, and has two main clinical manifestations: cutaneous (CL) and visceral leishmaniasis (VL) (Burza, Croft et al. 2018). *Leishmania amazonensis* is endemic in Brazil and is responsible for two main clinical manifestations of CL: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). LCL is characterized by the appearance of one or more ulcerated lesions, while DCL is characterized by multiple non-ulcerative nodules and is related to failure in the Th1 response (Goto and Lindoso 2010, Scorza, Carvalho et al. 2017). There is no effective vaccine available for human leishmaniasis control, and chemotherapy is the only alternative available. Glucantime (meglumine antimoniate [SbV]) is the first-line drug used in Brazil to treat both CL and VL, followed by amphotericin B (AmB), pentamidine (PEN) and miltefosine (MF) (Croft and Olliaro 2011, Uliana, Trinconi et al. 2018). The available therapeutic schemes have some limitations, such as high toxicity and costs, parental administration, and long-term treatment, reducing patient adherence (Uliana, Trinconi et al. 2018).

Paromomycin (PM) is an aminoglycoside (AG) antibiotic approved for the treatment of VL caused by *L. donovani*, with a good clinical response mainly in Southeast Asia (Sundar, Jha et al. 2007, Jamil, Haque et al. 2015). When combined with other drugs, such as AmB, MF or SbV, treatment with PM is safe and highly effective for patients with either VL or post-kala-azar dermal leishmaniasis, requiring shorter hospitalization (Rahman, Goyal et al. 2017, Musa, Mbui et al. 2023, Younis, Mudawi Musa et al. 2023). So far, cases of clinical resistance have not yet been reported, which can be explained in part by the less frequent use and drug combination therapy. In Brazil, there is no report evaluating the clinical efficacy of PM against VL or CL in humans. Recently, the *in vitro* activity of PM against CL causative species, such as *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, demonstrated variation in susceptibility to this drug (Coser, Ferreira et al. 2020). Particularly, for some Brazilian clinical isolates of *L. amazonensis*, they were described as highly susceptible to PM and a direct correlation between *in vitro* susceptibility and treatment outcome in infected mice was described for these isolates (Coser, Ferreira et al. 2021). These findings suggest that the circulating isolates of the main endemic species in

the country may respond to clinical treatment with PM, indicating its potential use in CL treatment.

In bacteria, like the other AG antibiotics, PM targets mainly the protein synthesis apparatus. They may also interfere in DNA and RNA synthesis, as well as the energetic metabolism of prokaryotes (Matsunaga, Yamaki et al. 1986, Kirsebom, Virtanen et al. 2006, Webster and Shepherd 2022). In *Leishmania*, PM inhibits cytoplasmic protein synthesis and binds to the decoding center of the ribosome, interfering with the fidelity of codon-anticodon interaction (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017). PM also induces changes in membrane fluidity and also affects mitochondrial membrane potential, leading to respiratory dysfunction (Bharadava, Upadhyay et al. 2024).

The emergence of parasites resistant to antimonials led to its discontinuation in Southeast Asia where VL is endemic (Croft, Sundar et al. 2006). Treatment failure associated with MF, the first oral drug approved for the treatment of leishmaniasis, has already been reported (Sundar, Singh et al. 2012, Rijal, Ostyn et al. 2013, Ostyn, Hasker et al. 2014). Besides inherent factors related to either the host or the parasite, the inappropriate storage conditions of drugs and administration of subtherapeutic dosages by healthcare professionals are associated with the emergence of drug resistance (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). In *Leishmania*, drug resistance may be associated with gene mutation, deletion and amplification of genes and/or aneuploidy (Laffitte, Leprohon et al. 2016, Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). These genetic and/or genomic changes may lead to resistance by the uptake, efflux, sequestration and/or inactivation of the drug by reducing its intracellular concentration, by reducing the affinity of the drug by gene mutation or by reducing drug effect by gene overexpression of the target (Fairlamb, Gow et al. 2016).

In this study, we selected *L. amazonensis* PM-resistant lines *in vitro* using distinct protocols: chemical mutagenesis and stepwise selection at the promastigote and intracellular amastigote stages. Whole-genome sequencing (WGS) of PM-resistant lines and two clinical isolates, highly susceptible to PM *in vitro* and previously described (Coser, Ferreira et al. 2020, Coser, Ferreira et al. 2021) was performed, in order to identify potential genetic and/or genomic variations (single nucleotide variants [SNVs] and copy number variation) that may be associated with the PM resistance and susceptibility phenotype. Here, we described potential genes involved in the PM resistance phenotype in *L. amazonensis* that were genetically and functionally validated in this parasitic

protozoan. The identification of potential molecular targets involved in the mechanisms of action and resistance against *Leishmania* may contribute to the rational development of new and more specific treatments against leishmaniasis.

2. Material and Methods

2.1 Drugs

Stock solutions of PM (Gold Biotechnology, St. Louis, MO, USA), trivalent (SbIII) (Sigma-Aldrich) and pentavalent (SbV) antimonials (Sanofi-Aventis), MF (Sigma-Aldrich), PEN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and *N*-ethylmaleimide (NEM) were diluted in Milli-Q water at concentrations of 1-100 mM, filtered-sterilized using a 0.22 µm pore size and kept at -20°C until use. AmB (Sigma-Aldrich) and *N*-methyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine (MNNG) (Sigma-Aldrich) were diluted in DMSO at concentrations of 1 and 10 mM, respectively. PM was also used for *in vivo* assays, prepared daily with phosphate-buffer saline (PBS) and kept in stock solutions at 30 mg/mL.

2.2 Parasite cultivation and animals

Promastigotes of *L. amazonensis* reference strain (MHOM/BR/1973/M2269) and two clinical isolates of this same species (MHOM/BR/2012/ER256) and (MHOM/BR/2008/UB017) obtained from patients with CL (Coser, Ferreira et al. 2021) were grown at 25°C in M199 (Sigma-Aldrich) supplemented with 40 mM HEPES (pH 7.4), 0.1 mM adenine, 5 µg/mL hemin, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 10% sterile heat-inactivated fetal bovine serum (Kapler, Coburn et al. 1990). The M2269 strain and the clinical isolates were cloned before selection of PM-resistant lines, *in vitro* drug susceptibility assays and/or WGS. All resistant lines selected *in vitro* were also cloned before *in vitro* drug susceptibility assays and WGS. Promastigotes were cloned in semisolid M199 containing 1% agar and 1.2 µg/mL bioppterin. The recovery clones were then transferred to liquid M199. The experimental design of this study is shown in Figure 1.

Bone-marrow derived macrophages (BMDMs) were obtained from BALB/c mice according to previously described protocol (Zamboni and Rabinovitch 2003), cultivated in R2020 medium (RPMI medium containing 20% inactivated fetal bovine

serum and 20% L929 cell conditioned medium) and incubated in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. BALB/c mice (4-6 weeks old) were acquired from CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica) of UNICAMP. The animals received food and water *ad libitum*, and were kept in mini-isolators. All protocols and procedures using mice were approved and authorized by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Instituto de Biologia, UNICAMP (Protocol 5719-1/2021).

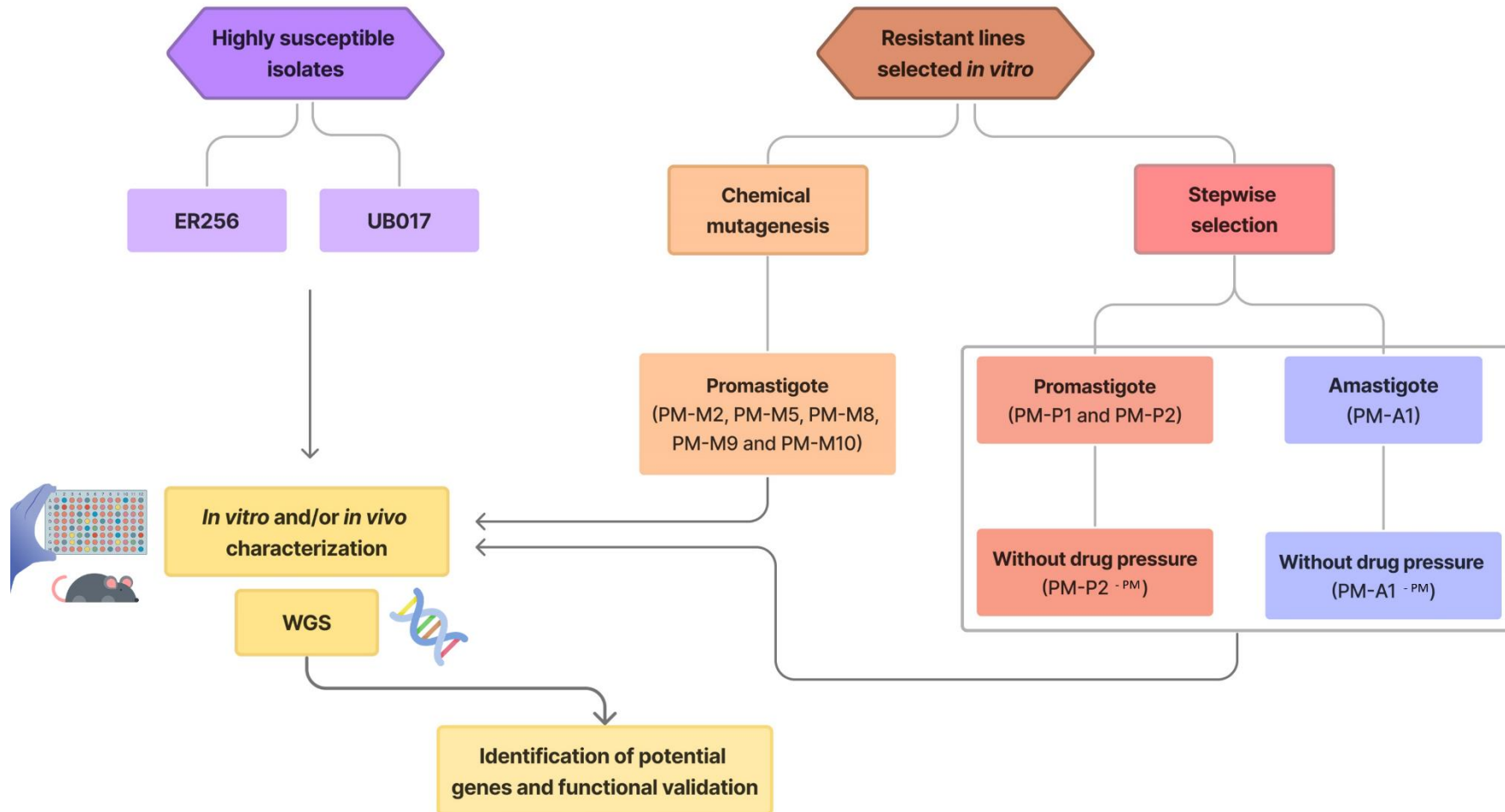


Figure 1. Experimental design of the methodologies used in this study for selection of PM-resistant lines, as well as *in vitro* and/or *in vivo* characterization and WGS of resistant lines and highly susceptible isolates of *L. amazonensis*, for further identification and functional validation of potential genes associated with PM resistance and susceptibility in this species. This workflow was generated in Figma and icons used are from Vecteezy (<https://www.vecteezy.com/>) and Flaticon (<https://www.flaticon.com/>)

2.3 Drug susceptibility assays at the promastigote and intracellular amastigote stages

The susceptibility of PM and other drugs (SbIII, AmB, PEN, MF and NEM) against promastigotes of the M2269 strain, clinical isolates, and PM-resistant lines selected *in vitro* was evaluated using the MTT [tetrazoline 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromide] colorimetric assay as previously described (Ferreira, Coser et al. 2023). Experiments were performed in triplicate in at least three independent experiments, using the M2269 reference strain as control. The 50% effective concentration (EC₅₀) was determined by sigmoid regression curves using GraphPad Prism 8 software.

For intracellular amastigotes, drug susceptibility assays were performed using 3×10^5 BMDMs plated per well in culture plates and infected with stationary growth phase promastigotes of *L. amazonensis* at a ratio of 5:1 (parasites/macrophage) in a 5% CO₂ atmosphere at 34°C (Coser, Ferreira et al. 2020). After 3 h of infection, infected BMDMs were washed with warm PBS and then R1010 medium (RPMI medium, containing 10% inactivated fetal bovine serum and 10% L929 cell conditioned medium) was added containing increasing concentrations of PM (1-500 µM). After 72 h, infected BMDMs were fixed, stained, and the percentage of infected macrophages as well as the number of amastigotes per infected macrophage were determined using an optical microscope. At least three independent experiments were performed and the EC₅₀ values were determined as mentioned above.

2.4 Generation of PM-resistant lines

2.4.1 Selection of PM-resistant lines by *in vitro* mutagenesis

Mutagenesis was applied to *L. amazonensis* M2269 strain promastigotes in logarithmic growth phase by treating with 3 µg/mL of *N*-methyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine (MNNG) for 4 h at 25°C, as previously described (Coelho, Trinconi et al. 2015). After reestablishing proliferation, the selection of PM-resistant parasites was carried out in M199 containing 300 µM of PM at a density of 2×10^6 promastigotes/mL. As a control, we performed a selection protocol in the presence of 75 µM of MF, a concentration previously described to select a MF-resistant population by chemical mutagenesis (Coelho, Trinconi et al. 2015). Once a PM-resistant population was selected,

parasites were cloned and the PM resistance phenotype was evaluated as described in item 2.3.

2.4.2 Stepwise selection of PM-resistant lines at the promastigote stage

Promastigotes of *L. amazonensis* M2269 strain were grown in M199 containing increased concentrations of PM (150, 300, 500, 750 and 1,000 μ M), as previously described (Coelho, Trinconi et al. 2014). This selection protocol was performed with at least three successive passages for each PM dose.

2.4.3 Selection of PM-resistant lines by stepwise selection at the intracellular amastigote stage

The selection of intracellular amastigotes by stepwise selection was based on the method previously described (Hendrickx, Boulet et al. 2014). BMDMs at a density of 5×10^5 macrophages per well were plated in 24-well plate and then infected with promastigotes of the *L. amazonensis* M2269 strain in the stationary growth phase at a ratio of 5:1 (parasites/macrophage) for 3 h at 34°C and 5% CO₂ atmosphere. Non-internalized promastigotes were removed by washing with warm PBS and then infected macrophages were treated with 60 μ M of PM, a concentration that corresponds to the EC₅₀ value of PM for this strain at the amastigote stage (Coser, Ferreira et al. 2020). After 7 days of incubation, at least one well containing infected BMDMs was stained with Giemsa to assess the percentage of infection, while another one was used for differentiation into promastigotes. In this step, BMDMs were removed from the well using a cell scraper, followed by resuspension in R1010 medium using a 24G needle to lyse infected macrophages and release intracellular amastigotes. Then, the lysate was transferred into a flask containing M199 and incubated at 25°C. After parasite differentiation, promastigotes were subsequently used for new cycles of infection followed by PM treatment as described above. To select a *L. amazonensis* PM-resistant line at the amastigote stage, five successive passages in BMDMs treated with the drug were performed before determining the resistance phenotype as described in item 2.3. As a control of the experiment, the M2269 strain, considered susceptible to PM, was subjected to the same successive passages in absence of PM.

2.5 Mice infection and PM treatment of animals infected with *L. amazonensis*

For *in vivo* infection, female BALB/c mice were infected in the right hind footpad with 10^6 stationary growth phase promastigotes. The animals were randomly grouped and infected with the respective PM-resistant lines and the M2269 strain of *L. amazonensis*. Treatment with PM started after 4 weeks post-infection, with doses of 150 and 600 mg/kg/day administered intraperitoneally for 14 days (Coser, Ferreira et al. 2020). As a control, an untreated group infected with each resistant line or the M2269 strain was used. PM effectiveness was evaluated by weekly measurement of lesion size with a calliper (Mitutoyo) compared with the untreated group. The mice were euthanized after 14 days of treatment with PM and approximately 25 mg of infected lesion tissues of each animal were collected. Total genomic DNA (gDNA) from each lesion was extracted using the *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma Aldrich), according to the protocol provided by the manufacturer. Parasite burden quantification was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) in duplicates for each sample, using the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (*G6PDH*) as target, as previously described (Coser, Ferreira et al. 2020).

2.6 Synthesis and uptake of fluorescent PM labelled with fluorescein isothiocyanate (FI) and endocytosis inhibition assay

Fluorescent PM, named as FI-PM was synthesized using a round bottom flask containing PM sulfate salt (1.62 mmol, 1.42 equivalents) and deionized water (7 mL). The solution was allowed to mix for 5 min before addition of triethylamine (2.10 mmol, 1.85 equivalents) until reaching pH 10. Fluorescein isothiocyanate (1.14 mmol, 1 equivalent) was dissolved in 2 mL of DMSO and then added to the reaction mixture. The solution was allowed to mix overnight and the reaction progress was monitored by liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). Once the reaction was completed, the solvent was removed under reduced pressure and acetonitrile was added to the reaction mixture. After filtration, acetonitrile was removed, followed by a final wash with a solution of water/methanol 50:50 v/v. Solvents were removed under reduced pressure. FI-PM was transferred to an amber glass vial, frozen and then lyophilized. The fluorescent compound was then resuspended in DMSO at concentrations of 10 and 100 mM.

To assess FI-PM intracellular accumulation, 5×10^5 logarithmic growth phase promastigotes were incubated with 200 μM of FI-PM for 30 min at 25°C. To remove the non-internalized fluorescent compound, promastigotes were washed three times with ice-cold HEPES-NaCl (21 mM HEPES pH 7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM NaH_2PO_4 , 6 mM glucose, pH 7.05). Parasites were then suspended in HEPES-NaCl and at least 10,000 promastigotes, defined by gating at data acquisition, were analysed by flow cytometry, using the Guava EasyCyte 8HT Flow Cytometer system (Merck Millipore) and FlowJo software v.10.8.1 (Tree Star) (Coelho, Trinconi et al. 2014). For endocytosis inhibition assays, promastigotes were incubated with 0.1 or 1 μM of NEM in the presence of 200 μM of FI-PM for 30 min under the same conditions. Data were analysed as described above.

2.7 Transmission electron microscopy

Promastigotes of *L. amazonensis* at logarithmic growth phase and density of 5×10^7 parasites were washed with 1 mL of PBS containing 0.5% glutaraldehyde solution and then fixed with a buffer containing 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2), 2.5% glutaraldehyde and 2 mM calcium chloride. After incubation at 4°C for 24 h, promastigotes were centrifuged at 800 $\times g$ for 10 min and 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) was added, followed by incubation for 10 min at room temperature, which was repeated three times. Promastigotes were then fixed with 1% osmium tetroxide and 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2) with subsequent incubation for 30 min, followed by the addition of 0.1 M sodium cacodylate and incubation at room temperature. Promastigotes were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol (50%, 70%, 95% and 100%), followed by incubation for 15 min in 100% acetone. The samples were infiltrated in a 1:1 solution of 100% acetone and Epoxy resin for 8 h at room temperature. The fragments in a mold with Epoxy resin were mounted and incubated at 60°C for 48 h, and sample sections were subsequently made on a Leica Ultracut UCT ultramicrotome for analysis. The sections containing promastigotes were observed and photographed using an FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN transmission electron microscope.

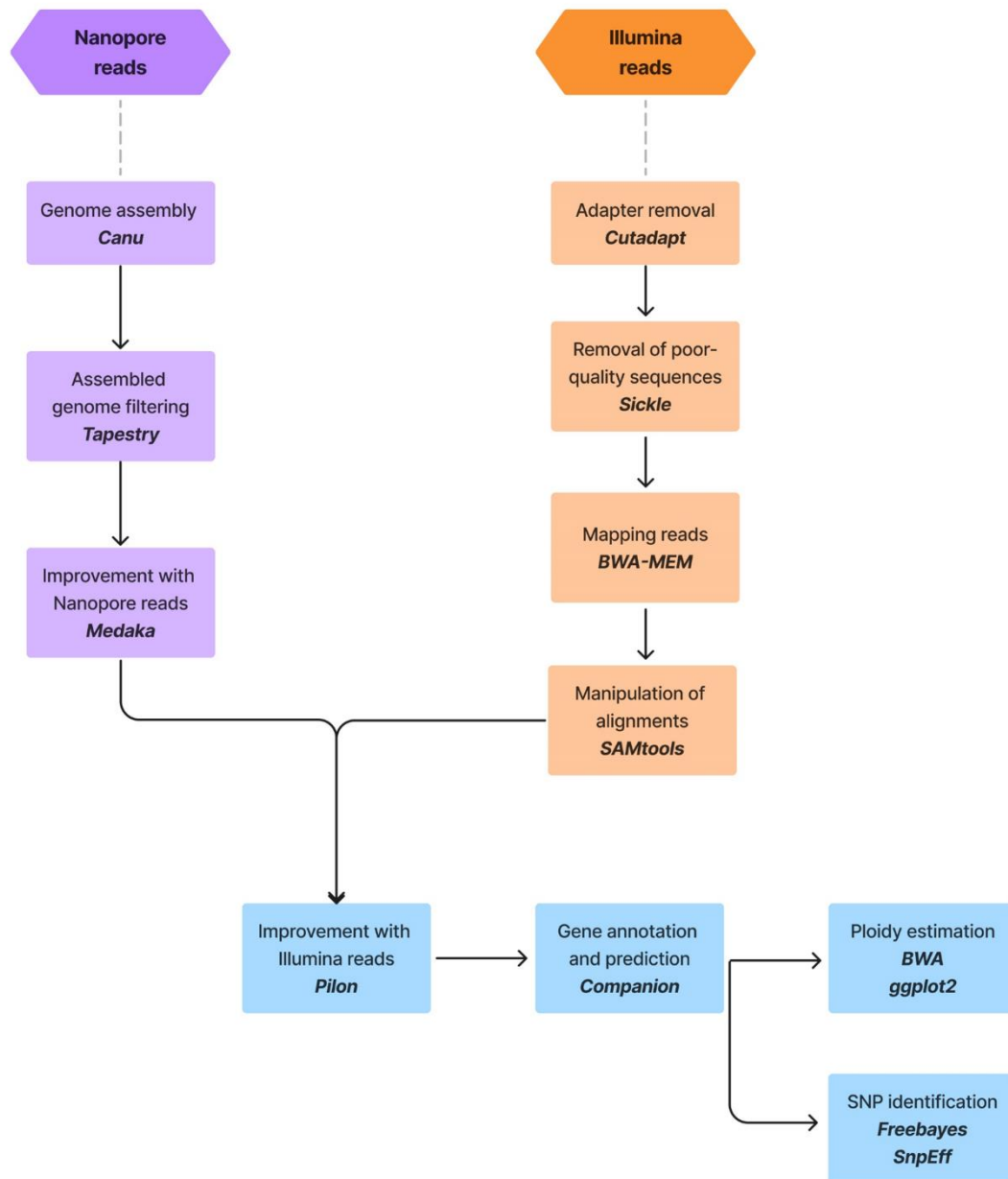
2.8 DNA isolation and WGS

Total gDNA of the M2269 strain, PM-resistant lines and clinical isolates were extracted with *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma Aldrich), as recommended by the manufacturer. Genomic libraries were prepared with the *TruSeq Nano DNA kit* (Illumina) and libraries were sequenced in a HiSeq2500 platform using paired-end fragments with 2x150 base pair (bp) reads performed by Macrogen, Seoul, South Korea. For Nanopore technology, WGS of the M2269 strain was performed as previously described (Díaz-Viraqué, Greif et al. 2021). Briefly, after isolation of high molecular weight gDNA, it was prepared for barcoding and adaptor ligation using *Oxford Nanopore Technologies (ONT) Ligation Sequencing kit* (Oxford Nanopore Technologies). Nanopore libraries were generated using the *ONT Rapid Sequencing kit* according to the manufacturer's instructions and were performed in MinION (Oxford Nanopore Technologies).

2.9 Genome assembly, annotation and bioinformatics analyses

The genome of the *L. amazonensis* M2269 reference strain was assembled using Nanopore and Illumina reads. The workflow of genome assembly and annotation is shown in Supplementary Figure 1. For the genome assembly of Nanopore reads, Canu v.2.2 assembler (Koren, Walenz et al. 2017) was used to assemble reads in initial contigs. Tapestry v.1.0.0 (<https://github.com/johnomics/tapestry>) was later used to validate and filter the genome assembly. Genome enhancement was performed using Nanopore reads with Medaka program v.1.0.3 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>), which generated a consensus sequence from the Nanopore sequencing data. Removal of universal adapters of Illumina reads was done with Cutadapt v.3.5 (with Python 3.10.6) (Martin, 2011), followed by removal of poor-quality sequences using Sickle tool (Joshi and Fassl, 2011). Mapping of reads was performed using Burrows-Wheeler Aligner (BWA) program (Li, Handsaker et al. 2009) and BWA-MEM algorithm. SAMtools v1.15.1 was used to manipulate alignments in SAM format to sort, index and remove duplicates (Li, Handsaker et al. 2009). Similarly, Illumina reads manipulation was also performed for PM-resistant lines and isolates. The final step of enhancement and assembly was polishing Nanopore assembly with Illumina reads using Pilon v.1.24 (Walker, Abeel et al. 2014). Gene annotation and prediction of *L. amazonensis* genes

were performed using Companion (<https://companion.ac.uk/>) (Steinbiss, Silva-Franco et al. 2016) and *L. mexicana* U1103 strain genome as reference.



Supplementary Figure 1. Schematic overview of the workflow used for the *L. amazonensis* M2269 genome assembly, using Nanopore and Illumina reads. Nanopore reads processing is represented as purple, while Illumina reads processing is represented as orange. Processes after Nanopore and Illumina assembly are represented in blue. Additional details are described in Material and Methods.

The hybrid assembly of the genome generated for the *L. amazonensis* M2269 strain was then used as the reference genome to assemble PM-resistant lines and clinical isolates genomes. Ploidy estimation of PM-resistant lines and clinical isolates was generated using Illumina reads aligned with the M2269 hybrid assembly by BWA program and performed using the ggplot2 package in statistical programming language in R. Somy calculation of each chromosome was done using the ratio of median coverage of each chromosome and the median genome coverage.

For variant identification, such as multiple nucleotide polymorphisms (MNPs), single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions/deletions (InDels), Illumina reads were analysed in Freebayes v.1.3.6 and SnpEff v.4.3t was used for annotation of variants. SNPs were filtered by quality >2,000. To confirm SNVs, polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by Sanger sequencing using *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Thermo Fisher Scientific) was performed. The primers used for gene amplification and Sanger sequencing are listed at Supplementary Table 1. Sequencing was carried out in an ABI 3500XL DNA Analyzer Automatic Sequencer (Life Technologies, Applied Biosystems). The nucleotide sequence analysis was performed using Lasergene Software (DNASTAR) and Clone Manager v.9.0 Software.

Supplementary Table 1. List of primers used in this study.

Primer	Target	Sequence (5' → 3')
Gene overexpression		
PTP-F (LAMA_050007600)	PTP	CGC AAGCTT CCGAAAGCACACACACACA (HindIII)
PTP-R (LAMA_050007600)		CGC TCTAGA CCACCCTCTCCTGATCTTCT (XbaI)
L23a-F (LAMA_060011100)	L23a	CGC AAGCTT ATCCACGTTTCGACCAAAAGG (HindIII)
L23a-R (LAMA_060011100)		CGC TCTAGA ACAAGGAGGAGGGAGAGATG (XbaI)
rMETTL-F (LAMA_230011000)	rMETTL	CGC CCTGCAGG TTGATGCGTAGTGAAGTGGC (SbfI)
rMETTL-R (LAMA_230011000)		CGC TCTAGA GCATCTGTGTATGTGCCCAA (XbaI)
PDF-F (LAMA_310018900)	PDF	CGC AAGCTT TTTGTAGGGGCTCGTTTGTG (HindIII)
PDF-R (LAMA_310018900)		CGC CCTGCAGG AGAGATCAACTTGCCACACC (SbfI)
CDPK1-F (LAMA_320027400)	CDPK1	CGC AAGCTT CTGTATGTGTGTGTGTGCGT (HindIII)
CDPK1-R (LAMA_320027400)		CGC TCTAGA GGCACAGGGTCATGGATAC (XbaI)
Conventional PCR		
Puro-F2	PURO	ACGTTCTGTGTGTGTGCTATC
Puro-R2		GGAGACCAAAAAGAGACTCGC
Blast-F3	BLAST	TGCCTGTCTCTCTGTCTCTC
Blast-R3		GCTGTCCATCACTGTCCTTC
PTP-F1 (LAMA_050007600)	PTP	CGTAAAGGTCATCGGGCATT
PTP-R1 (LAMA_050007600)		CGAGTACATGACGTAGCTGC
rMETTL-F1 (LAMA_230011000)	rMETTL	GATCCGTTTGTAAACCAAGGC
rMETTL-R1 (LAMA_230011000)		CCCACCAAGAAAGCCTCATC
PDF-F1 (LAMA_310018900)	PDF	CCAGACGAGAAGGAGTACGA
PDF-R1 (LAMA_310018900)		CACACAAAGACACACACGGT
CDPK1-F1 (LAMA_320027400)	CDPK1	GTGGCTGTGTCCTCTTCTTC
CDPK1-R1 (LAMA_320027400)		GTACCACATTGTCGTCAGGG
HSP70-F	HSP70	GGACGCCGGCACGATTCT
HSP70-R		CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC

Restriction enzymes sites are highlighted in bold.

2.10 Transfection, DNA manipulation and functional validation of candidate genes

Full and/or partial knockouts were generated using the CRISPR-Cas9-based approach as previously described (Beneke, Madden et al. 2017). The primers to generate single guide RNAs (sgRNAs) and DNA repair cassettes for each gene target were generated using the web tool LeishGEdit (<http://www.leishgedit.net/Home.html>) (Supplementary Table 2) based on the genome of the *L. mexicana* U1103 strain, a species most closely related to *L. amazonensis*. When necessary, the primers obtained were then adapted to the corresponding orthologs of the *L. amazonensis* M229 strain, for which the genome was obtained in this study. Primers targeting pTBlast or pTPuro plasmids were

used for the amplification of repair cassettes, generating knockouts through 30 bp homology arms to allow homologous recombination (Beneke, Madden et al. 2017). PCR reactions for DNA repair cassettes, containing antibiotic resistance genes, were performed using 30 ng of plasmid (pTBlast or pTPuro), 0.2 mM of dNTPs, 2 μ M of each forward and reverse primers, 1U Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), 1X Phusion GC Buffer, and distilled water to achieve final volume of 50 μ L. Each PCR reaction was run with the following steps: 98°C for 30 sec, followed by 35 cycles at 98°C for 10 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 2min 15sec, and final extension at 72°C for 7 min. For sgRNAs amplification, PCR reactions were set up in similar manner as DNA repair cassette, with the addition of 2 μ M of primer G00 (sgRNA scaffold) (5'-

AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC – 3') and a gene specific forward primer, as indicated in the Supplementary Table 2. The PCR steps used were 98°C for 30 sec, followed by 35 cycles at 98°C for 10 sec, 60°C for 10 sec and 72°C for 30 sec, with final extension of 72°C for 5 min.

Supplementary Table 2. List of primers used to generate mutant lines by CRISPR/Cas9 of candidate genes potentially involved in PM resistance.

Target	Repair cassette (5' → 3') ¹	5' sgRNA (5' → 3') ²	3' sgRNA (5' → 3') ²
<i>PTP</i> (LAMA_050007600)	TCTTCACTCCTCTCTGCGTCGC CTCTTCCGgtataatgcagacctgctgc TCCCGACGCTTGCGCTGTCTT CGGTGCGCCccaatttgagagacctgtgc	gaaattaatacgactcactata ggTGAATTTCGGGG AGCGTTAAAgttttag agctagaaatagc	gaaattaatacgactcactatagg GGCACGGGACGCAG TACGGTgttttagagctagaa atagc
<i>L23a</i> (LAMA_060011100)	TTCGAAAACGTCTTCTCGCTG AATCGAATTgtataatgcagacctgctgc CTCTAAGAGCCTTCGCGGGCC TCTGGAGAAccaatttgagagacctgtg c	gaaattaatacgactcactata ggAATGCTGTGAA ATGGGCACAgttttag agctagaaatagc	gaaattaatacgactcactatagg ATAAGTGCAAACGGT ATCTTgttttagagctagaaata gc
<i>rMETTL</i> (LAMA_230011000)	TCTTCTCTTCCCTTTACCATGA TTTTGCCGgtataatgcagacctgctgc GAGACGAGACGGAGGATGAG GCGAGGTGGTccaatttgagagacctgtg gc	gaaattaatacgactcactata ggGCGCATGCAGC CGCATTTTCGgttttaga gctagaaatagc	gaaattaatacgactcactatagg ATGCGCTGCTGTGCT ATGGAgttttagagctagaaat agc
<i>PDF</i> (LAMA_310018900)	GCTGGGGGCAGCCGTTATCGA AGACTGGCCgtataatgcagacctgctg c CCATCACGACGAAGTCTGCCA AAGCAAACCccaatttgagagacctgtg c	gaaattaatacgactcactata ggAGAACGCGGTG ATCGACTCAgttttag agctagaaatagc	gaaattaatacgactcactatagg GCTGCTCGCTTGCCC TTTACgttttagagctagaaata gc
<i>CDPK1</i> (LAMA_320027400)	CTTTATCGCTCTGCACTGTCC GATATCTGAgataatgcagacctgctgc CGCGCACAAACAGAGGGAGA GAGAGGGAGGccaatttgagagacctg tgc	gaaattaatacgactcactata ggTGTGTCGCAGC AACGAGTAAgttttag agctagaaatagc	gaaattaatacgactcactatagg GTTGTCCTCCGGATT TGGTGgttttagagctagaaat agc

¹ Uppercase letter refers to the target gene sequence while lowercase letters to the pTBlast and pTPuro sequences for DNA repair cassette amplification.

² Uppercase letter refers to target gene sequence to be recognized by Cas9 endonuclease, after *in vitro* transcription by T7 RNA polymerase.

The *L. amazonensis* M2269 strain expressing Cas9 and T7 RNA polymerase (transfected with pT007 plasmid and maintained in presence of 32 µg/mL hygromycin B) was transfected with the DNA repair cassettes and sgRNA cassettes for each gene evaluated. Approximately 1.2×10^7 promastigotes at the logarithmic growth phase were used for each transfection. Parasites were washed with wash buffer (1.67 mL 3x Tb-BSF [1 mL of 1 M sodium phosphate dibasic, 350 µL of 1 M sodium phosphate monobasic, 75 µL of 1 M potassium chloride and 750 µL of 1 M HEPES, pH 7.4, 2,825 mL Milli-Q water], 500 µL of 1.5 mM calcium chloride and 2.83 mL of Milli-Q water), resuspended in 1x Tb-BSF buffer (25 µL of 1.5 mM calcium chloride, 83.5 µL of 3x Tb-BSF and Milli-Q water q.s. until 150 µL of volume) and then transferred to a electroporation cuvette with an interval of 0.2 cm (BioRad). A single pulse of the Amaxa Nucleofector II (program X-001) (Lonza) was used for electroporation (Beneke, Madden et al. 2017). After recovery of parasites for 24 h, the appropriate antibiotics were added (10 µg/mL blasticidin and/or 10 µg/mL puromycin [Thermo Fischer Scientific]) for selection of transfectants (full and/or partial knockouts), followed by cloning as described in item 2.2. For each clone, total gDNA was extracted using DNAzol, and the integration of each repair cassette was evaluated using a diagnostic PCR to confirm the presence of the drug resistance marker at the expected *locus*.

Gene overexpression was achieved by amplifying the open reading frame of each gene by PCR with primers containing appropriate restriction enzymes for cloning in the expression vector pSPZEO, using standard protocols as described (Coelho, Leprohon et al. 2012). Primers for gene amplification were designed using Primer3 (Koressaar and Remm 2007) and are listed in Supplementary Table 1. Constructions were confirmed by Sanger sequencing and then transfected into *L. amazonensis* as mentioned above. After 24 h, transfected promastigotes were selected in the presence of 300 µg/mL zeocin (Thermo Fischer Scientific).

Antibiotics used to select knockout and/or overexpressing transgenic lines of *L. amazonensis* were hygromycin B (50 mg/mL), blasticidin (10 mg/mL), puromycin (10 mg/mL) and zeocin (100 mg/mL).

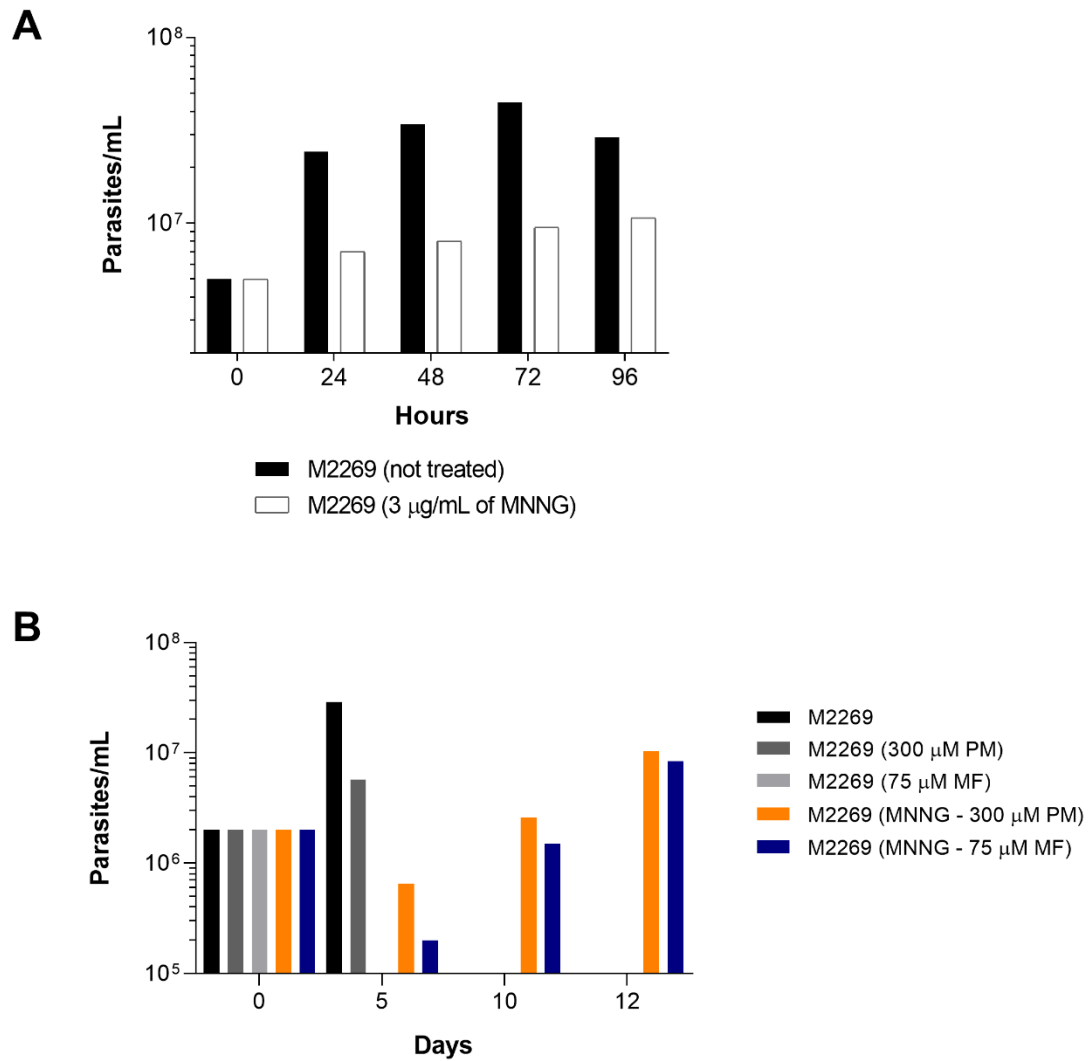
2.11 Statistical analysis

Statistical analyses were performed in the GraphPad Prism 8 software, using One-way ANOVA test and Tukey's multiple comparisons post-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

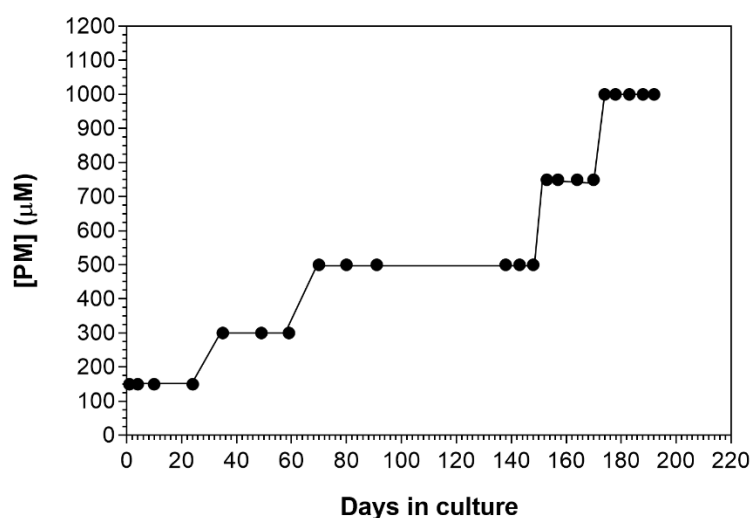
3.1 Generation of PM-resistant lines and *in vitro* characterization

To investigate the molecular basis of PM resistance in *L. amazonensis*, we used three different approaches to obtain resistant parasites: chemical mutagenesis, and stepwise selection at the promastigote and intracellular amastigote stages. For the first one, promastigotes were treated with 3 µg/mL of MNNG for 4 h. After a resting period of 96 h post-treatment (Supplementary Figure 2A), parasites were exposed to 300 µM of PM. A resistant population was obtained twelve days after drug exposure (Supplementary Figure 2B). This PM-resistant population was plated and five independent clones (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 and PM-M10) were selected for further resistance phenotypic characterization.



Supplementary Figure 2. *In vitro* selection of a PM-resistant population after treatment with the mutagenic agent MNNG. (A) Promastigotes of *L. amazonensis* M2269 strain were previously treated with 3 µg/mL MNNG for 4h, washed with PBS to remove the mutagenic agent and then grew in M199 medium until growth recovery (approximately 96 h post-treatment). (B) Selection of a PM-resistant population of *L. amazonensis* after treatment with MNNG and selection with PM. On the twelfth day, a resistant population was obtained in presence of PM. MF was used as a control to also select a resistant population.

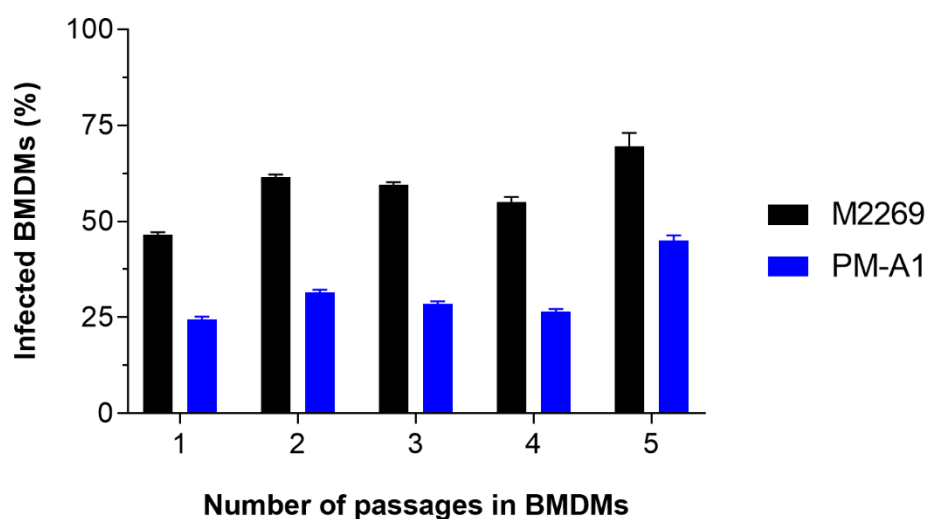
Stepwise selection at the promastigote stage started at an initial concentration of 150 μM , based on the EC_{50} value of the M2269 strain ($177.76 \mu\text{M} \pm 12.34$, Table 1). The concentration of PM was increased after at least three passages up to 1 mM. This PM-resistant population was obtained after approximately 180 days of selection (Supplementary Figure 3), when the population was plated in semisolid medium and two independent clones (PM-P1 and PM-P2) were then selected for *in vitro* drug susceptibility evaluation and WGS. PM-P2 line was also maintained without drug pressure for at least twenty passages in culture as promastigote (PM-P2^{-PM}).



Supplementary Figure 3. Schematic representation of *in vitro* selection of a PM-resistant population through stepwise selection. Each passage of population in culture is indicated by black circles at the corresponding PM concentrations.

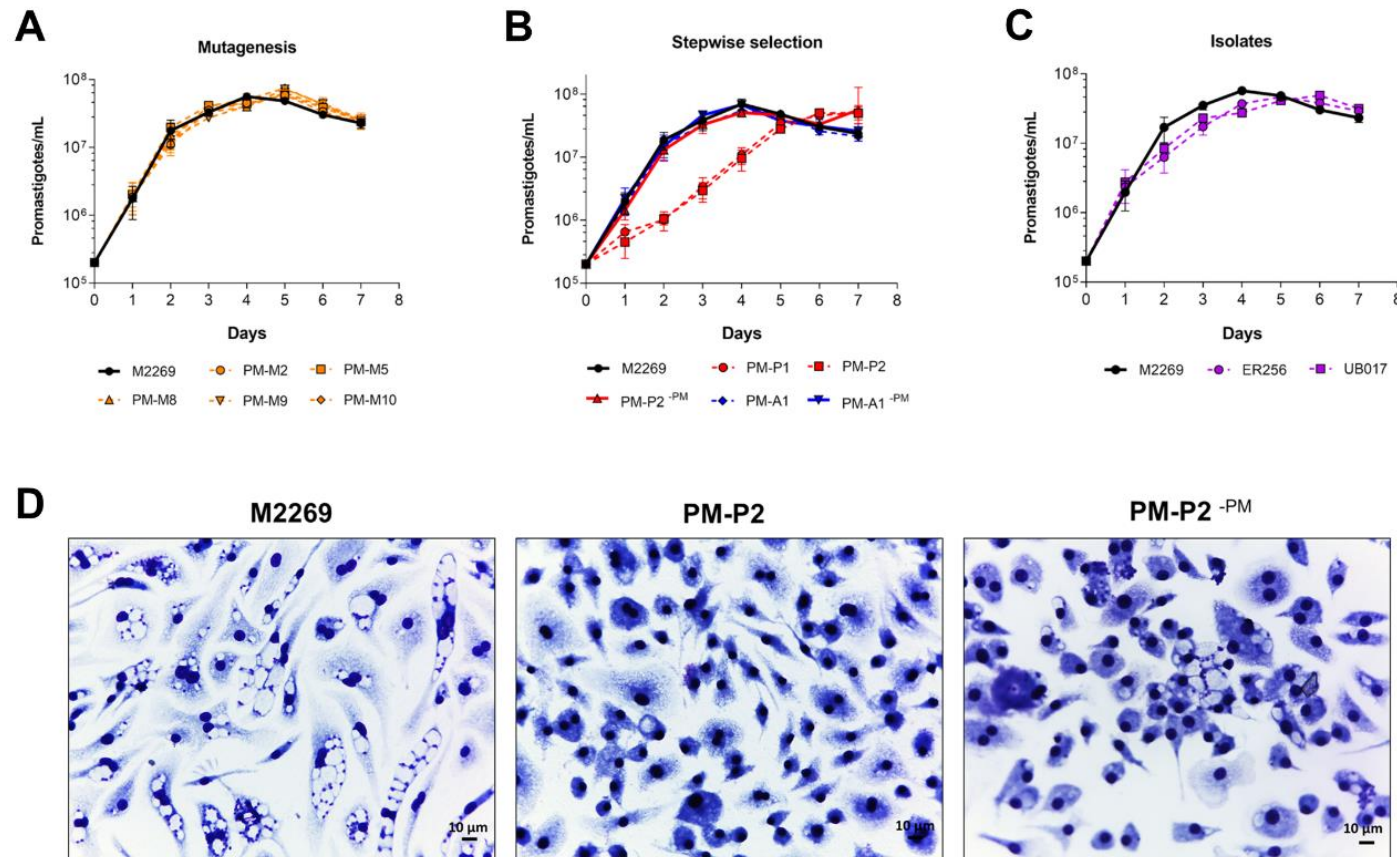
A PM-resistant population at the amastigote stage was also generated using BMDMs infected with the M2269 strain and treated with 60 μM PM for 7 days. This concentration was based on the EC_{50} value of this strain ($57.96 \mu\text{M} \pm 4.16$, Table 1). After treatment, amastigotes were recovered, differentiated into promastigotes and then used to reinfect BMDMs for four other consecutive passages (Supplementary Figure 4). This PM-resistant population was then cloned and a clonal line was used for further studies, which

was termed as PM-A1. This line was also maintained without drug pressure for at least twenty passages in culture as promastigote (PM-A1^{-PM}).



Supplementary Figure 4. Selection of a *L. amazonensis* PM resistant line at amastigote stage. BMDMs were infected with promastigotes of *L. amazonensis* at stationary phase and then treated or not with 60 μ M PM (PM-A1 and M2269 strain respectively) for five consecutively passages. Legend: PM-A1, PM-resistant line selected at amastigote stage.

Once PM-resistant lines were obtained, parasite growth at the promastigote stage was evaluated. Almost all PM-resistant lines showed similar growth patterns compared with the M2269 strain, with exception of PM-P1 and PM-P2 lines, which had slower growth until the early stationary phase (Supplementary Figure 5A and 5B). In absence of PM for at least twenty passages, the generated line named as PM-P2^{-PM}, reestablished the same growth profile as the M229 strain (Supplementary Figure 5B). PM-A1 line also had a similar growth profile as promastigotes when compared with the M2269 strain, as well as PM-A1^{-PM} (Supplementary Figure 5B). Finally, the clinical isolates also presented a similar pattern of growth with the reference strain and PM-resistant lines (Supplementary Figure 5C).



Supplementary Figure 5. Phenotypic characterization of PM-resistant lines and isolates of *L. amazonensis*. Growth curves of PM-resistant lines selected by (A) *in vitro* mutagenesis (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 and PM-M10), (B) stepwise selection at promastigote (PM-P1, PM-P2 and PM-P2^{-PM}) and amastigote stages (PM-A1 and PM-A1^{-PM}) and (C) clinical isolates (ER256 and UB017). (D) Infected BMDMs with the M2269 strain, and PM-P2 and PM-P2^{-PM} resistant lines. After 3 h of incubation, infected BMDMs were fixed and stained (Bar: 10 μ m).

As intracellular amastigotes, the PM-resistant lines showed rates of infection in BMDMs that ranged from 62% to 90%, while the average number of amastigotes per macrophage ranged from 5.18 to 10.34 (Table 1). PM-resistant lines selected by mutagenesis had infection rates of 71% to 89% and presented a number of amastigotes per macrophage similar to the M2269 strain (Table 1). The exception was PM-M2, which showed a higher number of amastigotes per macrophage (Table 1). Differently, the PM-resistant lines selected at the promastigote stage (PM-P1 and PM-P2) were not able to infect BMDMs, whose phenotype was only reestablished when parasite was maintained in the absence of PM (PM-P2^{-PM}) (Table 1 and Supplementary Figure 5D).

PM-A1 showed a higher infection rate in BMDMs (90%) than the wild-type strain (M2269), whose infection rate was 69% (Table 1). An increased number of amastigotes per macrophage was also found in PM-A1 when compared with the parental strain (Table 1). PM-A1^{-PM} showed a reduction in the infection rate compared with PM-A1 (Table 1). Finally, the ER256 and UB017 isolates presented a small variation in infection rates (74 and 80% respectively), while the M2269 strain presented an infection rate of 69% (Table 1). The number of amastigotes per macrophage was similar between the M2269 strain and the UB017 isolate, whereas ER256 isolate presented a higher number of amastigotes per macrophage compared with the M2269 strain (Table 1).

Table 1. *In vitro* activity of PM against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. amazonensis* M2269 reference strain, PM-resistant lines generated by three different strategies of drug selection and highly susceptible clinical isolates.

Strain/ Resistant Line	Promastigote		Amastigote					
	EC ₅₀ ± SD ¹ (RI) ²	p ³	EC ₅₀ ± SD ¹ (RI) ²	p ³	Infection (%) ⁴	p ³	Amastigote/Mφ ⁵	p ³
M2269	177.76 ± 12.34	-	57.96 ± 4.16	-	69	-	6.14	-
<i>In vitro</i> mutagenesis								
PM-M2	540.76 ± 28.18 (3.04)	***	270.6 ± 2.5 (4.66)	***	89	***	10.16	***
PM-M5	665.07 ± 10.21 (3.74)	***	311.6 ± 5.23 (5.37)	***	76	ns	9.24	ns
PM-M8	960.9 ± 27.1 (5.4)	***	206.13 ± 9 (3.55)	***	86	***	10.34	ns
PM-M9	627.43 ± 40.62 (3.53)	***	246.53 ± 3.24 (4.25)	***	71	ns	8.12	ns
PM-M10	852.02 ± 22.81 (4.79)	***	>500 (>8.62)	***	87	***	8.48	ns
Stepwise selection at promastigote stage								
PM-P1	2,021 ± 53.86 (11.37)	***	ND	-	ND	-	ND	-
PM-P2	1,733.75 ± 34.9 (9.75)	***	ND	-	ND	-	ND	-
PM-P2 ^{-PM}	513.96 ± 18.34 (2.89)	***	65.85 ± 4.33 (1.13)	ns	62	**	5.18	ns
Stepwise selection at amastigote stage								
PM-A1	515.16 ± 20.43 (2.89)	***	383.03 ± 4.7 (6.6)	***	90	***	9.01	***
PM-A1 ^{-PM}	233.7 ± 14.14 (1.31)	***	74.84 ± 7.62 (1.29)	***	67	ns	5.21	ns
Clinical isolates								
ER256	46.23 ± 6.3 (0.26)	***	0.82 ± 0.06 (0.01)	***	74	ns	8.36	ns
UB017	63.3 ± 5.54 (0.35)	***	1.22 ± 0.2 (0.02)	***	80	**	6.27	ns

¹ Mean of EC₅₀ value ± standard deviation of at least three independent experiments for each strain or PM-resistant line in μM;

² Resistance Index (RI), ratio between the EC₅₀ value of the PM-resistant line or clinical isolate and the EC₅₀ value of the M2269 strain;

³ *** *p* < 0.01 and **** *p* < 0.001 compared with M2269 strain using the “One way ANOVA” test with Tukey post-test in GraphPad Prism software 8.

⁴ Percentage of infected BMDMs;

⁵ Mean of number of amastigotes per infected macrophage.

ND: not determined;

ns: no significant.

3.2 Susceptibility of PM-resistant lines and clinical isolates to PM

In vitro susceptibility to PM was evaluated in both stages of the parasite. All PM-resistant lines selected *in vitro* had their EC₅₀ values at least 2.9-fold higher than the M2269 strain (Table 1). Specifically, the EC₅₀ values of PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis were up to 5-fold higher than the M2269 strain at promastigote stage and up to more than 8-fold higher at the amastigote stage (Table 1). PM-M10 had an EC₅₀ value at the amastigote stage higher than the CC₅₀ in BMDMs ($536.60 \pm 27.1 \mu\text{M}$) (Coser, Ferreira et al. 2020), making it not possible to calculate the EC₅₀ value for this resistant line (Table 1).

Parasites selected by stepwise selection at the promastigote stage (PM-P1 and PM-P2) had EC₅₀ values between 9 and 11-fold higher than the M2269 strain as promastigotes and were unable to infect BMDMs as mentioned before (Table 1 and Supplementary Figure 5D). When maintained in the absence of PM, a significant reduction in the EC₅₀ value at the promastigote stage was observed, accompanied by the recovery of the infection capacity of PM-P2^{-PM} line (Table 1 and Supplementary Figure 5D). In addition, its EC₅₀ value to PM in the amastigote stage was similar to the wild-type strain (Table 1).

Due to the inability of PM-P2 line to infect BMDMs, we also evaluated the capacity of this resistant line to infect BALB/c mice. Animals were infected with either the M2269 strain, PM-P2 or PM-P2^{-PM}. The lesion size was measured throughout eight weeks post-infection. Mice infected with PM-P2 had, on average, lesions of 0.13 mm, while animals infected with the M2269 strain and PM-P2^{-PM} showed lesions of 1.75 and 0.63 mm, respectively (Figure 2A and 2B). This indicates that, in the absence of drug pressure, PM-P2^{-PM} could partially restore its capacity of cause lesion in mice. The parasite burden was also evaluated in mice infected with these three lines. These findings showed that animals infected with PM-P2 line had around a 1,000-fold reduction in parasite burden compared with animals infected with the M2269 strain, while animals infected with PM-P2^{-PM} line had a similar parasite burden (Figure 2C). Considering the highly reduced lesion size and parasite burden in mice infected with PM-P2, the response *in vivo* to PM treatment was not evaluated.

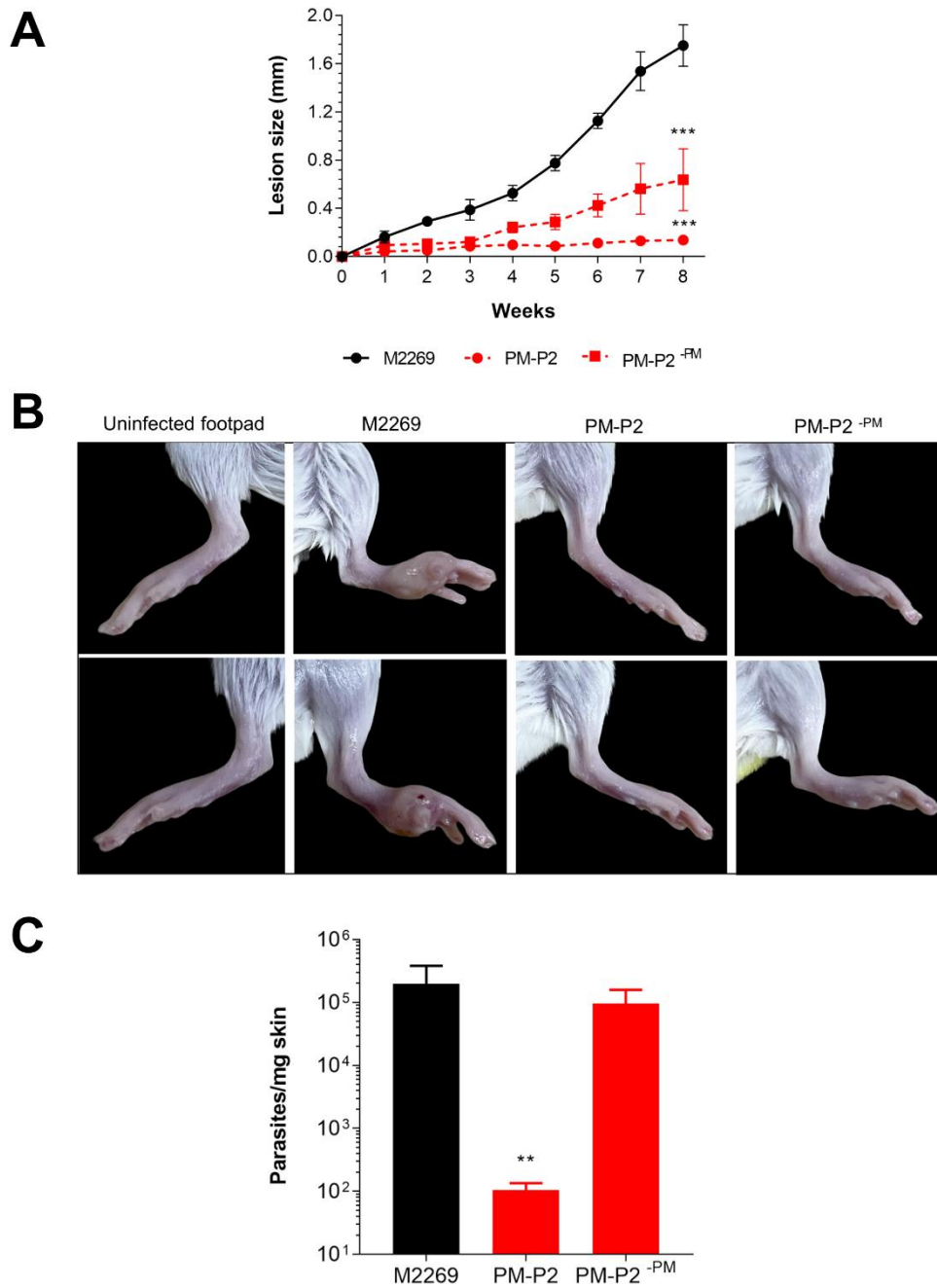


Figure 2. *In vivo* infection of *L. amazonensis* PM-P2 resistant line selected by stepwise selection at promastigote stage. Mice were infected with 1×10^6 promastigotes in stationary growth phase of the M2269 strain and PM-resistant lines: PM-P2 and PM-P2^{-PM} (maintained in absence of PM for at least 20 passages *in vitro*). (A) Evolution of the lesion size of infected mice and (B) footpads of two representative mice infected with the M2269 strain or PM-resistant lines after 8 weeks post-infection. (C) Quantification of parasite burden by real-time PCR after 8 weeks post-infection. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

0.001 compared with the group of mice infected with M2269 strain using the “One way ANOVA” test with Tukey post-test in GraphPad Prism software 8.

PM-A1 line had EC_{50} values of 2.9 and 6.6-fold higher than the M2269 strain at the promastigote and amastigote stages, respectively (Table 1). Additionally, PM-A1^{PM} had a significant reduction in the EC_{50} values in both stages of the parasite, whose values were similar to those of the M2269 parental strain (Table 1).

PM-A1 line generated larger lesions in mice than the M2269 strain (Figure 3C), and therefore the *in vivo* response to PM was evaluated. Animals were infected with either the M2269 strain or PM-A1. After four weeks of infection, animals were treated with two different schemes, 150 or 600 mg/kg/day of PM for 14 days, in addition to the untreated control groups (Figure 3). A significant reduction in the lesion size of mice infected with the M2269 strain was observed, as expected, in both treated groups, with a reduction of 65% for the lower dose and 96% for the higher dose, respectively (Figure 3A). These reductions reflected in the parasite burden, which were decreased by 63 and 98-fold when compared with the untreated group (Figure 3B). In mice infected with PM-A1, the lesion size was partially reduced, with only 55% and 66% reduction in animals treated with 150 and 600 mg/kg/day, respectively, compared with the untreated group (Figure 3C). However, when parasite burden was measured, there was only a partial reduction in mice treated with the higher dose, while animals treated with the lower dose had no significant difference when compared with the untreated group (Figure 3D).

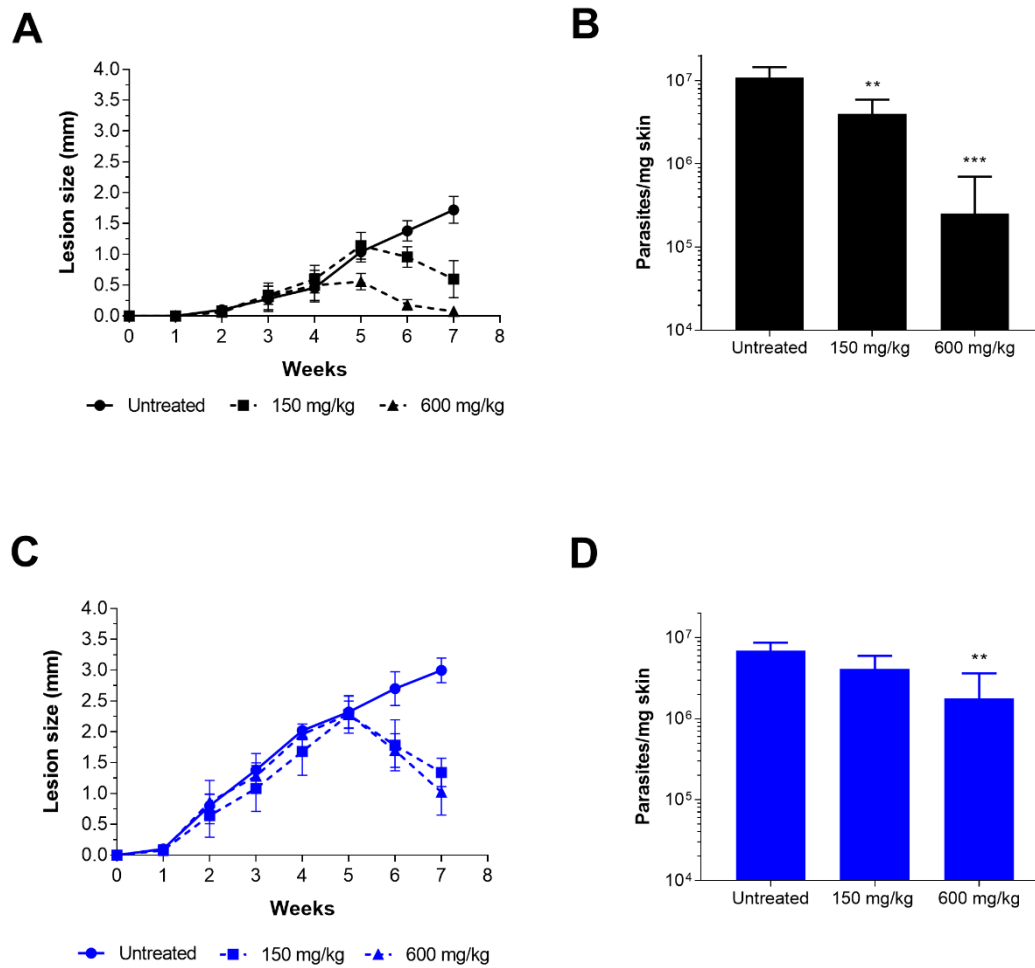


Figure 3. Evaluation of PM efficacy in BALB/c mice infected with the *L. amazonensis* M2269 strain and the PM-A1 resistant line. Animals were infected with stationary-phase promastigotes in the right hind footpad of the M2269 strain (A and B) and the PM-resistant line PM-A1 (C and D). Evolution of lesion size in animals infected over the weeks (A and C). Treatment was started on the 5th week post-infection, with dosages of 150 and 600 mg/kg/day of PM for 14 days. Quantification of parasite burden by real-time PCR at the end of the treatment at 7th week post-infection (B and D). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the untreated group using the “One way ANOVA” test with Tukey post-test in GraphPad Prism software 8.

To evaluate whether, at the end of treatment *in vivo*, the resistance phenotype was stable, parasites of two animals of each group, both treated and untreated, were isolated and characterized regarding their *in vitro* susceptibility to PM as promastigotes.

Parasites from one mice of the untreated group was more susceptible at the amastigote stage after infection, indicating the partial loss of resistance after 7 weeks of infection. On the other hand, parasites from the other mice of the untreated group were less susceptible to PM at the amastigote stage after infection (Supplementary Table 3). Interestingly, M2269 promastigotes isolated from the treated mice had an increase in EC_{50} values when compared with the untreated group (Supplementary Table 3). In contrast, PM-A1 isolated from treated mice showed lower EC_{50} values compared with the untreated group, indicating a partial loss of resistance in this line throughout the treatment, despite this phenotype being considered resistant compared with the parental and susceptible M2269 strain (Supplementary Table 3).

Supplementary Table 3. *In vitro* susceptibility to PM of parasites obtained from infected BALB/c mice with the M2269 strain or PM-A1 resistant line treated or not with 150 and 600 mg/kg/day of PM.

Strain/ Resistant line	Promastigote			Amastigote				
	EC ₅₀ ± SD ¹ (RI) ²	p ³	EC ₅₀ ± SD ¹ (RI) ²	p ³	Infection (%) ⁴	p ³	Amastigote/Mø ⁵	p ³
M2269 (before infection)	177.76 ± 12.34	-	57.96 ± 4.16	-	69	-	6.14	-
M2269 (untreated) ^(a)	175.3 ± 14.07 (0.98)	ns	65.82 ± 2.55 (1.13)	*	66	ns	5.33	ns
M2269 (untreated) ^(b)	206 ± 8.57 (1.15)	**	70.47 ± 2.02 (1.21)	***	65	ns	6.18	ns
M2269 (150 mg/kg) ^(a)	297.83 ± 11.03 (1.67)	***	146.3 ± 4.47 (2.52)	***	47	***	6.32	ns
M2269 (150 mg/kg) ^(b)	295.53 ± 3.29 (1.66)	***	145.3 ± 5.57 (2.5)	***	47	***	6.24	ns
M2269 (600 mg/kg) ^(a)	393.86 ± 5.95 (2.21)	***	198.3 ± 2.93 (3.42)	***	85	***	6.86	ns
M2269 (600 mg/kg) ^(b)	237.96 ± 18.21 (1.34)	***	176.1 ± 2.62 (3.03)	***	88	ns	7.00	ns
PM-A1 (before infection)	515.16 ± 20.43	-	383.03 ± 4.7	-	90	-	9.01	-
PM-A1 (untreated) ^(a)	461.96 ± 5.52 (0.89)	**	439.1 ± 6.6 (1.14)	***	94	ns	10.54	ns
PM-A1 (untreated) ^(b)	481.63 ± 21.75 (0.93)	ns	195.63 ± 2.9 (0.51)	***	86	ns	10.88	ns
PM-A1 (150 mg/kg) ^(a)	434.6 ± 15.56 (0.84)	***	332.1 ± 3.8 (0.86)	***	90	ns	8.00	ns
PM-A1 (150 mg/kg) ^(b)	372.2 ± 20.84 (0.72)	***	114.46 ± 11.3 (0.3)	***	69	***	9.55	ns
PM-A1 (600 mg/kg) ^(a)	346.3 ± 23.76 (0.67)	***	148.3 ± 5.7 (0.38)	***	89	ns	9.13	ns

¹ Mean of EC₅₀ values ± standard deviation of at least three independent experiments for each strain or PM-resistant line in µM;

² Resistance Index (RI), ratio between the EC₅₀ value of the M2269 strain or PM-A1 resistant line after mice infection and/or treatment and the EC₅₀ value of the M2269 strain or PM-A1 resistant line before mice infection;

³ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the M2269 strain using the “One way ANOVA” test with Tukey post-test in GraphPad Prism software 8.

⁴ Percentage of infected BMDMs.

⁵ Mean of the number of amastigotes per infected macrophage.

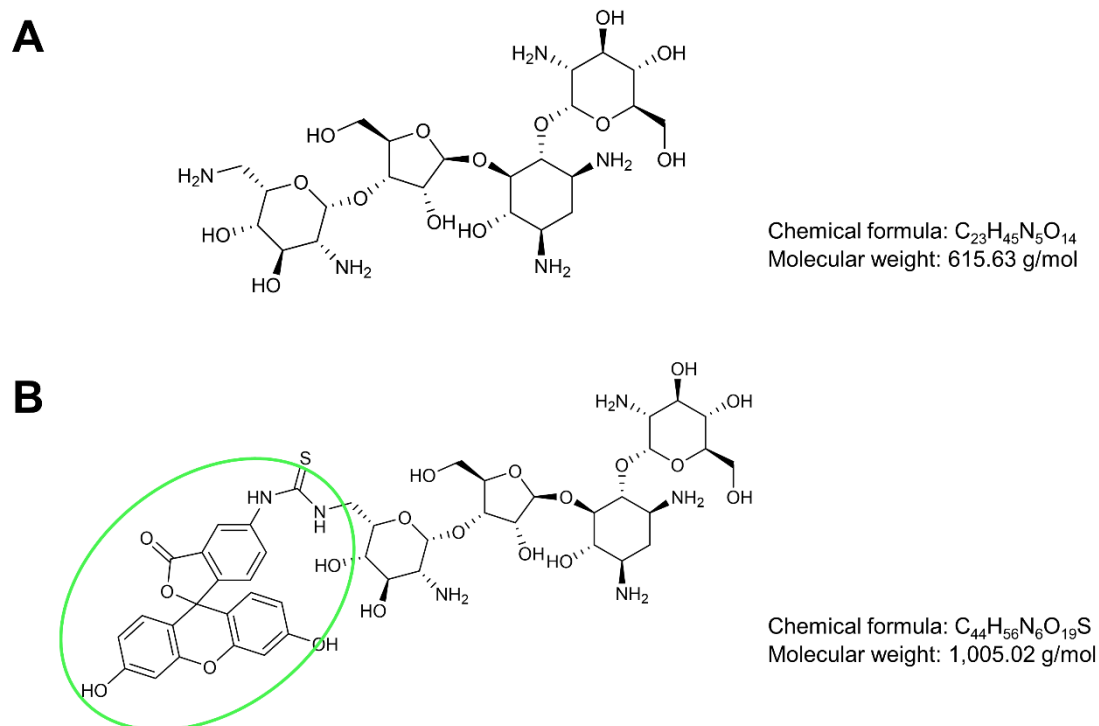
^(a or b) Indicates the number of the animal infected and treated or not with PM. In the group of animals infected with PM-A1 resistant line and treated with 600 mg/kg/day, parasites were recovered of only one animal.

ns: no significant.

The clinical isolates ER256 and UB017 were previously characterized as highly susceptible *in vitro* when compared with the M2269 reference strain, particularly at the amastigote stage (Coser, Ferreira et al. 2021). For the ER256 isolate, we previously demonstrated a direct correlation between susceptibility *in vitro* and treatment outcome *in vivo* (Coser, Ferreira et al. 2020). Both isolates were plated, and clones were obtained before *in vitro* susceptibility assays and WGS. The EC₅₀ values for each clonal line of ER256 and UB017 isolates were approximately 3.8 and 2.8-fold and 70 and 47-fold lower than the EC₅₀ of the M2269 strain at the promastigote and amastigote stages, respectively (Table 1).

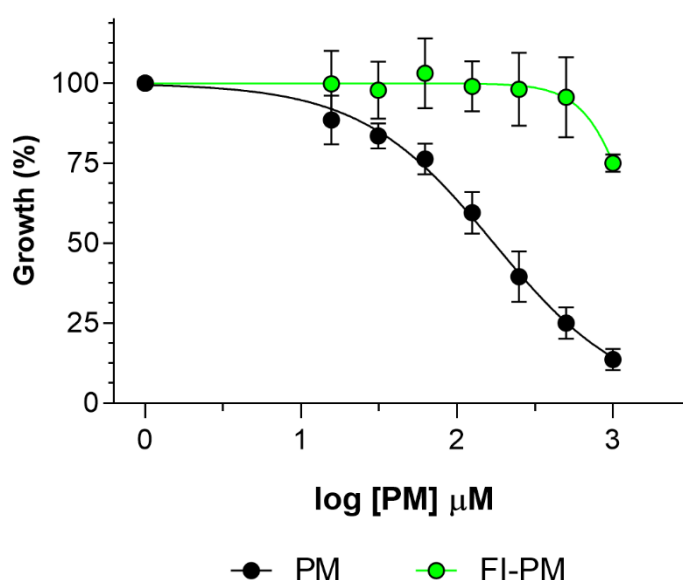
3.3 PM accumulation and possible involvement of vesicle-trafficking in PM resistance and susceptibility

To assess whether PM resistance and susceptibility could be due to differential accumulation, we measured PM accumulation by flow cytometry, using a fluorescent analogue of the drug (FI-PM) (Supplementary Figure 6).



Supplementary Figure 6. Chemical structure of the PM and its fluorescent analog FI-PM. The molecular weight of each molecule is also indicated.

Initially, we determined the *in vitro* activity of FI-PM against promastigotes of the M2269 strain. Unlike PM, FI-PM only partially inhibited the parasite growth (around 20% of inhibition) in the highest concentration (1,000 μM) (Supplementary Figure 7). Despite this difference in the activity of FI-PM, we measured its accumulation in PM-resistant lines and ER256 and UB017 isolates by fluorescence intensity using flow cytometry.



Supplementary Figure 7. Growth inhibition curve of PM and FI-PM against the *L. amazonensis* M2269 strain. Promastigotes were exposed to increasing concentrations of each compound for 24 h. Absorbance was measured and EC_{50} values were calculated as described in the item 2.3 of Material and Methods.

ER256 and UB017 isolates, which are highly susceptible to PM, accumulated more FI-PM than the M2269 strain (Figure 4A). Similarly, PM-resistant lines also accumulated more FI-PM than the M2269 strain, with exception of PM-P2^{-PM}, that showed similar fluorescence intensity pattern with the M2269 strain. These findings indicated that distinct mechanisms of PM uptake and metabolism may be involved PM-resistant lines and susceptible clinical isolates (Figure 4A). To investigate this hypothesis, a transmission electron microscopy was performed to evaluate whether the

intracellular pattern of organelles could be associated with the PM resistance and susceptibility phenotype in PM-resistant lines and highly susceptible isolates.

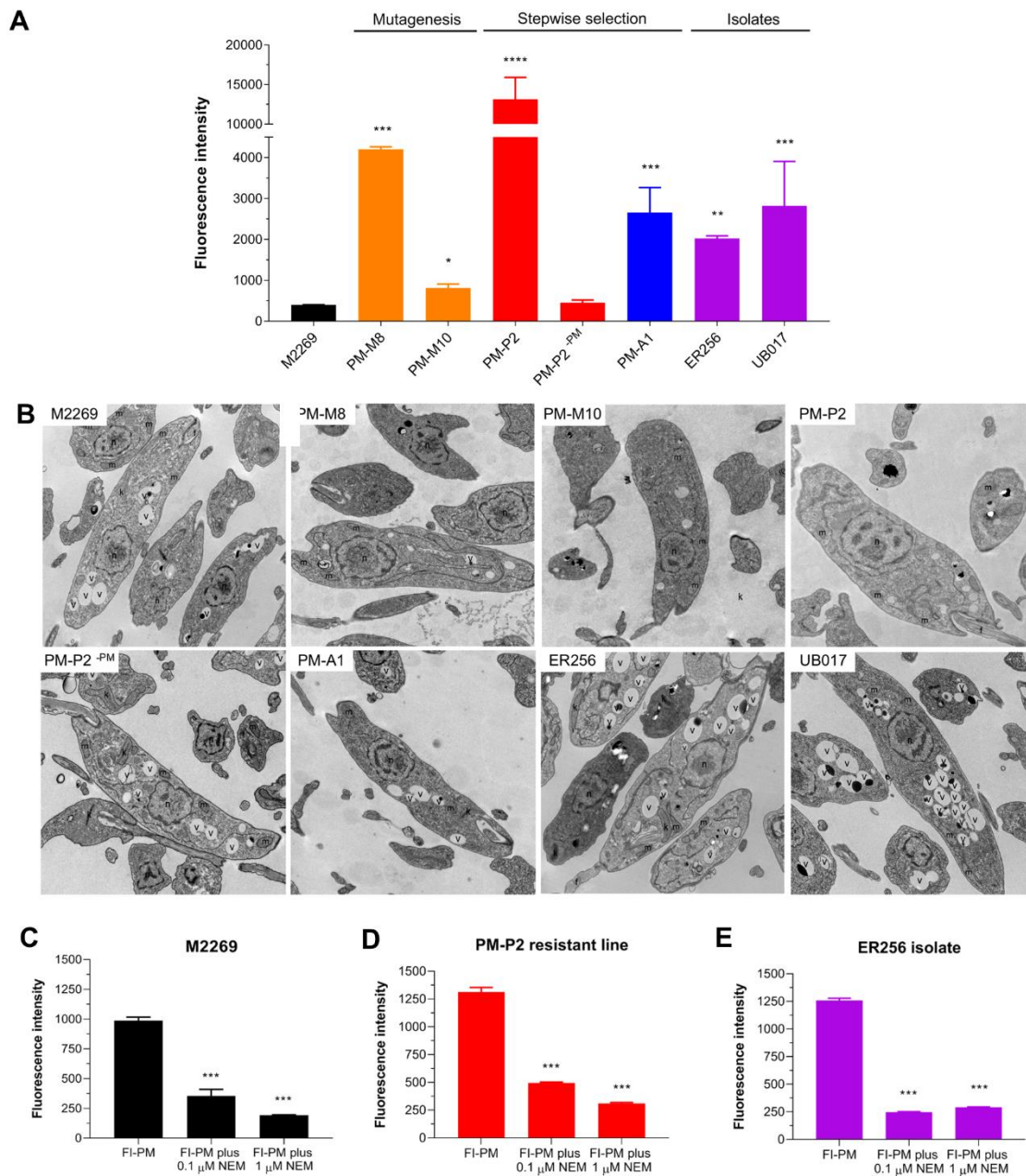


Figure 4. PM accumulation and role of vesicle trafficking in *L. amazonensis* promastigotes of PM-resistant lines and isolates. (A) Accumulation of FI-PM in M2269 strain, PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis (PM-M8 and PM-M10), stepwise selection at promastigote (PM-P2 and PM-P2^{PM}) and amastigote (PM-A1) stages and highly susceptible isolates ER256 and UB017, represented by fluorescence intensity. Parasites incubated in the absence of FI-PM were used as control. (B) Transmission electronic microscopy of the M2269 strain, PM-M8, PM-M10, PM-P2,

PM-P2^{-PM}, PM-A1, ER256 isolate and UB017 isolate. (C, D and E) FI-PM accumulation in presence of endocytic inhibitor NEM of M2269 strain, PM-P2 and ER256 isolate. Legend, f: flagellum; k: kinetoplast; m: mitochondria; n: nucleus; v: vesicular body. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with the M2269 strain using the “One way ANOVA” test with Tukey post-test in GraphPad Prism software 8.

While ER256 and UB017 isolates presented more vesicles in the cytoplasm when compared with the M2269 strain, whereas in PM-resistant lines a reduction in the number of vesicles was observed (Figure 4B). Based on these findings, NEM, an endocytic inhibitor (Vassilieva and Nusrat, 2008) was used to treat PM-resistant lines and isolates and investigate the possible role of endocytosis in PM resistance. Firstly, EC₅₀ values of this inhibitor against the M2269 strain, isolate ER256 and PM-P2 resistant line were determined, which were chosen to represent the lines used in this study. Promastigotes were incubated with NEM for 24 h to determine the nontoxic concentrations for these lines. The EC₅₀ value of the M2269 strain was $2.69 \pm 0.73 \mu\text{M}$, while the ER256 isolate and PM-P2 were less susceptible to NEM (EC₅₀ values of 7.44 ± 1.27 and $7.02 \pm 1.64 \mu\text{M}$, respectively) (Supplementary Table 4).

Supplementary Table 4. *In vitro* activity of NEM against promastigotes of the M2269 strain, ER256 isolate and PM-P2 line.

Strain / Line / Isolate	EC ₅₀ ± SD ¹
M2269	2.69 ± 0.73
ER256	7.44 ± 1.27
PM-P2	7.02 ± 1.64

¹ Mean of EC₅₀ values ± standard deviation of at least three independent experiments in μM .

Fluorescence intensity was then measured after promastigotes were incubated with FI-PM, followed by treatment with nontoxic concentrations of NEM (0.1 and 1 μM) for 30 min. All treated lines (M2269 strain, ER256 isolate and PM-P2 line) accumulated less FI-PM in both NEM concentrations compared to control non-treated parasites,

indicating that NEM affects the uptake of FI-PM (Figure 4C-E). *In vitro* PM susceptibility was then evaluated in promastigotes incubated with nontoxic concentrations of NEM (0.01, 0.1 and 1 μ M) to investigate whether the lower uptake of PM could affect the susceptibility of parasites. The ER256 isolate and M2269 strain became more susceptible to PM in presence of NEM in a dose-dependent manner, while PM-P2 was completely refractory to the activity of the inhibitor (Table 2).

Table 2. *In vitro* activity of PM against promastigotes of the M2269 strain, PM-P2 line and the ER256 isolate in presence of nontoxic concentrations of the inhibitor NEM.

NEM [μ M]	EC ₅₀ ¹		
	M2269	PM-P2	ER256
0	177.76 $\pm$ 12.34	1,733.75 $\pm$ 34.9	46.23 $\pm$ 6.3
0.01	139.57 $\pm$ 7.1	>3,000	56.67 $\pm$ 6.89
0.1	76 $\pm$ 9.48	>3,000	10.43 $\pm$ 1.85
1	61.27 $\pm$ 8.06	>3,000	11.25 $\pm$ 3.65

¹ Mean of EC₅₀ values $\pm$ standard deviation of three independent experiments for each strain or PM-resistant line in μ M.

3.4 WGS of *L. amazonensis* M2269 strain, clinical isolates and PM-resistant lines

We sequenced *de novo* the genome of the *L. amazonensis* M2269 strain, which was previously sequenced in 2013 (Real, Vidal et al. 2013). This genome was sequenced using a strategy combining 454 GS-FLX Titanium (Roche) and Solexa (Illumina, Inc.) platforms and the final assembly generated 2,627 scaffolds (> 1,000 bp in length) with a genome size of 29.6 megabase (Mb) (Real, Vidal et al. 2013). This previously available genome lacks proper annotation and structural information, and WGS of this strain was obtained by assembling reads from Nanopore and Illumina platforms. Third- and fourth-generation sequencing technologies, such as PacBio and Nanopore, facilitated high-quality contig-level assemblies. Nanopore sequencing achieves N50 lengths of 10 to 100 kb, with high accuracy of 87 to 98% (Goodwin, McPherson et al. 2016) and it can cover repetitive regions with a single continuous read, allowing the assembly of less fragmented genomes (Rhoads and Au 2015, Lu, Giordano et al. 2016). It may impact the genome size, which was previously limited with short second-generation reads. Using Illumina, genome assembly with long reads is corrected

with short reads, allowing increased fidelity at the nucleotide level (Goodwin, McPherson et al. 2016).

The first assembly of the *L. amazonensis* M2269 strain genome with Nanopore reads using Canu v.2.2 assembler (Koren, Walenz et al. 2017) was generated in 83 contigs with a genome size of 35 Mb and N₅₀ length of 791,416 bp (data not shown). The Nanopore and Illumina libraries generated 192,023 and 21,896,666 reads, respectively, while the WGS coverage was 75 and 99-fold for Nanopore and Illumina reads, respectively (Supplementary Table 5). After combining and polishing with Illumina short reads using Pilon v.1.24 (Walker, Abeel et al. 2014), the final hybrid assembly of the M2269 strain genome was built in 46 contigs and 34 chromosomes, with an estimated genome size of 33 Mb and an overall GC content of 59.72%. A total number of 8,758 genes were annotated based on *L. mexicana* U1103 strain genes, which were classified as 8,575 protein-coding genes, 100 tRNAs, 2 snRNAs, 52 snoRNAs and 29 rRNAs (Supplementary Table 5). The chromosomes were syntenic to the 34 chromosomes of the *L. mexicana* U1103 strain and their size ranged from 272,641 to 3,479,341 bp, with an average length of 945,057.5 bp (Supplementary Table 5 and Supplementary Table 6). The junctions of the fusion events between both chromosomes 8 and 29, as well as 20 and 36, which were previously described in *L. mexicana* and *L. amazonensis* genomes, were mapped and confirmed in the M2269 strain (Britto, Ravel et al. 1998, Rogers, Hilley et al. 2011).

Supplementary Table 5. Summary of *L. amazonensis* M2269 strain genome assembly.

Parameters	<i>L. amazonensis</i> M2269 strain
Number of predicted genes	8,758
Gene density (genes/Mb)	259.25
Protein-coding genes	8,575
Pseudogenes	233
Genes with function	5,150
Pseudogenes with function	139
Non-coding genes	183
Overall GC content (%)	59.72
Coding GC content (%)	62.13
tRNA	100
snRNA	2
snoRNA	52
rRNA	29
mRNA	8,575
Total length (bp)	33,077,013
No. of Illumina reads	21,896,666
No. of Nanopore reads	192,023
No. of chromosomes	34
N ₅₀ length (bp)	1,224,556
Longest contig (bp)	3,479,341
Nanopore sequencing coverage	75x
Illumina sequencing coverage	99x
Chromosome average length	945,057.5

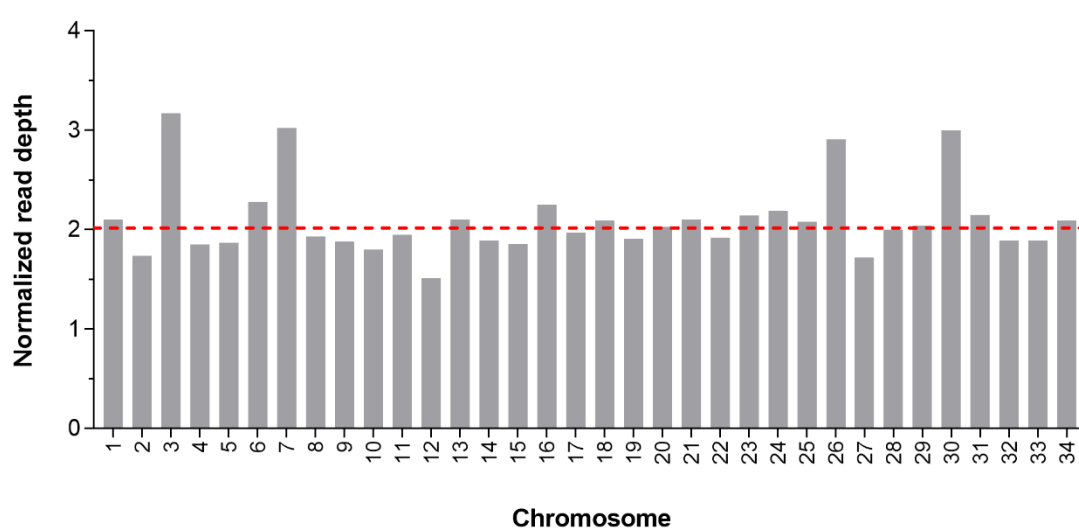
Mb, mega base; bp, base pair; tRNA, transfer RNA; snRNA, small nuclear RNA; snoRNA, small nucleolar RNA; rRNA, ribosomal RNA; mRNA, messenger RNA.

Supplementary Table 6. Chromosome size and number of genes in each chromosome of the *L. amazonensis* M2269 strain.

Chromosome	Size	Number of Genes
LAMA_00 ¹	14,268	-
LAMA_01	272,641	88
LAMA_02	361,810	76
LAMA_03	378,559	96
LAMA_04	484,279	137
LAMA_05	515,632	126
LAMA_06	489,123	140
LAMA_07	576,614	133
LAMA_08	1,724,697	463
LAMA_09	608,013	184
LAMA_10	592,255	169
LAMA_11	607,627	147
LAMA_12	722,765	191
LAMA_13	635,829	176
LAMA_14	656,851	168
LAMA_15	665,164	178
LAMA_16	690,985	183
LAMA_17	715,197	179
LAMA_18	710,332	170
LAMA_19	680,524	178
LAMA_20	3,479,341	947
LAMA_21	767,433	226
LAMA_22	706,791	184
LAMA_23	757,733	204
LAMA_24	850,017	248
LAMA_25	914,667	268
LAMA_26	1,065,254	278
LAMA_27	1,239,999	287
LAMA_28	1,224,556	345
LAMA_29	1,379,061	411
LAMA_30	1,641,789	400
LAMA_31	1,535,859	423
LAMA_32	1,558,094	393
LAMA_33	1,785,983	464
LAMA_34	2,067,271	548

¹ The chromosome LAMA_00 is composed by genomic regions of uncertain location.

Chromosome copy number in *L. amazonensis* M2269 strain was also determined based on the analysis of median read depth. Overall, all chromosomes are disomic with the exception of chromosomes 3, 7, 26 and 30, which are trisomic (Supplementary Figure 8). Chromosome 30 in this strain, as well as in *L. mexicana*, is equivalent in size and content to the chromosome 31 described for other species of the subgenus *Leishmania*, such as *L. major* and *L. infantum*. In these species, as well as *L. mexicana* and *L. amazonensis* PH8 strain, chromosome 30 was described as tetrasomic (Rogers, Hilley et al. 2011, Fernández-García, Mesquita et al. 2023).



Supplementary Figure 8. Chromosome copy number variation in the *L. amazonensis* M2269 strain. The average of chromosomal copy is represented by a dotted red line.

Allelic heterozygosity was analysed using Illumina reads in the M2269 hybrid assembly of the genome by SNP-calling (see Material and Methods for further details). Predictors identified 15,227 SNPs across the genome of the M2269 strain, which was a similar number to what was described in *L. mexicana* U1103 strain (12,531) (Rogers, Hilley et al. 2011). In other *Leishmania* species genomes, this number varies from 297 to 44,588 SNPs, depending on the *Leishmania* species (Rogers, Hilley et al. 2011, Camacho, González-de la Fuente et al. 2019).

To understand the molecular basis of PM resistance and susceptibility in *L. amazonensis*, the genomes of all PM-resistant lines here described, as well as the genomes of the highly susceptible clinical isolates ER256 and UB017, were sequenced by Illumina

platform and assembled with the new M2269 genome as reference. The genome coverage of PM-resistant lines and clinical isolates was at least 87-fold and more than 93% of reads were mapped in the hybrid assembly of the M2269 strain genome (Supplementary Table 7).

Supplementary Table 7. Summary of Illumina sequencing data of the genome of *L. amazonensis* PM-resistant lines and clinical isolates.

PM-resistant lines/ Isolate	Number of reads	Number of mapped reads	Mapped reads (%)	Genome coverage
PM-M2	20,622,504	20,265,010	98.3	93x
PM-M5	21,638,662	21,302,406	98.4	98x
PM-M8	21,510,782	21,057,548	97.9	97x
PM-M9	21,832,834	21,459,530	98.3	99x
PM-M10	22,213,944	21,890,298	98.5	100x
PM-P1	22,981,590	22,702,400	98.4	104x
PM-P2	21,187,782	20,930,560	98.4	96x
PM-P2^{-PM}	19,269,966	19,554,020	99.2	87x
PM-A1	21,436,176	20,087,958	93.4	97x
ER256	21,316,200	20,903,056	98.1	96x
UB017	21,900,532	21,309,217	97.3	99x

The chromosome copy number of all genomes was evaluated in comparison with the M2269 strain genome. Among PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis, no change was observed along the 34 chromosomes (Figure 5), while PM-resistant lines selected by stepwise selection had changes in chromosomes 3, 6 and 15 (Figure 5). Finally, isolates ER256 and UB017 presented changes in the copy number of chromosomes 3, 12, 23 and 26 (Figure 5).

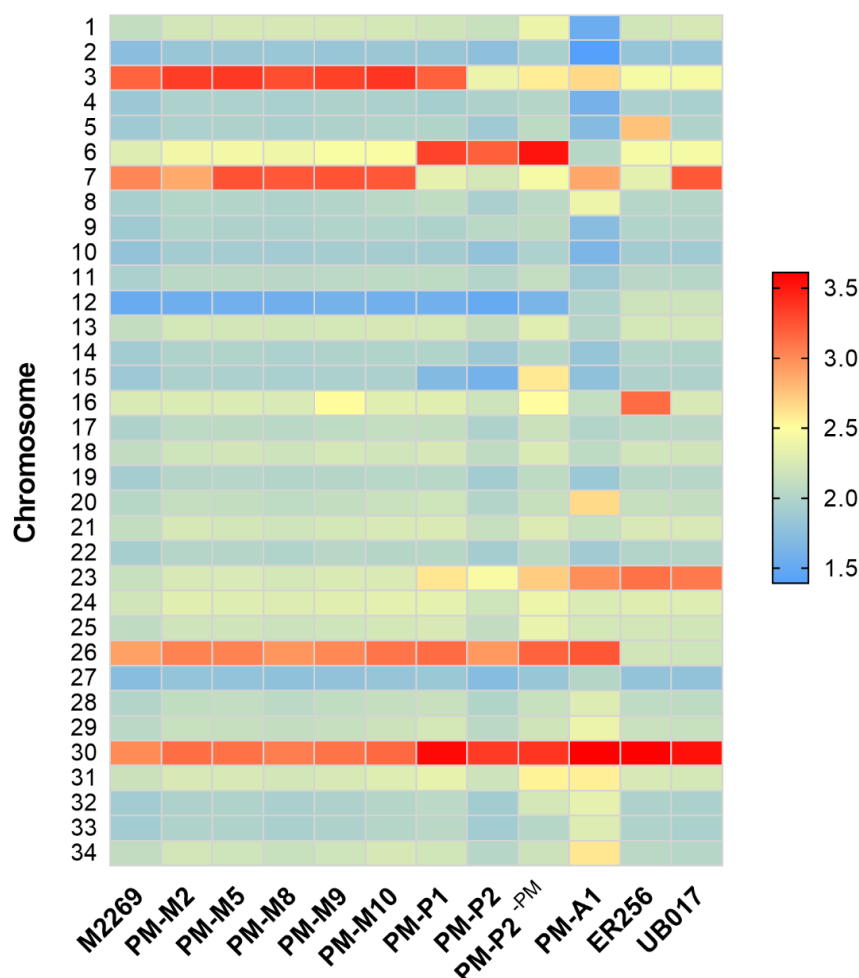
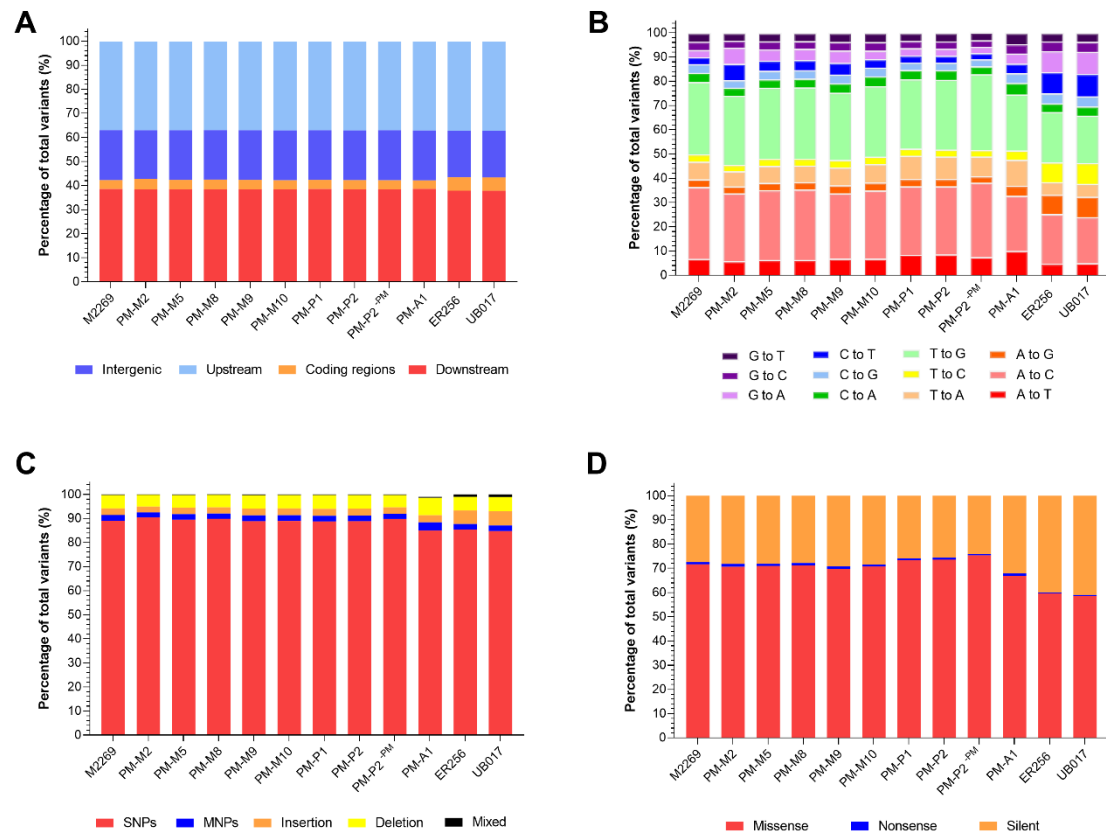


Figure 5. Chromosome copy number in PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 and PM-M10), by stepwise selection at promastigote (PM-P1, PM-P2 and PM-P2^{-PM}) and amastigote (PM-A1) stages and of the ER256 and UB017 isolates of *L. amazonensis* as well as the M2269 strain.

Among variants (SNPs, MNPs and InDels) detected in PM-resistant lines, isolates and in the M2269 strain, most of the variants were present in downstream regions, followed by upstream, intergenic, and coding regions (Supplementary Table 8 and Supplementary Figure 9A). The majority of SNPs in all genomes were a T to G change. However, an increase in transition mutations (between purine nucleotides [A and G] and pyrimidine nucleotides [T and C]) in PM-resistant lines generated by mutagenesis was found. This was probably due to the mutagenic agent MNNG, which commonly causes mutations between GC and AT (Supplementary Table 9 and Supplementary Figure 9B).

Supplementary Table 8. Percentage and total number of variants (SNPs, MNPs, insertions, deletions and mixed) in coding sequence, upstream, downstream and intergenic regions of the M2269 strain, PM-resistant lines and clinical isolates.

	Coding sequence	Upstream	Downstream	Intergenic
M2269	3.74% (15,791)	36.79% (155,420)	38.54% (162,799)	20.75% (87,656)
PM-M2	4.51% (21,842)	36.82% (178,161)	38.37% (185,649)	20.10% (97,281)
PM-M5	3.97% (17,449)	36.87% (162,079)	38.41% (168,844)	20.57% (90,447)
PM-M8	4.05% (18,138)	36.78% (164,453)	38.45% (171,908)	20.53% (91,806)
PM-M9	3.92% (16,440)	36.85% (154,475)	38.43% (161,081)	20.62% (86,424)
PM-M10	3.77% (15,717)	36.88% (160,128)	38.45% (160,128)	20.71% (86,252)
PM-P1	3.81% (15,367)	36.87% (148,655)	38.54% (155,377)	20.60% (83,074)
PM-P2	3.83% (15,747)	36.93% (151,654)	38.46% (157,938)	20.59% (84,546)
PM-P2^{-PM}	3.83% (17,356)	36.89% (167,196)	38.38% (173,940)	20.73% (93,950)
PM-A1	3.49% (11,673)	36.97% (123,527)	38.64% (129,114)	20.70% (69,165)
ER256	5.52% (35,717)	36.98% (239,218)	37.90% (245,176)	19.40% (125,508)
UB017	5.54% (34,382)	37.03% (229,741)	37.83% (234,714)	19.41% (120,412)



Supplementary Figure 9. Percentage of variants (SNPs, MNPs and Indels) in genomes of the M2269 strain, PM-resistant lines, and clinical isolates. (A) Percentage of total number of variants in coding regions, upstream, downstream, and intergenic regions. (B) Percentage of variants base changes in PM-resistant lines, clinical isolates and M2269 strain. (C) Percentage of variants by type (SNP, MNP, Insertion, Deletion or Mixed). (D) Percentage of variants effects by missense, nonsense, and silent functional classes. Bar colours represent each variant base change, type, region, or functional class, as indicated in the Figure.

Supplementary Table 9. Base, codon and amino acid and change prevalences in the genome of the M2269 strain, PM-resistant lines, and isolates.

	Base change prevalence	Codon change prevalence	Amino acid change prevalence
M2269	T > G	AAG > ACG	P > P
PM-M2	T > G	AAG > ACG	P > P
PM-M5	T > G	AAG > ACG	P > P
PM-M8	T > G	AAG > ACG	P > P
PM-M9	T > G	AAG > ACG	P > P
PM-M10	T > G	AAG > ACG	P > P
PM-P1	T > G	TTC > GTC	P > P
PM-P2	T > G	TTC > GTC	N > T
PM-P2^{-PM}	T > G	TTC > GTC	F > V
PM-A1	T > G	AAG > ACG	P > P
ER256	T > G	AAG > ACG	P > P
UB017	T > G	AAG > ACG	P > P

P, proline; N, asparagine; T, threonine; F, phenylalanine; V, valine.

Most of codon changes were AAG to ACG, with substitution of a lysine by a threonine. PM-P2 and PM-P2^{-PM} were the exception, with codon changes of TTC to GTC, which code for phenylalanine and valine, respectively (Supplementary Table 9). The prevalence of synonymous mutations that code for proline was observed in resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis and stepwise selection at the amastigote stage, in addition to the isolates and the M2269 strain. In PM-P2 and PM-P2^{-PM}, non-synonymous mutations, with changes of asparagine to threonine and phenylalanine to valine, respectively, were the most prevalent (Supplementary Table 9).

Finally, a predominance of SNPs, followed by deletions, insertions, MNPs with variations in two or more consecutive nucleotides, and mixed variants, a combination of all variants mentioned, were identified (Supplementary Table 10 and Supplementary Figure 9C). In addition, at least 58% of variants were missense, which codon changes occur after the variant change; followed by more than 24% of silent mutations, which codon remains the same after the variant change, and up to 1.1% of nonsense mutations (codon changed into a STOP codon) (Supplementary Table 11 and Supplementary Figure 9D).

Supplementary Table 10. Percentage and number of variants with high, moderate, low and modifier (variants that affect non-coding genes) impacts in coding sequences, intergenic, upstream, and downstream regions of the genomes of the M2269 strain, PM-resistant lines, and isolates.

	SNPs	MNPs	Insertion	Deletion	Mixed	Total number of variants
M2269	89.00% (92,168)	2.40% (2,484)	2.82% (2,919)	5.46% (5,654)	0.31% (327)	103,552
PM-M2	90.44% (107,851)	2.05% (2,453)	2.44% (2,911)	4.79% (5,714)	0.26% (314)	119,243
PM-M5	89.50% (96,661)	2.28% (2,463)	2.69% (2,912)	5.23% (5,656)	0.28% (310)	108,002
PM-M8	89.87% (98,913)	2.19% (2,412)	2.61% (2,878)	5.10% (5,621)	0.29% (329)	110,053
PM-M9	88.86% (91,508)	2.45% (2,522)	2.83% (2,921)	5.52% (5,684)	0.33% (342)	102,977
PM-M10	88.95% (90,804)	2.40% (2,446)	2.83% (2,895)	5.49% (5,607)	0.31% (324)	102,076
PM-P1	88.78% (87,486)	2.26% (2,226)	2.91% (2,871)	5.74% (5,658)	0.30% (300)	98,541
PM-P2	88.89% (89,236)	2.30% (2,311)	2.89% (2,902)	5.60% (5,627)	0.30% (309)	100,385
PM-P2^{-PM}	89.78% (100,029)	2.23% (2,492)	2.64% (2,944)	5.04% (5,616)	0.29% (328)	111,409
PM-A1	85.03% (68,821)	3.41% (2,759)	3.89% (3,152)	7.22% (5,847)	0.44% (357)	80,936
ER256	85.46% (137,927)	2.21% (3,570)	5.63% (9,101)	5.64% (9,108)	1.04% (1,681)	161,387
UB017	84.80% (131,393)	2.30% (3,569)	5.90% (9,144)	5.90% (9,145)	1.09% (1,691)	154,942

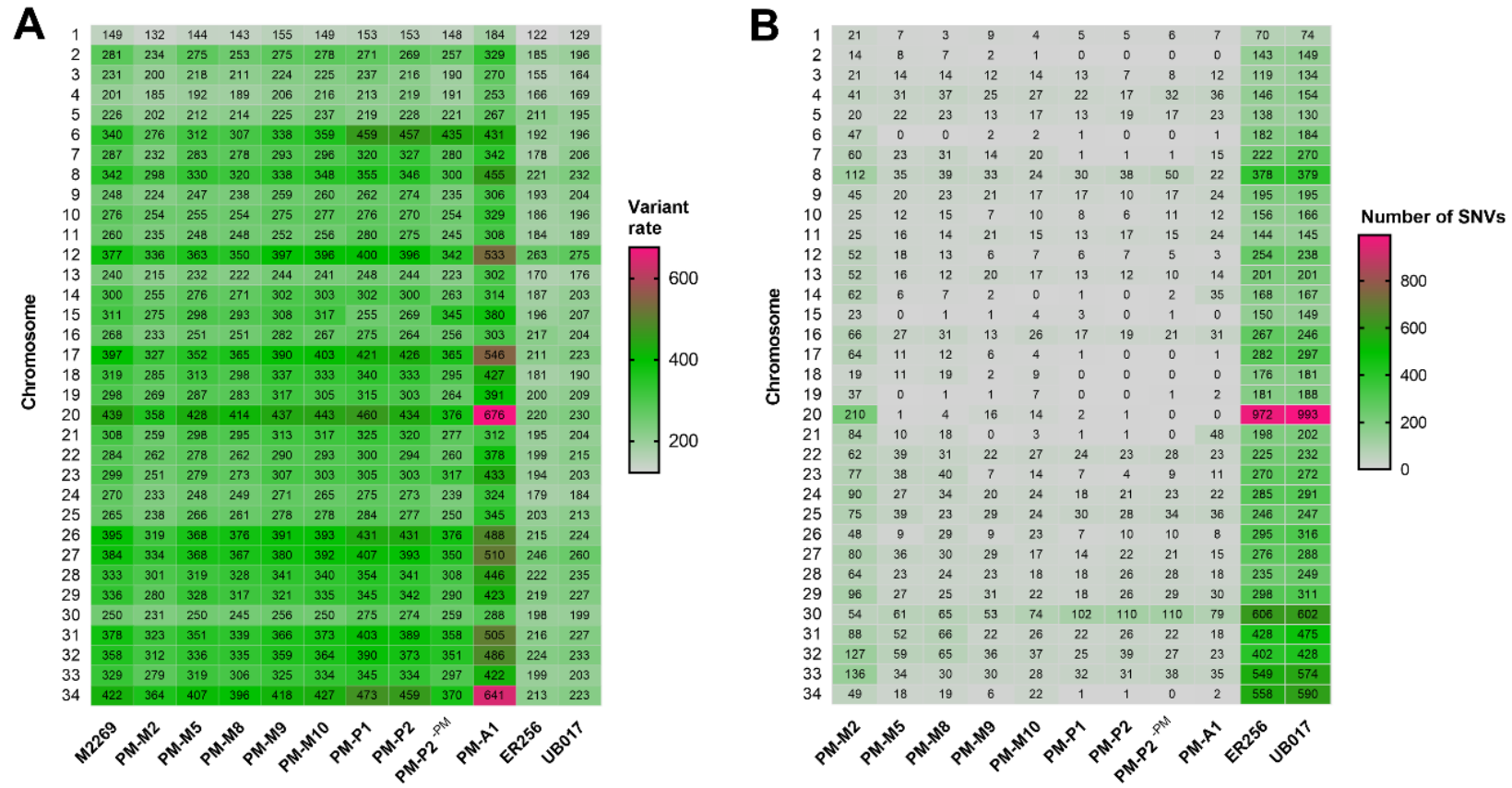
Mixed: variants that have a combination of SNPs, MNPs, insertions or deletions.

Supplementary Table 11. Summary of variants in the genome of the M2269 strain, PM-resistant lines, and clinical isolates.

	Variant rate (bp)	High impact	Moderate impact	Low impact	Modifier impact	Missense variant	Nonsense variant	Silent variant	Missense/Silent ratio	Het/Hom count	Transition/Transversion ratio
M2269	1:319	0.07% (310)	2.54% (10,759)	0.98% (4,159)	96.39% (407,163)	71.66% (10,678)	0.90% (134)	27.43% (4,088)	2.61	19,606/1,605	1.87 (9,046/4,835)
PM-M2	1:277	0.08% (415)	3.05% (14,779)	1.23% (5,947)	95.63% (462,664)	70.66% (14,694)	1.15% (239)	28.19% (5,862)	2.50	27,606/1,614	3.44 (16,927/4,918)
PM-M5	1:306	0.07% (316)	2.69% (11,831)	1.07% (4,710)	96.16% (422,706)	70.99% (11,712)	0.88% (146)	28.12% (4,639)	2.52	20,865/1,614	2.13 (10,306/4,835)
PM-M8	1:300	0.06% (300)	2.77% (12,384)	1.09% (4,865)	96.07% (429,516)	71.33% (12,274)	0.85% (146)	27.82% (4,787)	2.56	21,141/1,618	2.21 (10,625/4,809)
PM-M9	1:321	0.08% (335)	2.61% (10,942)	1.09% (4,598)	96.21% (403,283)	69.76% (10,828)	1.03% (161)	29.20% (4,532)	2.39	20,875/1,624	2.14 (10,308/4,804)
PM-M10	1:323	0.07% (287)	2.54% (10,579)	1.03% (4,285)	96.36% (401,259)	70.76% (10,483)	0.82% (122)	28.41% (4,210)	2.49	20,734/1,610	2.09 (10,110/4,830)
PM-P1	1:335	0.07% (293)	2.65% (10,706)	0.95% (3,839)	96.32% (388,321)	73.36% (10,642)	0.80% (117)	25.83% (3,748)	2.84	18,924/1,683	1.91 (8,763/4,571)
PM-P2	1:329	0.07% (308)	2.67% (10,997)	0.94% (3,884)	96.30% (395,397)	73.58% (10,946)	0.80% (119)	25.62% (3,811)	2.87	18,913/1,674	1.92 (8,757/4,554)
PM-P2^{-PM}	1:296	0.06% (290)	2.74% (12,441)	0.89% (4,048)	96.3% (436,403)	75.35% (12,397)	0.61% (100)	24.04% (3,955)	3.13	19,100/1,679	1.87 (8,731/4,652)
PM-A1	1:408	0.08% (284)	2.20% (7,365)	1.06% (3,547)	96.65% (322,905)	66.79% (7,237)	1.04% (113)	32.16% (3,485)	2.07	20,666/1,638	1.96 (9,574/4,862)
ER256	1:204	0.05% (343)	3.20% (20,749)	2.22% (13,649)	94.63% (612,098)	59.64% (20,143)	0.37% (125)	39.99% (13,507)	1.49	12,784/68,384	2.65 (81,817/30,841)
UB017	1:213	0.05% (344)	3.16% (19,634)	2.17% (13,461)	96.61% (586,985)	58.57% (19,014)	0.42% (137)	41.00% (13,312)	1.42	12,781/68,445	2.65 (81,914/30,890)

Het, heterozygous; Hom, homozygous; bp, base pair.

An average of one variant for each 300 bp per genome sequence was detected in all genomes (Supplementary Table 11 and Supplementary Figure 10A). The variants were classified into four categories: modifier, moderate, low and high impacts. Modifier impact variants do not impact coding regions, while moderate and high impact variants can lead to non-synonymous and missense/nonsense mutations. Low impact variants lead to synonymous mutations. Among all genomes, more than 94% of the variants found had a modifier impact and at least 2% of variants had a moderate impact, followed by more than 0.9% of low impact variants and less than 0.1% of high impact variants (Supplementary Table 11). The isolates presented a higher number of homozygous variants, while PM-resistant lines and M2269 presented a higher number of heterozygous variants (Supplementary Table 11). The transition/transversion ratio for all genomes was of approximately 2, with the exception of PM-M2, whose ratio value was higher than 3 (Supplementary Table 11).



Supplementary Figure 10. Variant rate and number of SNVs in chromosomes of *L. amazonensis* M2269 strain, PM-resistant lines, and isolates. (A) Variant rate in each chromosome of the M2269 strain, resistant lines and isolates indicated. (B) Number of SNVs in coding regions of each chromosome of resistant lines and isolates indicated.

Among PM-resistant lines, an average of 800 SNVs was observed within coding regions, with an average of 15 InDels and 769 SNPs (Supplementary Table 12 and Supplementary Figure 10B). PM-M2 had the highest number of variants compared with the other lines that were also selected by chemical mutagenesis (Supplementary Table 12). In contrast, the isolates ER256 and UB017 presented an average of 9,500 SNVs in coding regions, with an average of 126 InDels and 9,438 SNPs (Supplementary Table 12). The total number of SNVs (SNPs and InDels) in coding regions are listed according to biological function and are indicated in the Figure 6. The number of variants/mutations located in hypothetical proteins and other biological processes of the parasite is also listed in the Figure 6.

Supplementary Table 12. Number of SNVs (SNPs and InDels) identified in PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 and PM-M10) and stepwise selection at promastigote (PM-P1, PM-P2 and PM-P2^{-PM}) and amastigote stages (PM-A1) of *L. amazonensis* and isolates of the same species (ER256 and UB017).

Resistant line or isolate	SNPs	InDels	SNVs
PM-M2	2,130	16	2,146
PM-M5	734	16	750
PM-M8	793	12	805
PM-M9	532	11	543
PM-M10	587	11	598
PM-P1	464	21	485
PM-P2	509	18	527
PM-P2 ^{-PM}	562	14	576
PM-A1	616	18	630
ER256	9,295	120	9,415
UB017	9,582	135	9,717

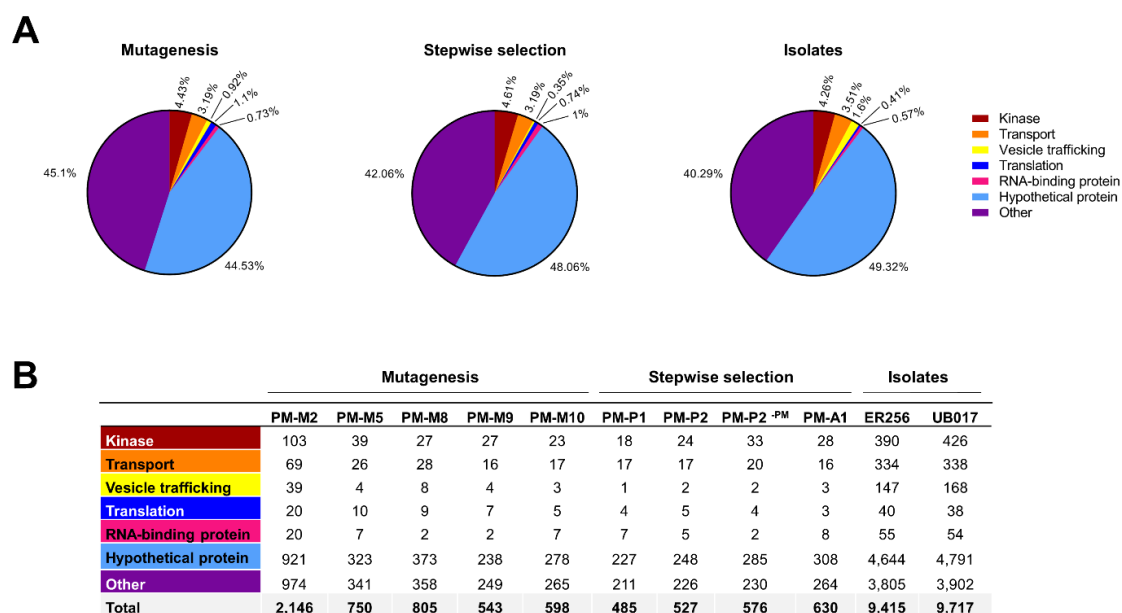


Figure 6. Distribution in percentage (A) and total number of SNVs (B) (SNPs and InDels) in genes according to the biological function in PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 and PM-M10), by stepwise selection at promastigote (PM-P1, PM-P2 and PM-P2^{PM}) and amastigote (PM-A1) stages and of the ER256 and UB017 isolates of *L. amazonensis*.

3.5 *In silico* filtering of genes associated to PM resistance and susceptibility

Considering the high number of SNVs in resistant lines and clinical isolates, only moderate and high impact variations were considered. Initially, the search for SNVs was restricted to genes that coded for proteins involved in translation and protein synthesis, as well as in genes related to the metabolic pathways involved in the metabolism of PM and other AGs, using the search method available in TriTrypDB for gene function. After the initial filtering, 240 genes possibly related to PM were selected and the presence of SNVs and/or copy number variation (CNV) in these genes were analysed among the PM-resistant lines and clinical isolates. From this initial analysis, 14 genes were selected and their respective variants were confirmed by Sanger sequencing (Table 3).

Among these SNPs/mutations, we found in isolates ER256 and UB017 non-synonymous variants in genes involved in lipid metabolism, intracellular protein transport, translation, protein phosphorylation, and post-transcriptional regulation of gene

expression (Table 3). In PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis, mutations in genes involved in arginine biosynthetic process, translation, protein dephosphorylation and RNA methylation were found, while PM-resistant lines selected by stepwise selection presented mutations in genes involved in metabolic process of mannogen and protein phosphorylation (Table 3). Additionally, in PM-resistant lines, heterozygous mutations in the gene that codes CDPK1 were found in two PM-resistant lines (PM-M5 and PM-M8) (Table 3). CDPK1 is a protein kinase previously involved in PM resistance in *L. infantum* (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019).

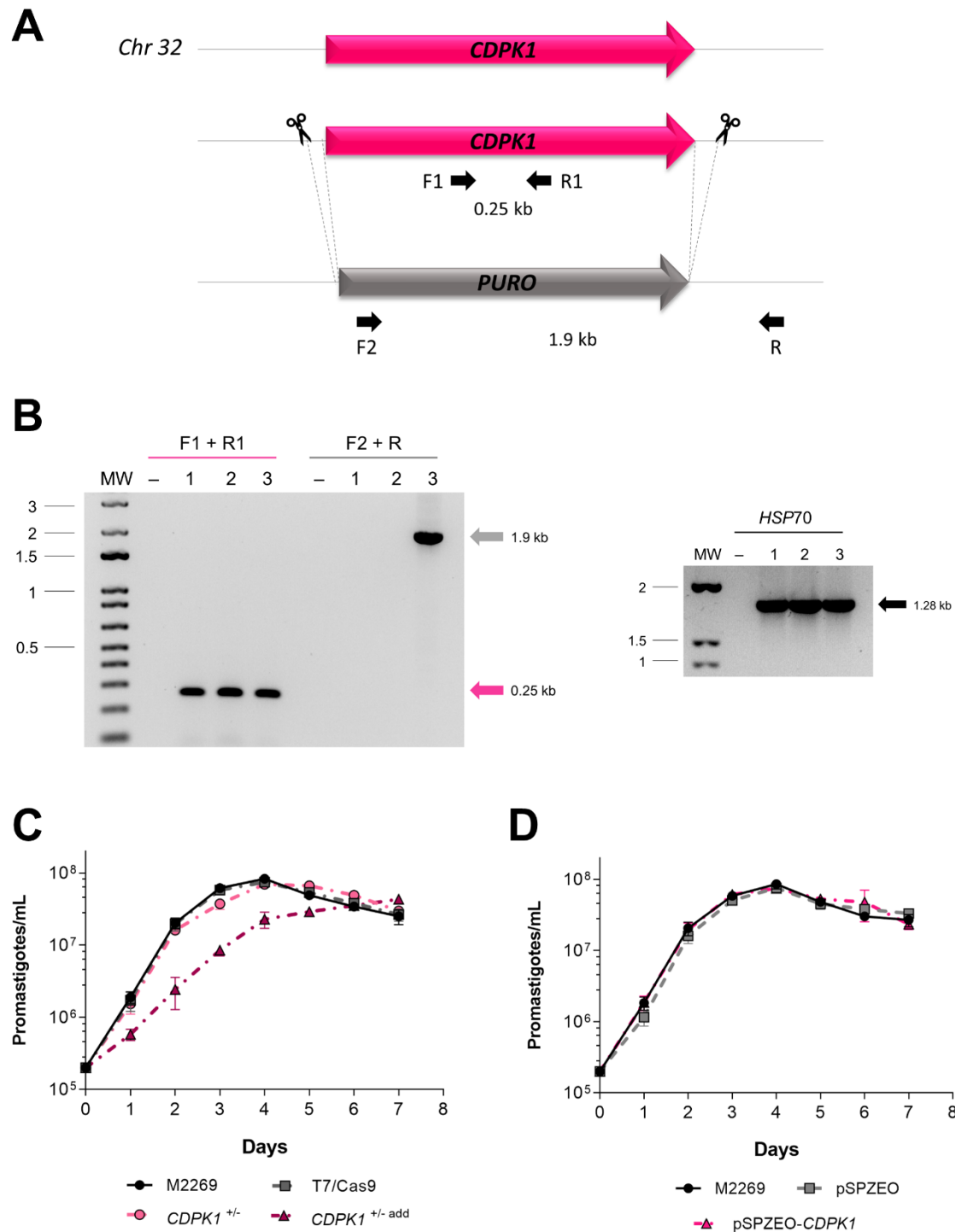
Table 3. Nucleotide polymorphisms found in potential genes associated with PM susceptibility and resistance in isolates (ER256 and UB017) and in PM-resistant lines of *L. amazonensis* selected by *in vitro* mutagenesis (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 and PM-M10) and stepwise selection in promastigote (PM-P1, PM-P2 and PM-P2^{-PM}) and amastigote (PM-A1) stages of the parasite.

Gene ID	Gene	Isolate/Resistant line	Mutation	Type ¹
LAMA_050007600	Protein tyrosine phosphatase (PTP)	ER256	L123I S125N	M/M M/M
		UB017	L123I S125N	M/M M/M
LAMA_070007900	Acetylornithine deacetylase-like protein	PM-M2	P122S V124M	+/M +/M
		PM-M10	P208S	+/M
LAMA_080010700	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	ER256	G66E R369C	+/M M/M
		UB017	G66E R369C	+/M M/M
LAMA_100021400	Protein of unknown function (DUF1861)	PM-A1	L198F	+/M
LAMA_160006700	50S ribosomal protein L17	ER256	R6Q	+/M
		UB017	R6Q	+/M
LAMA_200055200	Elongation factor-2 kinase-like protein	UB017	P338A	M/M
		PM-M2	A297V	+/M
LAMA_230008500	Tryptophanyl-tRNA synthetase	ER256	A31V	M/M
		UB017	A31V	M/M
LAMA_230011000	Ribosomal RNA methyltransferase-like protein (rMETTL)	PM-M2	A109V	+/M
		PM-M8	G68E A135T	+/M +/M
LAMA_250019300	Protein transport protein Sec24C	ER256	P629Q F672L	+/M +/M
		UB017	P629Q F672L	+/M +/M
LAMA_260014700	Protein kinase	PM-P1	E1237B	+/M
		PM-P2	E1237B	+/M
		PM-P2 ^{-PM}	E1237B	+/M
LAMA_270029300	Dual specificity protein phosphatase	PM-M5	H269V	M/M
		PM-M8	E97K	+/M
LAMA_310018900	Polypeptide deformylase-like protein (PDF)	ER256	V22L L212S A260V	M/M M/M M/M
			V22L	M/M
		UB017	L212S A260V	M/M M/M
LAMA_310047200	GIPL galf transferase	ER256	E98K A402S K576R	M/M M/M M/M
			E98K	M/M
		UB017	A402S K576R	M/M M/M
LAMA_320027400	Calcium-dependent protein kinase 1 (CDPK1)	PM-M5	S177F	+/M
		PM-M8	R133H	+/M

¹ M/M., homozygous mutation; +/M, heterozygous mutation, which + corresponds to wild-type and M to mutation

3.6 Functional validation of genes related to PM resistance and susceptibility in *L. amazonensis*

We first evaluated the role of *CDPK1* gene in PM resistance in *L. amazonensis*, considering that mutations were found in two PM-resistant lines selected by chemical mutagenesis (PM-M5 and PM-M8) (Table 3). A partial knockout for this gene was generated (*CDPK1*^{+/−}) (Supplementary Figure 11A-B). The inactivation of only one of the alleles indicated the essentiality of this gene in this species, as previously described in *L. infantum* (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Promastigote proliferation was unaltered in the *CDPK1*^{+/−} and overexpressing (pSPZEO-*CDPK1*) lines, as well as the number of infected macrophages and amastigotes per infected macrophage in the *CDPK1*^{+/−} line (Table 4 and Supplementary Figure 11C-D). *In vitro* susceptibility assays to PM indicated that *CDPK1*^{+/−} line had an EC₅₀ value 2-fold higher in both stages of the parasite when compared with the parental line (T7/Cas9) (Table 4). An add-back line for this gene (*CDPK1*^{+/− add}) reverted the resistance phenotype, despite a discrete late in the proliferation profile at the promastigote stage (Table 4 and Supplementary Figure 11C). Overexpression of the *CDPK1* gene in the M2269 strain (pSPZEO-*CDPK1*) led to higher infectivity (Table 4). The *in vitro* susceptibility of promastigotes and intracellular amastigotes to PM showed that this overexpressing line was more susceptible, with a significant reduction in the EC₅₀ values, compared with the EC₅₀ values of the parental strain (Table 4). Taken together, these results confirmed the role of the *CDPK1* gene in PM resistance in *L. amazonensis*. In addition to CDPK1 protein, L23a is a ribosomal protein involved in translation and it is phosphorylated by CDPK1. Mutations or inactivation of one of the alleles of the *CDPK1* gene was described to decrease phosphorylation levels of L23a in selected resistant mutants (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Additionally, this protein was correlated with PM resistance when overexpressed in *L. donovani* antimony-resistant isolates (Das, Shah et al. 2013).



Supplementary Figure 11. Inactivation of *CDPK1* gene in *L. amazonensis* and promastigote growth profile characterization of single knockout and overexpressing lines for *CDPK1* gene of *L. amazonensis*. (A) Schematic representation of *CDPK1* locus in the M2269 strain and parental line transfected with pT007 plasmid and in the single knockout line (*CDPK1*^{+/-}). (B) Diagnostic PCR to map the inactivation of *CDPK1* gene by CRISPR/Cas9 in *L. amazonensis* transfected with pT007 plasmid (Beneke, Madden et al. 2017). Primers used and the size of the expected fragments are indicated (A and B). As a

control, for all genomic DNA samples, a PCR protocol that amplifies a 1.28 kb product of the *HSP70* gene was also performed as previously described (Montalvo, Fraga et al. 2012). Legend: MW, molecular weight 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); (-), PCR in absence of *L. amazonensis* genomic DNA; 1, M2269 strain; 2, M2269 strain transfected with the pT007 plasmid (T7/Cas9); 3, *CDPK1*^{+/-} line. (C) Promastigote growth profile of the M2269 strain, T7/Cas9, *CDPK1*^{+/-} and *CDPK1*^{+/- add} lines. (D) Promastigote growth profile of the M2269 strain, and transgenic lines transfected with pSPZEO or pSPZEO-*CDPK1*.

Table 4. *In vitro* activity of PM against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. amazonensis* M2269 transgenic lines for *CDPK1*, *L23a*, *PTP*, *PDF* and *rMETTL* genes.

Wild-type and transgenic lines	Promastigote			Amastigote				
	EC ₅₀ ± SD ¹ (RI) ²	p ³	EC ₅₀ ± SD ¹ (RI) ²	p ³	Infection (%) ⁴	p ³	Amastigote/Mφ ⁵	p ³
M2269	177.76 ± 12.34	-	57.96 ± 4.16	-	69	-	6.14	-
Knockout								
T7/Cas9	198.23 ± 15.6	-	66.07 ± 2.32	-	68	-	6.25	-
<i>CDPK1</i> ^{+/−}	397.86 ± 7.71 (2.00)	***	145.62 ± 8.32 (2.20)	***	70	ns	6.14	ns
<i>CDPK1</i> ^{+/−} add	178.83 ± 17.97 (0.90)	ns	59.09 ± 5.79 (0.89)	ns	51	*	4.72	ns
<i>L23a</i> ^{+/−}	327 ± 4.73 (1.65)	***	77.61 ± 3.65 (1.17)	ns	65	ns	5.75	ns
<i>L23a</i> ^{−/−}	457.4 ± 10.08 (2.3)	***	144.33 ± 14.87 (2.18)	***	66	ns	5.69	ns
<i>L23a</i> ^{−/−} add	178.83 ± 17.97 (0.9)	ns	59.09 ± 5.79 (0.89)	ns	64	ns	4.35	*
<i>PTP</i> ^{+/−}	238.15 ± 13.67 (1.2)	ns	302.46 ± 24.83 (4.57)	***	47	**	5.51	ns
<i>PTP</i> ^{+/−} add	200.53 ± 9.97 (1.01)	ns	77.93 ± 10.63 (1.18)	ns	63	ns	5.94	ns
<i>PDF</i> ^{+/−}	159.06 ± 12.57 (0.80)	ns	>500 (>7.56)	***	69	ns	6.10	ns
<i>PDF</i> ^{−/−} add	124.7 ± 14.02 (0.63)	**	55.71 ± 4.17 (0.84)	ns	61	ns	5.20	ns
<i>rMETTL</i> ^{−/−}	516.4 ± 23.05 (2.60)	***	>500 (>7.56)	***	76	ns	6.38	ns
<i>rMETTL</i> ^{−/−} add	225.9 ± 18.19 (1.14)	ns	59.75 ± 9.77 (0.90)	ns	63	ns	4.87	ns
Overexpressing lines								
pSPZEO	207.93 ± 9.31	-	65.13 ± 2.34	-	68	-	4.93	-
pSPZEO- <i>CDPK1</i>	116.6 ± 1.56 (0.56)	***	37.5 ± 4.08 (0.57)	***	85	***	6.48	ns
pSPZEO- <i>L23a</i>	160.73 ± 13.95 (0.77)	**	46.34 ± 4.5 (0.71)	*	67	ns	5.37	ns
pSPZEO- <i>PTP</i>	87.62 ± 8.5 (0.42)	***	16.25 ± 3.98 (0.25)	***	64	ns	6.75	ns
pSPZEO- <i>PDF</i>	82.38 ± 6.86 (0.39)	***	18.81 ± 2.84 (0.29)	***	72	ns	5.64	ns
pSPZEO- <i>rMETTL</i>	137.86 ± 5.96 (0.66)	***	3.38 ± 0.86 (0.05)	***	69	ns	5.95	ns

¹ Mean of EC₅₀ value ± standard deviation of at least three independent experiments for each transgenic line in μM;

² Resistance index (RI), ratio between the EC₅₀ value of each transgenic line and the EC₅₀ value of the respective parental line (*L. amazonensis* transfected with pT007 plasmid and epissomally expressing T7/Cas9 or transfected with pSPZEO plasmid).

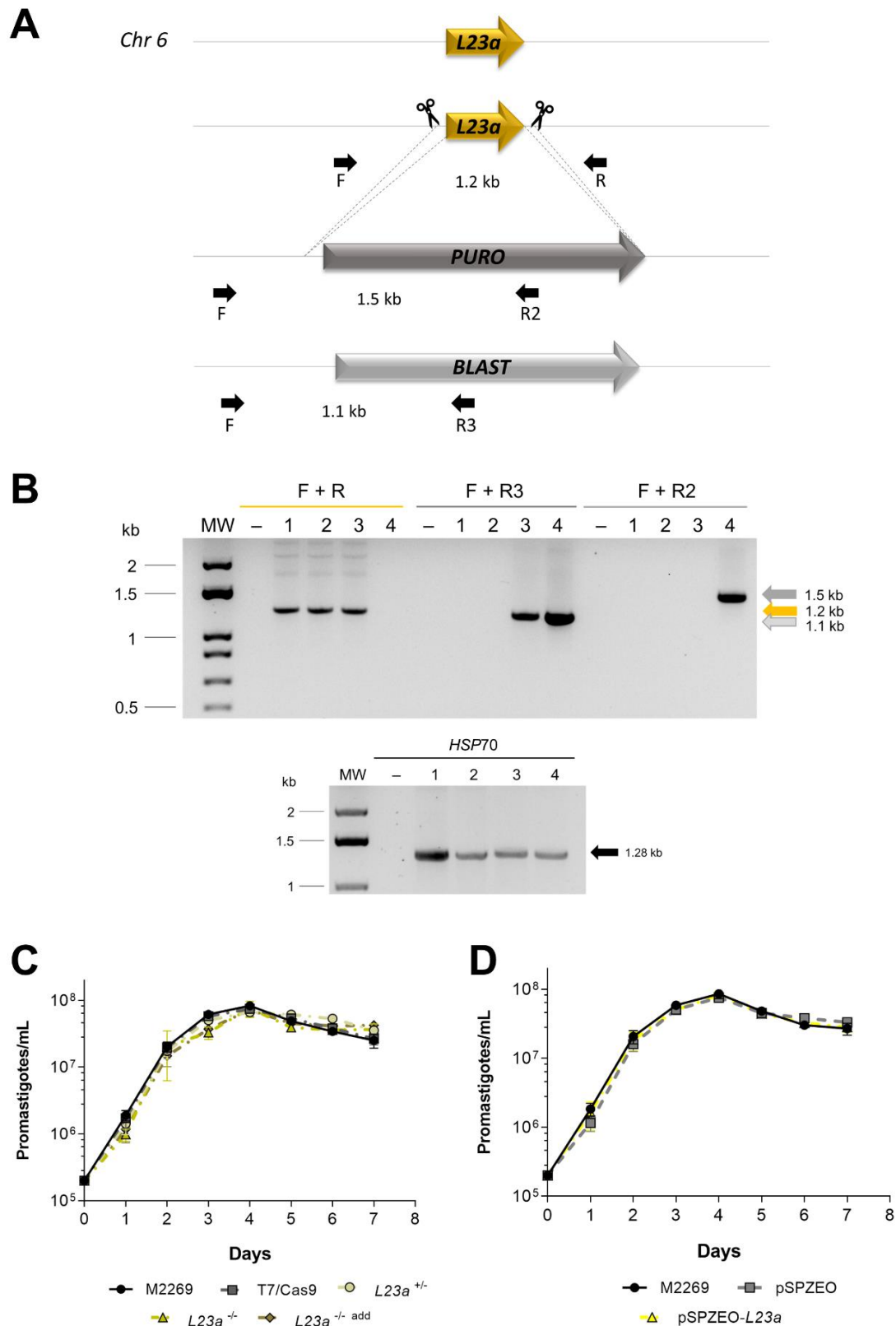
³ * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 and *** *p* < 0.001 compared with M2269 strain using the “One way ANOVA” test with Tukey post-test in GraphPad Prism software 8.

⁴ Percentage of infected BMDMs.

⁵ Mean of the number of amastigotes per infected macrophage.

ns: no significant.

Considering the role of these proteins in PM resistance has not yet been explored in *L. amazonensis*, both partial and null knockout for the *L23a* gene (*L23a*^{+/−} and *L23a*^{−/−}, respectively) were obtained and validated by a diagnostic PCR (Supplementary Figure 12A and 12B). Inactivation or overexpression of the *L23a* gene did not affect growth in promastigotes and the infectivity capacity of BMDMs when compared with the respective parental lines (Table 4 and Supplementary Figure 12C and 12D). The EC₅₀ values for the knockout lines *L23a*^{+/−} and *L23a*^{−/−} were 1.65 and 2.3-fold higher than the parental line (T7/Cas9) at the promastigote stage; and 1.17 and 2.18-fold higher at the amastigote stage, respectively (Table 4). The addback line (*L23a*^{−/− add}) restored the EC₅₀ values to the parental line ones (T7/Cas9) in both stages of the parasite (Table 4). Finally, the overexpression of the *L23a* gene (pSPZEO-*L23a*) led to an increase in PM susceptibility compared with the parental line transfected with the empty vector pSPZEO (Table 4), confirming the role of L23a protein in PM resistance in *L. amazonensis*.

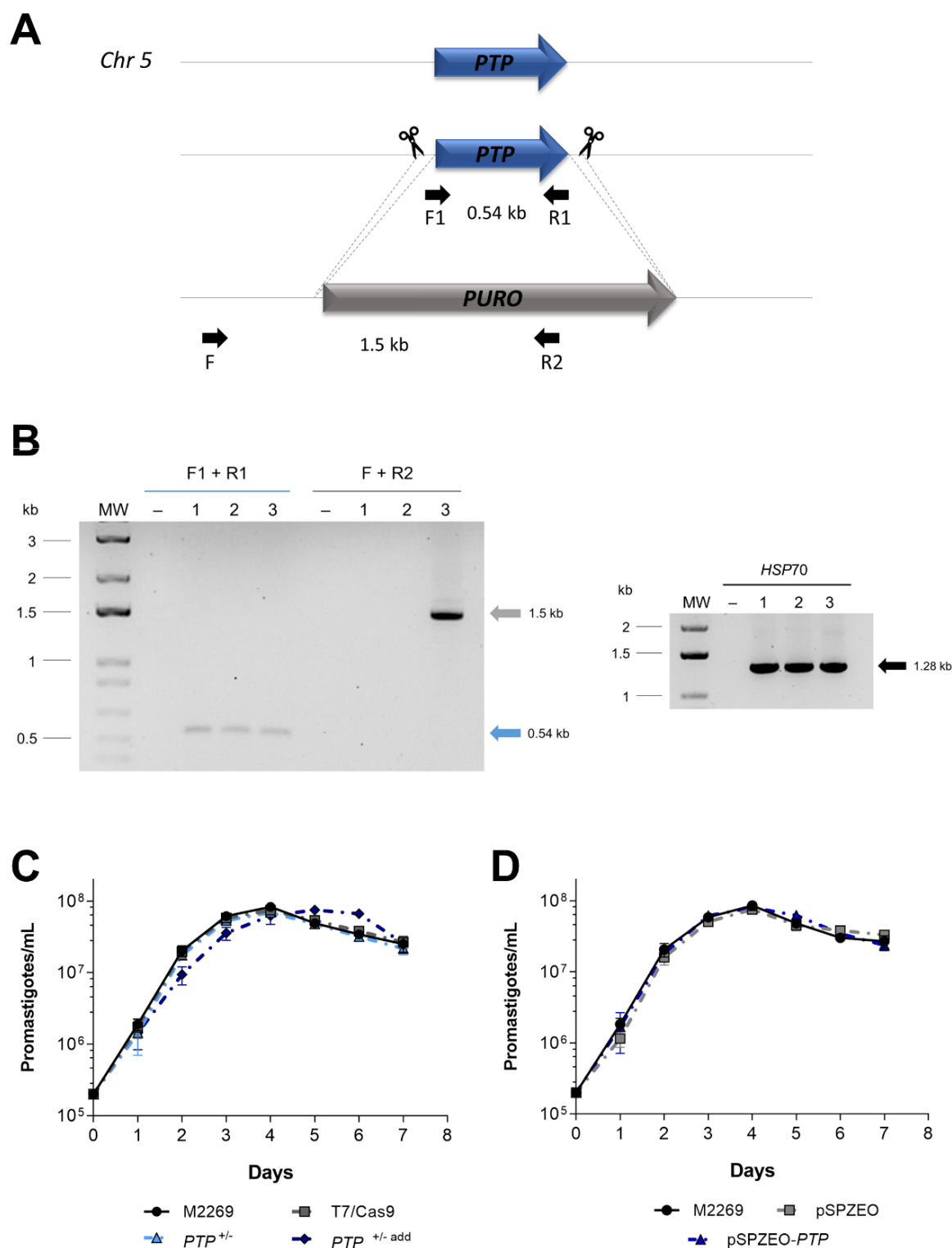


Supplementary Figure 12. Inactivation of *L23a* gene in *L. amazonensis* and promastigote growth profile characterization of single and double knockout and overexpressing lines for *L23a* gene of *L. amazonensis*. (A) Schematic representation of *L23a* locus in the M2269 strain and parental line transfected with pT007 plasmid and in

the single ($L23a^{+/-}$) and double knockout lines ($L23a^{-/-}$). (B) Diagnostic PCR to map the inactivation of $L23a$ gene by CRISPR/Cas9 in *L. amazonensis* transfected with pT007 plasmid (Beneke, Madden et al. 2017). As a control, for all genomic DNA samples, a PCR protocol that amplifies a 1.28 kb product of the $HSP70$ gene was also performed as previously described (Montalvo, Fraga et al. 2012). Primers used and the size of expected fragments are indicated (A and B). Legend: MW, molecular weight 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); (-), PCR in absence of *L. amazonensis* genomic DNA; 1, M2269 strain; 2, T7/Cas9 transgenic line; 3, $L23a^{+/-}$ line; 4, $L23a^{-/-}$ line. (C) Promastigote growth profile of the M2269 strain, T7/Cas9, $L23a^{+/-}$, $L23a^{-/-}$ and $L23a^{-/-add}$ lines. (D) Promastigote growth profile of the M2269 strain, and transgenic lines transfected with pSPZEO or pSPZEO- $L23a$.

Among the 14 candidate genes identified in *in silico* analyses (Table 3), two of them that presented homozygous mutations in isolates and one with heterozygous mutations in PM-resistant lines, were functionally validated: protein tyrosine phosphatase (PTP) and polypeptide deformylase-like protein (PDF) identified in the highly susceptible clinical isolates; and a ribosomal RNA methyltransferase-like protein ($rMETTL$) identified in PM-resistant lines selected by chemical mutagenesis. These genes are involved in lipid metabolism and translation, respectively.

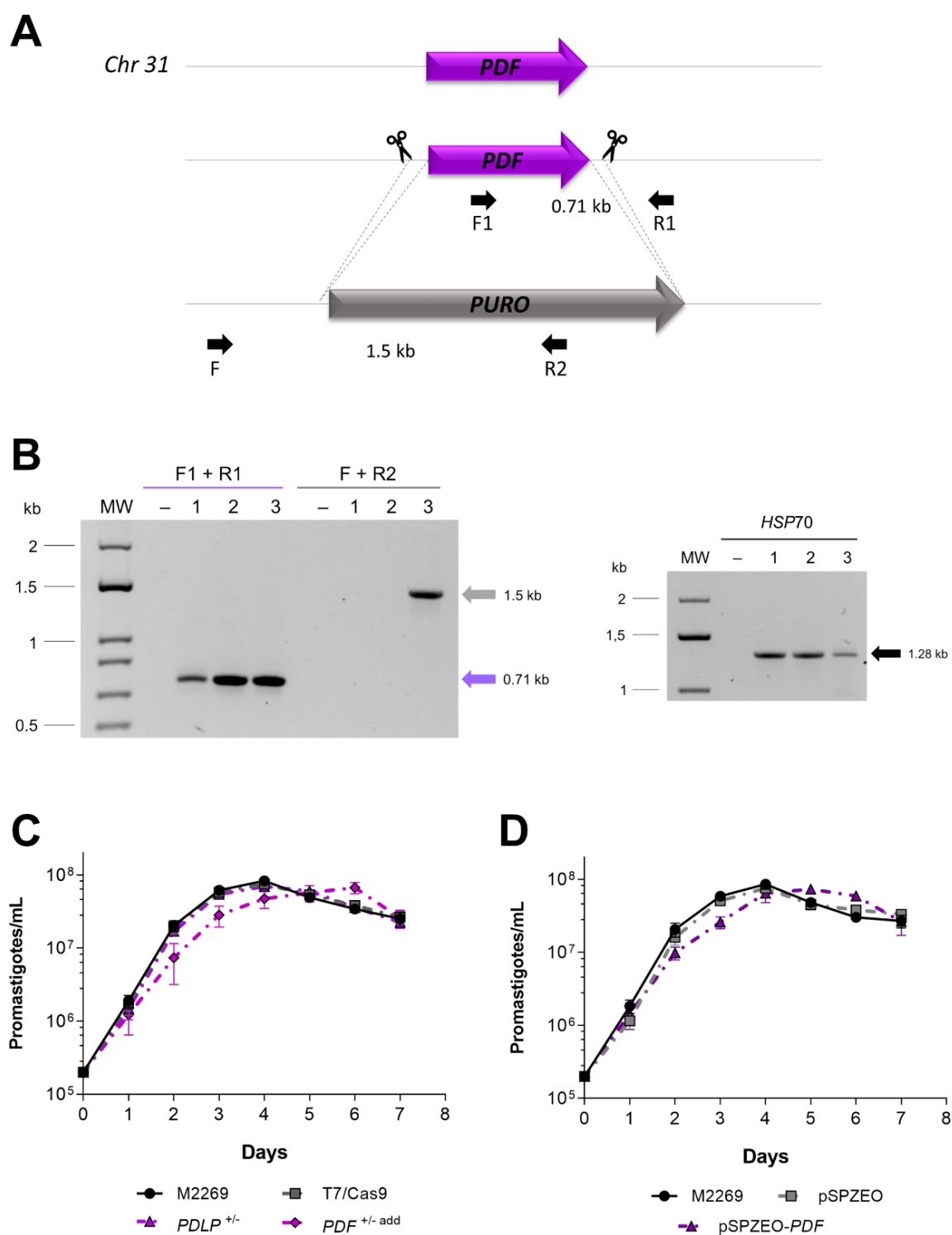
To investigate the role of PTP gene in PM resistance, a partial knockout ($PTP^{+/-}$) was generated and confirmed by diagnostic PCR (Supplementary Figure 13A-B). Null knockout mutants could not be obtained even after several attempts to inactivate the second allele of this gene. Despite the probable essentiality of PTP gene, the partial knockout line ($PTP^{+/-}$) and the add-back line ($PTP^{+/-add}$) did not interfere within the cell proliferation, even as the overexpressing line for this gene (pSPZEO- PTP) (Supplementary Figure 13C and 13D). The inactivation of one of the alleles of PTP gene did not affect PM susceptibility, since no significant variation in the EC_{50} value at the promastigote stage was found (Table 4). In intracellular amastigotes, however, the EC_{50} value was 4.57-fold higher than the parental line (T7/Cas9), and a reduction of 31% in infection rate was also noted (Table 4). In addition, parasites overexpressing PTP gene were more susceptible to PM in both stages of the parasite (Table 4), indicating the role of PTP in PM susceptibility in *L. amazonensis*.



Supplementary Figure 13. Inactivation of *PTP* gene in *L. amazonensis* and promastigote growth profile characterization of single knockout and overexpressing lines for *PTP* gene of *L. amazonensis*. (A) Schematic representation of *PTP* locus in the M2269 strain and parental line transfected with pT007 plasmid and in the single knockout line (*PTP*^{+/-}). (B) Diagnostic PCR to map the inactivation of *PTP* gene by CRISPR/Cas9 in *L.*

amazonensis transfected with pT007 plasmid (Beneke, Madden et al. 2017). Primers used and the size of the expected fragments are indicated (A and B). As a control, for all genomic DNA samples, a PCR protocol that amplifies a 1.28 kb product of the *HSP70* gene was also performed as previously described (Montalvo, Fraga et al. 2012). Legend: MW, molecular weight 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); (-), PCR in absence of *L. amazonensis* genomic DNA; 1, M2269 strain; 2, T7/Cas9 transgenic line; 3, *PTP*^{+/-} line. (C) Promastigote growth profile of the M2269 strain, T7/Cas9, *PTP*^{+/-} and *PTP*^{+/- add} lines. (D) Promastigote growth profile of the M2269 strain, and transgenic lines transfected with pSPZEO or pSPZEO-*PTP*.

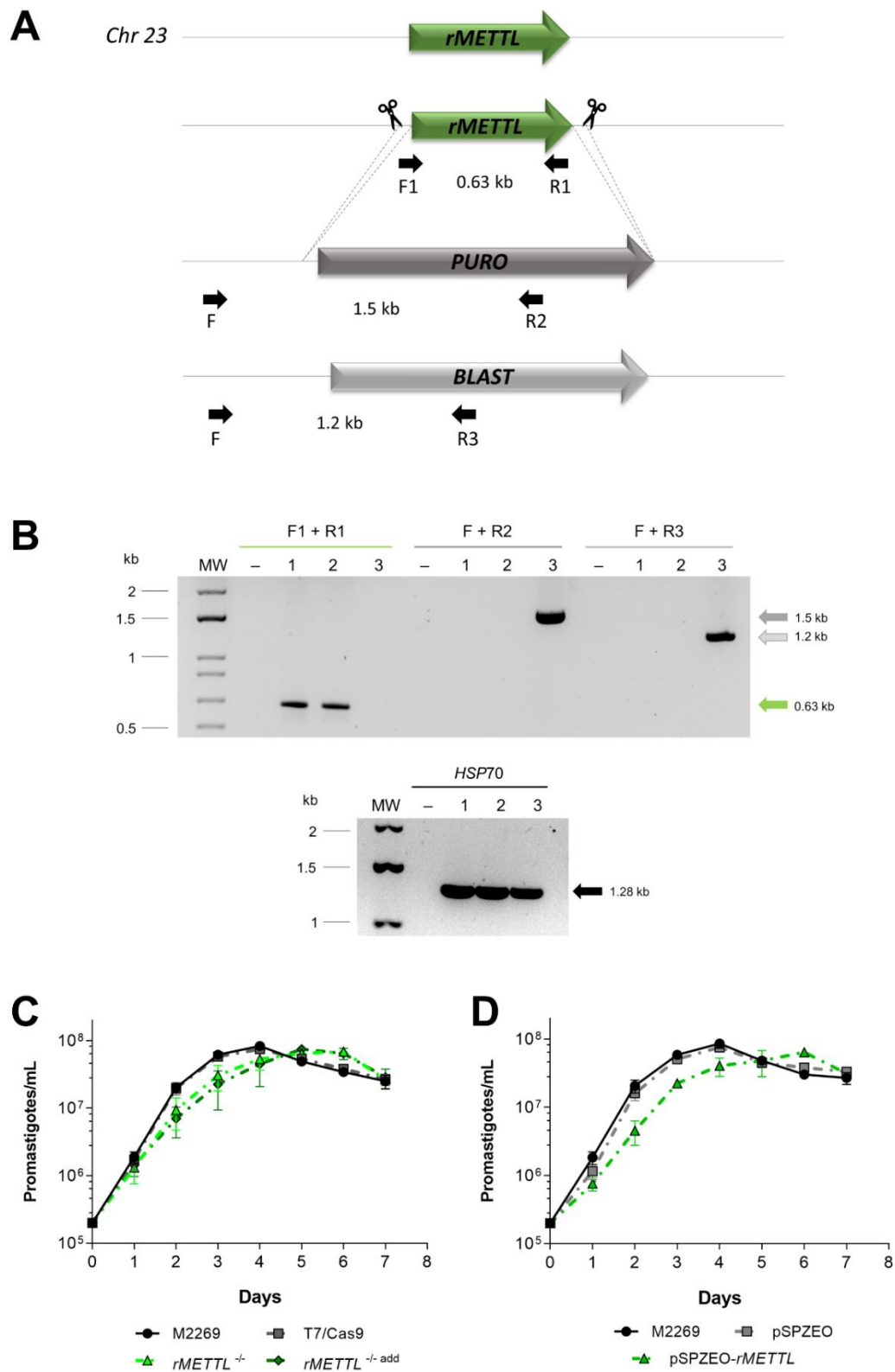
The *PDF* gene encodes a peptide deformylase, with hydrolase activity involved in translation and post-transcriptional regulation. A partial knockout line (*PDF*^{+/-}) for *PDF* was generated (Supplementary Figure 14A-B). Three independent experiments were carried out to inactivate the second allele of *PDF* gene to obtain a null mutant, but they were all unsuccessfully. The *PDF*^{+/-} and *PDF*^{+/- add} lines showed no impact on parasite growth as promastigotes and a similar profile compared with the parental strain was found, which was also true when this gene was overexpressed (pSPZEO-*PDF*) (Supplementary Figure 14C and 14D). Inactivation and overexpression of *PDF* gene did not interfere in the BMDMs infection capacity (Table 4). The *in vitro* susceptibility assays showed that the EC₅₀ values of *PDF*^{+/-} line and parental line (T7/Cas9) were similar at the promastigote stage. However, at the amastigote stage, the *PDF*^{+/-} line was highly resistant to PM and its EC₅₀ value was more than 7-fold higher than the T7/Cas9 expressing line. The *PDF*^{+/- add} line restored the PM susceptibility phenotype and its EC₅₀ value was similar to the parental line (T7/Cas9) (Table 4). Overexpression of *PDF* gene (pSPZEO-*PDF*) sensitized parasites to PM in both stages when compared with parasites transfected with the empty vector (Table 4), indicating the role of PDF in PM susceptibility in *L. amazonensis*.



Supplementary Figure 14. Inactivation of *PDF* gene in *L. amazonensis* and promastigote growth profile characterization of single knockout and overexpressing lines for *PDF* gene of *L. amazonensis*. (A) Schematic representation of *PDF* locus in the M2269 strain and parental line transfected with pT007 plasmid and in the single knockout

line (*PDF*^{+/-}). (B) Diagnostic PCR to map the inactivation of *PDF* gene by CRISPR/Cas9 in *L. amazonensis* transfected with pT007 plasmid (Beneke, Madden et al. 2017). Primers used and the size of the expected fragments are indicated (A and B). As a control, for all genomic DNA samples, a PCR protocol that amplifies a 1.28 kb product of the *HSP70* gene was also performed as previously described (Montalvo, Fraga et al. 2012). Legend: MW, molecular weight 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); (-), PCR in absence of *L. amazonensis* genomic DNA; 1, M2269 strain; 2, T7/Cas9 transgenic line; 3, *PDF*^{+/-} line. (C) Promastigote growth profile of the M2269 strain, T7/Cas9, *PDF*^{+/-} and *PDF*^{+/-}^{add} lines. (D) Promastigote growth profile of the M2269 strain, and transgenic lines transfected with pSPZEO or pSPZEO-*PDF*.

The *rMETTL* gene is involved in rRNA modification of ribosomal subunits by RNA methylation. A null knockout mutant for this gene (*rMETTL*^{-/-}) (Supplementary Figure 15A-B), an add-back line (*rMETTL*^{-/-}^{add}), as well as an overexpressing line of this gene (pSPZEO-*rMETTL*) were generated. These lines had a slightly difference in parasite growth as promastigotes when compared with the M2269 strain and parental lines (T7/Cas9 and pSPZEO) at the logarithmic growth phase (Supplementary Figure 15C-D). *In vitro* PM susceptibility assays showed that the EC₅₀ values of *rMETTL*^{-/-} line were 2.6 and more than 7-fold higher than the parental line at the promastigote and amastigote stages, respectively (Table 4). The add-back line (*rMETTL*^{-/-}^{add}) had the resistance phenotype reverted in both stages of the parasite and the EC₅₀ values were similar, with no significant difference, when compared with the wild-type and parental strains (M2269 and T7/Cas9, respectively) (Table 4). Finally, the overexpressing line for this gene (pSPZEO-*rMETTL*) was more susceptible in both stages of the parasite compared with the transfected line with the empty vector; particularly at the amastigote stage, this line was highly susceptible to PM (Table 4), indicating the role of *rMETTL* in PM resistance in *L. amazonensis*.



Supplementary Figure 15. Inactivation of *rMETTL* gene in *L. amazonensis* and promastigote growth profile characterization of double knockout and overexpressing lines for *rMETTL* gene of *L. amazonensis*. (A) Schematic representation of *rMETTL* locus in the M2269 strain and parental line transfected with pT007 plasmid and in the double

knockout line (*rMETTL*^{-/-}). (B) Diagnostic PCR to map the inactivation of *rMETTL* gene by CRISPR/Cas9 in *L. amazonensis* transfected with pT007 plasmid (Beneke, Madden et al. 2017). Primers used and the size of the expected fragments are indicated (A and B). As a control, for all genomic DNA samples, a PCR protocol that amplifies a 1.28 kb product of the *HSP70* gene was also performed as previously described (Montalvo, Fraga et al. 2012). Legend: MW, molecular weight 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); (-), PCR in absence of *L. amazonensis* genomic DNA; 1, M2269 strain; 2, T7/Cas9 transgenic line; 3, *rMETTL*^{-/-} line. (C) Promastigote growth profile of the M2269 strain, T7/Cas9, *rMETTL*^{-/-} and *rMETTL*^{-/- add} lines. (D) Promastigote growth profile of the M2269 strain, and transgenic lines transfected with pSPZEO or pSPZEO-*rMETTL*.

3.7 Cross-resistance to antileishmanial drugs

To identify the possible cross-resistance to drugs used in chemotherapy for leishmaniasis, the *in vitro* susceptibility to antileishmanials (SbIII, AmB, PEN and MF) was evaluated in four PM-resistant lines (PM-M8, PM-M10, PM-P2 and PM-A1) and in knockout mutants for *PTP*, *PDF* and *rMETTL* genes. Two of five resistant lines generated by *in vitro* mutagenesis were selected: one mutant harbouring a mutation in *CDPK1* gene (PM-M8), and another mutant without mutations in this gene (PM-M10). We also evaluated the activity of antileishmanials against the PM-P2 and PM-A1 lines. At the promastigote stage, PM-M10 was more sensitive to SbIII and PEN, represented by 0.32- and 0.41-fold resistance, respectively, compared to the M2269 strain (Supplementary Table 13). These PM-resistant lines did not show any cross-resistance to AmB, and MF (Supplementary Table 13).

For the genes described and validated here, all knockout lines (*PTP*^{+/-}, *PDF*^{+/-} and *rMETTL*^{-/-}) were more susceptible to antimony, with EC₅₀ values 2-fold lower than the T7/Cas9 parental line (Supplementary Table 14). On the other hand, the EC₅₀ values of *PDF*^{+/-} and *rMETTL*^{-/-} lines for AmB were 1.82 and 1.87-fold higher than the parental line (Supplementary Table 14).

Supplementary Table 13. *In vitro* activity of antileishmanials against promastigotes of the M2269 strain and PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis (PM-M8 and PM-M10) and by stepwise selection at promastigote (PM-P2) and amastigote (PM-A1) stages.

Drugs	$EC_{50} \pm SD^1 (RI)^2$				
	M2269	PM-M8	PM-M10	PM-P2	PM-A1
SbIII ³	36.23 $\pm$ 4.02	45.03 $\pm$ 5.77 (1.2)	11.9 $\pm$ 2.64 (0.32)	60.92 $\pm$ 6.35 (1.68)	24.62 $\pm$ 2.15 (0.68)
AmB ⁴	34.4 $\pm$ 9.14	22.8 $\pm$ 5.15 (0.66)	27.14 $\pm$ 7.4 (0.78)	33.58 $\pm$ 6.3 (0.97)	32.74 $\pm$ 1.4 (0.95)
PEN ³	4.54 $\pm$ 0.86	7.95 $\pm$ 0.47 (1.75)	1.89 $\pm$ 0.34 (0.41)	7.03 $\pm$ 0.97 (1.54)	4.2 $\pm$ 0.97 (0.92)
MF ³	13.6 $\pm$ 3.76	8.65 $\pm$ 2.61 (0.63)	14.3 $\pm$ 5.5 (1.05)	6.5 $\pm$ 2.47 (0.47)	12.85 $\pm$ 3.5 (0.94)

¹ Mean of EC_{50} value $\pm$ standard deviation of at least three independent experiments for the M2269 strain or PM-resistant line;

² Resistance Index (RI), ratio between the EC_{50} value of the PM-resistant line and the EC_{50} value of the M2269 strain.

³ Concentration in μ M;

⁴ Concentration in nM;

Supplementary Table 14. *In vitro* activity of antileishmanials against promastigotes of the parental line transfected with pT007 (T7/Cas9) and knockout mutants for *PTP*, *PDF* and *rMETTL* genes.

Drugs	$EC_{50} \pm SD^1 (RI)^2$			
	T7/Cas9	<i>PTP</i> ^{+/−}	<i>PDF</i> ^{+/−}	<i>rMETTL</i> ^{−/−}
SbIII ³	31.78 $\pm$ 2.38	12.53 $\pm$ 3.12 (0.39)	15.19 $\pm$ 1.5 (0.47)	12.17 $\pm$ 1.91 (0.38)
AmB ⁴	64.46 $\pm$ 6.87	58.34 $\pm$ 5.27 (0.9)	117.8 $\pm$ 12.5 (1.82)	120.8 $\pm$ 6.95 (1.87)
PEN ³	3.27 $\pm$ 0.03	4.62 $\pm$ 0.45 (1.41)	4.40 $\pm$ 0.85 (1.34)	3.19 $\pm$ 0.45 (0.97)
MF ³	31.16 $\pm$ 3.37	31.6 $\pm$ 4.3 (1.01)	29.03 $\pm$ 1.46 (0.93)	21.81 $\pm$ 4.46 (0.70)

¹ Mean of EC_{50} value $\pm$ standard deviation of at least three independent experiments for each transgenic line;

² Resistance index (RI), ratio between the EC_{50} value of the transgenic line and the EC_{50} value of the parental line T7/Cas9.

³ Drug concentration in μ M;

⁴ Drug concentration in nM.

4. Discussion

The main goal of this study was to explore the mechanisms of action and resistance to PM in *L. amazonensis*. To achieve that, both resistant and highly susceptible lines were first characterized phenotypically *in vitro* and *in vivo*. Potential genes involved in the susceptibility to PM were identified after WGS and bioinformatic analysis, and functionally validated. Two isolates known to be highly susceptible to PM were used, and eight resistant lines were generated by distinct methods (Figure 1).

Resistant clones generated by chemical mutagenesis (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 and PM-M10) had their EC₅₀ values 3 to 5-fold higher at the promastigote stage and 3 to more than 8-fold higher in intracellular amastigotes compared with the M2269 strain. Recently, this strategy was also performed in *L. infantum*, and resistant lines selected with other mutagenic agents had EC₅₀ values similarly higher at the promastigote stage (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). The selection of resistant lines by mutagenesis did not impact the growth of parasites as promastigotes, their infection capacity *in vitro* or the replication of intracellular amastigotes. On the other hand, PM resistance in lines generated by stepwise selection in promastigotes (PM-P1 and PM-P2) had a strong impact on parasite fitness. A significant reduction in the replication of promastigotes at the logarithmic growth phase was observed, as well as in their infectivity both *in vitro* and *in vivo*. In *L. donovani* PM-resistant lines generated by stepwise selection at the promastigote stage had no significant changes in the proliferation pattern of promastigotes, or in the infectivity *in vitro* (Bhandari, Sundar et al. 2014, Verma, Bhandari et al. 2017, Rastrojo, García-Hernández et al. 2018, Shaw, Imamura et al. 2019). Interestingly, the resistance phenotype in PM-P2 was easily reversed when cultivated in the absence of PM (PM-P2^{-PM}). Likewise, both infectivity *in vitro* and *in vivo* were reestablished, following the significant reduction in the EC₅₀ values at the promastigote and amastigote stages. These findings indicate that the PM resistance phenotype in these lines is dependent on the drug pressure, which is directly related to a high fitness cost for the parasite. To the best of our knowledge, this is the first description of the impact of PM on infectivity, when parasites are under drug pressure at the promastigote stage.

A PM-resistant line was selected at the amastigote stage, as described (Hendrickx, Boulet et al. 2014). PM-A1 had EC₅₀ values higher than the wild-type strain subjected to the same successive passages in BMDMs in both stages of the parasite. A *L. infantum* resistant line selected in the same way was 2-fold more resistant at the

amastigote stage and no difference in susceptibility was observed at the promastigote stage (Hendrickx, Boulet et al. 2014). PM-A1 could efficiently infect BMDMs, displaying a higher number of amastigotes per infected macrophage than the M2269 strain. When cultured without PM, PM-A1^{-PM} had a reduction in the EC₅₀ value comparable to the wild-type strain. These findings confirm the transience of the resistance phenotype in the absence of PM in resistant lines selected in both stages of the parasite.

The resistance phenotype of PM-A1 was also evaluated *in vivo*. A refractory response was found, even in the highest PM dosage, with a small reduction in footpad lesion size and parasite burden at the end of the treatment. Differently, in mice infected with the M2269 strain and treated with PM, a significant reduction in lesion size and parasite burden was observed when compared with untreated animals and infected with this strain, confirming previous findings of our group (Coser, Ferreira et al. 2020). Isolated parasites from lesions of mice infected with M2269 strain had an increase in the EC₅₀ values in both life stages of the parasite, being dose-dependent. On the other hand, PM-A1 parasites isolated from treated animals had a reduction in the EC₅₀ values, demonstrating partial loss of the resistance phenotype throughout the treatment. Even showing increased susceptibility, parasites isolated at the end of treatment from mice infected with PM-A1 maintained their resistance phenotype. During *in vivo* selection of resistant parasites of *L. donovani* and *L. infantum*, an increase in EC₅₀ values was observed at the amastigote stage, indicating that treatment with PM can induce the selection of resistant parasites after a short treatment exposure (Hendrickx, Mondelaers et al. 2015).

A fluorescent analogue of PM was used to assess whether PM accumulation could be correlated with the variable susceptibility in resistant and highly susceptible lines. Interestingly, both resistant and susceptible lines accumulated more FI-PM than the M2269 strain. It was hypothesized that distinct mechanisms of uptake and metabolism of the drug are playing a role in these lines. Differently, a *L. donovani* PM-resistant line was described to have accumulated less PM than the parental and susceptible strain (Jhingran, Chawla et al. 2009). This resistant line also had higher number of vesicles in the cytoplasm than the wild-type strain, which was speculated to be a result of PM being sequestered into vacuoles, as a mechanism of elimination of the drug (Chawla, Jhingran et al. 2011). On the other hand, the resistant lines of *L. amazonensis* described here had fewer vesicles in their cytoplasm, whereas highly susceptible isolates had higher number of vesicles compared with the M2269 strain. Endocytosis is a known mechanism of AGs

internalization in higher eukaryotes and is mediated by a receptor present on the apical cell surface of hair cells, with subsequent transport to lysosomes through vesicle-mediated trafficking (Hashino and Shero 1995, Hashino, Shero et al. 1997). For example, sensory hair cells of mammals showed accumulation of gentamicin in lysosomes (de Groot, Meeuwssen et al. 1990). An endocytosis inhibitor (NEM), which inhibits vesicular transport, was used to evaluate whether vesicle trafficking affects the resistance and susceptibility phenotype in the parasite. For this, the reference strain, M2269, together with a highly susceptible isolate (ER256) and a resistant line (PM-P2) were investigated. A dose-dependent response to PM in increased concentrations of NEM was observed. While the M2269 strain and the isolate ER256 were more susceptible to PM when incubated with NEM, significant increase in the EC_{50} value of PM-P2 was observed. When evaluated the accumulation of FI-PM in the presence of NEM, all lines tested showed a reduction in PM accumulation compared to parasites incubated only with the fluorescent analogue. Similar results were observed in *L. donovani* resistant lines, which accumulated less PM than the wild-type strain (Jhingran, Chawla et al. 2009). Altogether, these results suggest that vesicle-trafficking is associated to PM susceptibility in *L. amazonensis*.

Previous studies have demonstrated that a *L. donovani* PM-resistant line selected *in vitro* by drug pressure at the promastigote stage had an amplification of a genomic region at chromosome 27 which contained two genes: D-lactate dehydrogenase enzyme (*LinJ.27.1940*, *D-LDH*) and branched-chain amino acid aminotransferase (*LinJ.27.1950*, *BCAT*) (Rastrojo, García-Hernández et al. 2018). *L. infantum* PM-resistant lines, selected after chemical mutagenesis, harboured mutations in genes related to ribosomes and translation machinery (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Among them, one gene was functionally validated and it codes for a protein kinase involved in parasite translation, the calcium-dependent protein kinase 1 (*LinJ.33.1810*, *CDPK1*) (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). *CDPK1* is an essential gene for parasite proliferation, and it interacts with other proteins, such as the ribosomal protein L23a (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). L23a is involved in translation and is phosphorylated by *CDPK1* protein. It was found to be overexpressed in *L. donovani* isolates that were resistant to antimony and showed cross-resistance with PM (Das, Shah et al. 2013). The role of both these proteins in PM resistance was first demonstrated in *L. infantum* and *L. donovani* (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). When overexpressed, *CDPK1* induced an increase in PM susceptibility, and when one of the alleles is

inactivated, parasites became resistant to the drug (Das, Shah et al. 2013, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). In addition to resistance to PM, *L. infantum* antimony-resistant parasites also presented mutations in this gene (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). As seen in *L. infantum*, the partial inactivation of *CDPK1* gene in *L. amazonensis* resulted in PM resistance phenotype, and its overexpression led to increased susceptibility to PM in both life stages of the parasite, confirming its role in PM resistance in this species. Likewise, the overexpression of the *L23a* gene in *L. amazonensis* led to an increase in susceptibility to PM in promastigotes and intracellular amastigotes, while its inactivation led to PM resistance, the opposite observed for *L. donovani* (Das, Shah et al. 2013).

Whole-genome sequencing (WGS) of *L. donovani* PM-resistant lines generated by stepwise selection at the promastigote stage showed that the resistance phenotype is probably multifactorial and is associated with single nucleotide variations (SNVs) and copy number variation of genes involved in transcription, translation, protein turnover, mitochondrial function, signalling, membrane transport and vesicular trafficking (Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021, Ghosh, Kumar et al. 2022). However, none of these genes were functionally validated and consequentially correlated with PM resistance in *Leishmania* (Rastrojo, García-Hernández et al. 2018, Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021, Ghosh, Kumar et al. 2022).

To investigate the molecular basis of susceptibility to PM in *L. amazonensis*, WGS of both highly susceptible isolates and PM-resistant lines was performed. Firstly, the reference strain was sequenced to achieve a more reliable comparison with the other lines. The whole genome of this strain was previously obtained and it is available in TriTrypDB, but it is not completely annotated at the chromosome level (Real, Vidal et al. 2013). Our strategy using a Nanopore-Illumina hybrid assembly of the genome allowed for the chromosomes to be properly assembled using Nanopore sequences, and for fine base correction by the Illumina reads. For example, we report here that chromosome 30 of *L. amazonensis* M2269 genome is trisomic. Differently, variation in chromosome copy number was found in other strains of *L. amazonensis*, such as La-UA301 and PH8, as well as strains of *L. mexicana*, such as U1103 strain, in which chromosome 30 is tetrasomic (Patino, Muskus et al. 2020) (Rogers, Hilley et al. 2011, Goes, Brasil et al. 2023). In the genome data of the M2269 strain previously reported, chromosome 30 was described as pentasomic, which is contrary to our findings (Real, Vidal et al. 2013). This strengthened the use of an in-house generated genome for the reference strain, considering that the resistant lines obtained in this work derive from it.

Chromosome 6 was found to be increased in the copy number in all PM-resistant lines selected at the promastigote stage under drug pressure and decreased in the resistant line selected at the amastigote stage (PM-A1). This chromosome also had an increase in its copy number in *L. donovani* PM-resistant lines selected at the promastigote stage (Ghosh, Kumar et al. 2022). Deletion of a genomic region containing ABC transporters genes (*ABCG1* and *ABCG2*) in this chromosome or the overexpression of a *locus* that codes for a hypothetical protein in this chromosome were previously associated with PM resistance in *L. infantum* (Gazanion, Fernández-Prada et al. 2016, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Chromosomes 12 and 23 were found increased in the susceptible isolates analysed here (ER256 and UB017), which was also seen for PM-resistant lines of *L. donovani* and *L. infantum*, respectively. However, chromosome 12 had decreased copy number in *L. infantum* resistant lines (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Decrease in chromosome copy number of chromosome 15 was observed in PM-resistant lines selected by stepwise selection, as well as in PM-resistant lines of *L. donovani* (Ghosh, Kumar et al. 2022). Chromosome 26 was found decreased in copy number in clinical isolates, while in PM-resistant lines of *L. infantum* this chromosome was increased in copy number (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Altogether, these findings suggest that changes in copy number of chromosomes 6, 15 and 26 may play a role in PM susceptibility in *Leishmania* spp.

After WGS, on average, 9,500 SNVs and 800 SNVs were identified in coding regions of the clinical isolates and PM-resistant lines, respectively. The higher number of variants in isolates can be explained by the fact that PM-resistant lines are derived from the reference strain M2269 itself, indicating less genetic variation compared with isolates. Studies have demonstrated higher genetic diversity among parasites circulating in a wide geographic distribution and in association with the clinical manifestation (Bussotti, Gouzelou et al. 2018, Zackay, Cotton et al. 2018, Patino, Muñoz et al. 2020, Schwabl, Boité et al. 2021, Santi and Murta 2022).

Among variants detected in PM-resistant lines and clinical isolates, three potential genes were selected for functional validation analysis: *PTP*, *PDF* and *rMETTL*. *PTP* is a protein tyrosine phosphatase involved in lipid metabolism, biosynthesis of very-long-chain fatty acids and ether-lipids, with hydroxyacyl-CoA dehydratase and lyase activity, besides a component of glycosome and cell membrane as predicted in TriTrypDB. Glycosomes are involved in processes such as glycolysis, β -oxidation of fatty acids and fatty acid elongation, ether-lipid biosynthesis, carbohydrate metabolism, purine

salvage pathway and reactive oxygen species metabolism (Rodrigues, Godinho et al. 2014, Haanstra, González-Marcano et al. 2016). In *L. major* promastigotes, lipophosphoglycan (LPG) is anchored in glycosylphosphatidylinositol (GPI) by an ether-lipid, which is essential for parasite survival inside the vector and initial interaction with the mammalian host (Sacks 2001, Späth, Garraway et al. 2003). Therefore, PTP is likely essential for the parasite survival, which was endorsed by the inability of a full knockout parasite. Instead, a partial mutant was generated. The inactivation of one allele did not interfere in the promastigote proliferation pattern, but interfered in the infectivity. Parasites became less susceptible only at the amastigote stage, with no impact on promastigote susceptibility, suggesting a stage-dependent role of this protein. Possible alterations in membrane lipid profile caused by partial deficiency of PTP in lipid metabolism, may favour PM resistance, with impact only at the amastigote stage. Changes in the lipid composition of the membrane are known to affect drug and plasma membrane interaction and consequently drug uptake of MF and AmB (Mbongo, Loiseau et al. 1998, Rakotomanga, Blanc et al. 2007). Partial deletion of *PTP* also affected SbIII susceptibility and lipid metabolism has already been implicated in antimony resistance (Berman, Gallalee et al. 1987, t'Kindt, Scheltema et al. 2010). The overexpression of *PTP* gene led parasites to be highly susceptible to PM in both stages of the parasite.

PDF gene codes for a polypeptide deformylase protein, involved in translation, responsible for removing formyl groups of N-terminal methionine, and essential for translation initiation (Giglione and Meinnel 2001, Giglione, Boularot et al. 2004, Bouzaidi-Tiali, Giglione et al. 2007). In bacteria, *PDF* gene is essential, as well as in *L. amazonensis*, considering it was impossible to inactivate both alleles in promastigotes. As observed in *PTP*^{+/-} line, the *PDF*^{+/-} line was also resistant only at the amastigote stage, while the overexpressing line was highly susceptible in both stages of the parasite. These findings suggest that this enzyme may affect the rates of the translation, a process that is inhibited by PM (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017). This enzyme has been demonstrated to be a potential drug target against bacteria and protozoa, including trypanosomatids (Meinnel 2000, Giglione and Meinnel 2001, Boularot, Giglione et al. 2004, Leeds and Dean 2006, Bouzaidi-Tiali, Giglione et al. 2007).

Finally, *rMETTL*, an rRNA methyltransferase, is involved in the process of rRNA modification in the stages of assembly and maturation of ribosomal subunits (Gu, Gustafsson et al. 1999, Lesnyak, Sergiev et al. 2006, Sergeeva, Bogdanov et al. 2015). RNA methylation of rRNA by RNA methyltransferases can cause modifications of the

binding site of the drug and it is one of the mechanisms of antibiotic resistance in bacteria (Wilson 2014). In addition, methylation of ribosomes may affect the translation profile of specific proteins (Gupta, Sothiselvam et al. 2013). The *rMETTL* gene was found mutated in two PM-resistant lines selected by *in vitro* mutagenesis. Deletion of the rRNA methyltransferase gene in bacteria resulted in increased susceptibility PM, and affected its virulence (Kyuma, Kizaki et al. 2015, Zou, Zhang et al. 2018). Differently, in the null mutant and in the overexpressing line of the *rMETTL* gene, parasites were resistant and highly susceptible to PM, respectively, in both forms of the parasite. Since this methyltransferase is involved in rRNA modification, it was hypothesized that the translation activity may be affected in absence of methylation. Alterations can lead to an increase in translation rates and consequently to resistance, as demonstrated in the partial knockout mutants of *CDPK1* gene (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Inactivation of *rMETTL* also affected antimony susceptibility, making parasites more susceptible to SbIII. Recent studies have shown that antimony-resistant parasites have differential expression of ribosomal proteins and proteins involved in translation, leading to a translational reprogramming as mechanism of resistance (Brotherton, Bourassa et al. 2013, Das, Shah et al. 2013, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Gutierrez Guarnizo, Tikhonova et al. 2023). It would be interesting to evaluate whether PM-resistant lines and clinical isolates described in this study exhibit changes in the expression profile of proteins involved in translation.

Possible cross-resistance of PM-resistant lines at the promastigote stage to antileishmanial drugs was also evaluated. In all PM-resistant lines tested, an increase in SbIII susceptibility was observed in PM-M10 resistant line, as well as in knockout lines for genes *PTP*, *PDF* and *rMETTL* functionally validated here. Cross-resistance to antimonials has been described in other species of *Leishmania* spp. resistant to PM (Liarde and Murta 2010, García-Hernández, Manzano et al. 2012, Gómez Pérez, García-Hernandez et al. 2016). In addition, resistance to drug combination with SbIII and PM in *L. donovani* was already described (García-Hernández, Manzano et al. 2012). Some genes involved in antimony or PM resistance, such as *CDPK1* and *L23a*, also demonstrated cross-resistance profile to both drugs (Das, Shah et al. 2013, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019).

In conclusion, we applied a WGS strategy to identify potential genes related to PM resistance, in PM-resistant lines selected by different methods coupled with highly susceptible parasites. PM resistance and susceptibility showed association with vesicle-

trafficking and drug accumulation, besides proteins involved in translation machinery, a known target of PM in bacteria and *Leishmania*. Taken together, the data presented in this study indicate that the mechanisms of action and resistance to PM are multifactorial. The identification of novel targets may also contribute to the development of new and more specific AG derivatives for the chemotherapy of leishmaniasis.

5. References

- Adl, S. M., D. Bass, C. E. Lane, J. Lukeš, C. L. Schoch, A. Smirnov, S. Agatha, C. Berney, M. W. Brown, F. Burki, P. Cárdenas, I. Čepička, L. Chistyakova, J. Del Campo, M. Dunthorn, B. Edvardsen, Y. Eglit, L. Guillou, V. Hampl, A. A. Heiss, M. Hoppenrath, T. Y. James, A. Karnkowska, S. Karpov, E. Kim, M. Kolisko, A. Kudryavtsev, D. J. G. Lahr, E. Lara, L. Le Gall, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. Massana, E. A. D. Mitchell, C. Morrow, J. S. Park, J. W. Pawlowski, M. J. Powell, D. J. Richter, S. Rueckert, L. Shadwick, S. Shimano, F. W. Spiegel, G. Torruella, N. Youssef, V. Zlatogursky and Q. Zhang (2019). "Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes." *J Eukaryot Microbiol* **66**(1): 4-119.
- Beneke, T., R. Madden, L. Makin, J. Valli, J. Sunter and E. Gluenz (2017). "A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids." *R Soc Open Sci* **4**(5): 170095.
- Berman, J. D., J. V. Gallalee and J. M. Best (1987). "Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes." *Biochem Pharmacol* **36**(2): 197-201.
- Bhandari, V., S. Sundar, J. C. Dujardin and P. Salotra (2014). "Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(5): 2580-2585.
- Bharadava, K., T. K. Upadhyay, R. S. Kaushal, I. Ahmad, Y. Alraey, S. Siddiqui and M. Saeed (2024). "Genomic Insight of *Leishmania* Parasite: In-Depth Review of Drug Resistance Mechanisms and Genetic Mutations." *ACS Omega* **9**(11): 12500-12514.
- Bhattacharya, A., P. Leprohon, S. Bigot, P. K. Padmanabhan, A. Mukherjee, G. Roy, H. Gingras, A. Mestdagh, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2019). "Coupling chemical mutagenesis to next generation sequencing for the identification of drug resistance mutations in *Leishmania*." *Nat Commun* **10**(1): 5627.

Boularot, A., C. Giglione, I. Artaud and T. Meinnel (2004). "Structure-activity relationship analysis and therapeutic potential of peptide deformylase inhibitors." Curr Opin Investig Drugs 5(8): 809-822.

Bouzaidi-Tiali, N., C. Giglione, Y. Bulliard, M. Pusnik, T. Meinnel and A. Schneider (2007). "Type 3 peptide deformylases are required for oxidative phosphorylation in *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol 65(5): 1218-1228.

Britto, C., C. Ravel, P. Bastien, C. Blaineau, M. Pagès, J. P. Dedet and P. Wincker (1998). "Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes." Gene 222(1): 107-117.

Brotherton, M. C., S. Bourassa, P. Leprohon, D. Légaré, G. G. Poirier, A. Droit and M. Ouellette (2013). "Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant." PLoS One 8(11): e81899.

Burza, S., S. L. Croft and M. Boelaert (2018). "Leishmaniasis." Lancet 392(10151): 951-970.

Bussotti, G., E. Gouzelou, M. Côrtes Boité, I. Kherachi, Z. Harrat, N. Eddaikra, J. C. Mottram, M. Antoniou, V. Christodoulou, A. Bali, F. Z. Guerfali, D. Laouini, M. Mukhtar, F. Dumetz, J. C. Dujardin, D. Smirlis, P. Lechat, P. Pescher, A. El Hamouchi, M. Lemrani, C. Chicharro, I. P. Llanes-Acevedo, L. Botana, I. Cruz, J. Moreno, F. Jeddi, K. Aoun, A. Bouratbine, E. Cupolillo and G. F. Späth (2018). "*Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification." mBio 9(6).

Camacho, E., S. González-de la Fuente, A. Rastrojo, R. Peiró-Pastor, J. C. Solana, L. Tabera, F. Gamarro, F. Carrasco-Ramiro, J. M. Requena and B. Aguado (2019). "Complete assembly of the *Leishmania donovani* (HU3 strain) genome and transcriptome annotation." Sci Rep 9(1): 6127.

Chawla, B., A. Jhingran, A. Panigrahi, K. D. Stuart and R. Madhubala (2011). "Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*." PLoS One 6(10): e26660.

Coelho, A. C., P. Leprohon and M. Ouellette (2012). "Generation of *Leishmania* hybrids by whole genomic DNA transformation." PLoS Negl Trop Dis 6(9): e1817.

Coelho, A. C., C. T. Trinconi, C. H. Costa and S. R. Uliana (2014). "In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **8**(7): e2999.

Coelho, A. C., C. T. Trinconi, L. Senra, J. K. Yokoyama-Yasunaka and S. R. Uliana (2015). "Leishmania is not prone to develop resistance to tamoxifen." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **5**(3): 77-83.

Coser, E. M., B. A. Ferreira, N. Branco, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2020). "Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility in vitro and the treatment outcome in vivo." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **14**: 91-98.

Coser, E. M., B. A. Ferreira, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2021). "Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of *Leishmania* species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil." Acta Trop **215**: 105806.

Croft, S. L. and P. Olliaro (2011). "Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities." Clin Microbiol Infect **17**(10): 1478-1483.

Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.

Das, S., P. Shah, R. K. Baharia, R. Tandon, P. Khare, S. Sundar, A. A. Sahasrabudhe, M. I. Siddiqi and A. Dube (2013). "Over-expression of 60s ribosomal L23a is associated with cellular proliferation in SAG resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*." PLoS Negl Trop Dis **7**(12): e2527.

de Groot, J. C., F. Meeuwse, W. E. Ruizendaal and J. E. Veldman (1990). "Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea." Hear Res **50**(1-2): 35-42.

Díaz-Viraqué, F., G. Greif, L. Berná and C. Robello (2021). "Nanopore Long Read DNA Sequencing of Protozoan Parasites: Hybrid Genome Assembly of *Trypanosoma cruzi*." Methods Mol Biol **2369**: 3-13.

Espada, C. R., R. M. Magalhães, M. C. Cruz, P. R. Machado, A. Schrieffer, E. M. Carvalho, V. Hornillos, J. M. Alves, A. K. Cruz, A. C. Coelho and S. R. B. Uliana (2019). "Investigation of the pathways related to intrinsic miltefosine tolerance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates reveals differences in drug uptake." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **11**: 139-147.

Fairlamb, A. H., N. A. Gow, K. R. Matthews and A. P. Waters (2016). "Drug resistance in eukaryotic microorganisms." Nat Microbiol **1**(7): 16092.

Fernández-García, M., I. Mesquita, C. Ferreira, M. Araújo, B. Saha, M. F. Rey-Stolle, A. García, R. Silvestre and C. Barbas (2023). "*Leishmania donovani* Induces Multiple Dynamic Responses in the Metabolome Associated with Amastigote Differentiation and Maturation Inside the Human Macrophage." J Proteome Res **22**(7): 2256-2270.

Ferreira, B. A., E. M. Coser, C. Saborito, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2023). "*In vitro* miltefosine and amphotericin B susceptibility of strains and clinical isolates of *Leishmania* species endemic in Brazil that cause tegumentary leishmaniasis." Exp Parasitol: 108462.

García-Hernández, R., J. I. Manzano, S. Castanys and F. Gamarro (2012). "*Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations." PLoS Negl Trop Dis **6**(12): e1974.

Gazanion, É., C. Fernández-Prada, B. Papadopoulou, P. Leprohon and M. Ouellette (2016). "Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(21): E3012-3021.

Ghosh, S., V. Kumar, A. Verma, T. Sharma, D. Pradhan, A. Selvapandiyan, P. Salotra and R. Singh (2022). "Genome-wide analysis reveals allelic variation and chromosome copy number variation in paromomycin-resistant *Leishmania donovani*." Parasitol Res **121**(11): 3121-3132.

Giglione, C., A. Boularot and T. Meinnel (2004). "Protein N-terminal methionine excision." Cell Mol Life Sci **61**(12): 1455-1474.

Giglione, C. and T. Meinnel (2001). "Peptide deformylase as an emerging target for antiparasitic agents." Expert Opin Ther Targets **5**(1): 41-57.

Goes, W. M., C. R. F. Brasil, J. L. Reis-Cunha, A. Coqueiro-Dos-Santos, V. Grazielle-Silva, J. de Souza Reis, T. C. Souto, M. F. Laranjeira-Silva, D. C. Bartholomeu, A. P. Fernandes and S. M. R. Teixeira (2023). "Complete assembly, annotation of virulence genes and CRISPR editing of the genome of *Leishmania amazonensis* PH8 strain." Genomics **115**(5): 110661.

Gómez Pérez, V., R. García-Hernandez, V. Corpas-López, A. M. Tomás, J. Martín-Sanchez, S. Castanys and F. Gamarro (2016). "Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **6**(2): 133-139.

Goodwin, S., J. D. McPherson and W. R. McCombie (2016). "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies." Nat Rev Genet **17**(6): 333-351.

Goto, H. and J. A. Lindoso (2010). "Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Expert Rev Anti Infect Ther **8**(4): 419-433.

Gu, X. R., C. Gustafsson, J. Ku, M. Yu and D. V. Santi (1999). "Identification of the 16S rRNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*." Biochemistry **38**(13): 4053-4057.

Gupta, P., S. Sothiselvam, N. Vázquez-Laslop and A. S. Mankin (2013). "Deregulation of translation due to post-transcriptional modification of rRNA explains why erm genes are inducible." Nat Commun **4**: 1984.

Gutierrez Guarnizo, S. A., E. B. Tikhonova, A. L. Karamyshev, C. E. Muskus and Z. N. Karamysheva (2023). "Translational reprogramming as a driver of antimony-drug resistance in *Leishmania*." Nat Commun **14**(1): 2605.

Haanstra, J. R., E. B. González-Marcano, M. Gualdrón-López and P. A. Michels (2016). "Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites." Biochim Biophys Acta **1863**(5): 1038-1048.

Hashino, E. and M. Shero (1995). "Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells." Brain Res **704**(1): 135-140.

Hashino, E., M. Shero and R. J. Salvi (1997). "Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells." Brain Res **777**(1-2): 75-85.

Hendrickx, S., G. Boulet, A. Mondelaers, J. C. Dujardin, S. Rijal, L. Lachaud, P. Cos, P. Delputte and L. Maes (2014). "Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*." Parasitol Res **113**(5): 1875-1881.

Hendrickx, S., R. A. Inocência da Luz, V. Bhandari, K. Kuypers, C. D. Shaw, J. Lonchamp, P. Salotra, K. Carter, S. Sundar, S. Rijal, J. C. Dujardin, P. Cos and L. Maes (2012). "Experimental induction of paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: outcome dependent on *in vitro* selection protocol." PLoS Negl Trop Dis **6**(5): e1664.

Hendrickx, S., A. Mondelaers, E. Eberhardt, P. Delputte, P. Cos and L. Maes (2015). "In Vivo Selection of Paromomycin and Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani* and *L. infantum* in a Syrian Hamster Model." Antimicrob Agents Chemother **59**(8): 4714-4718.

Hendrickx, S., J. L. Reis-Cunha, S. Forrester, D. C. Jeffares and G. Caljon (2021). "Experimental Selection of Paromomycin Resistance in *Leishmania donovani* Amastigotes Induces Variable Genomic Polymorphisms." Microorganisms **9**(8).

Jamil, K. M., R. Haque, R. Rahman, M. A. Faiz, A. T. Bhuiyan, A. Kumar, S. M. Hassan, H. Kelly, P. Dhalaria, S. Kochhar, P. Desjeux, M. A. Bhuiyan, M. M. Khan and R. S. Ghosh (2015). "Effectiveness Study of Paromomycin IM Injection (PMIM) for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (VL) in Bangladesh." PLoS Negl Trop Dis **9**(10): e0004118.

Jhingran, A., B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett and R. Madhubala (2009). "Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **164**(2): 111-117.

Joshi, N. A., Fass, J. N. (2011) "Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]". [S. l.: s. n.] Available at: <https://github.com/najoshi/sickle>

Kapler, G. M., C. M. Coburn and S. M. Beverley (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-1094.

Kirsebom, L. A., A. Virtanen and N. E. Mikkelsen (2006). "Aminoglycoside interactions with RNAs and nucleases." Handb Exp Pharmacol **173**(173): 73-96.

Koren, S., B. P. Walenz, K. Berlin, J. R. Miller, N. H. Bergman and A. M. Phillippy (2017). "Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation." Genome Res **27**(5): 722-736.

Koressaar, T. and M. Remm (2007). "Enhancements and modifications of primer design program Primer3." Bioinformatics **23**(10): 1289-1291.

Kyuma, T., H. Kizaki, H. Ryuno, K. Sekimizu and C. Kaito (2015). "16S rRNA methyltransferase KsgA contributes to oxidative stress resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*." Biochimie **119**: 166-174.

Laffitte, M. N., P. Leprohon, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2016). "Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance." F1000Res **5**: 2350.

Leeds, J. A. and C. R. Dean (2006). "Peptide deformylase as an antibacterial target: a critical assessment." Curr Opin Pharmacol **6**(5): 445-452.

Lesnyak, D. V., P. V. Sergiev, A. A. Bogdanov and O. A. Dontsova (2006). "Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: I. the ycbY gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA." J Mol Biol **364**(1): 20-25.

Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis and R. Durbin (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." Bioinformatics **25**(16): 2078-2079.

Liarte, D. B. and S. M. Murta (2010). "Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species." Parasitol Res **107**(1): 205-212.

Lu, H., F. Giordano and Z. Ning (2016). "Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly." Genomics Proteomics Bioinformatics **14**(5): 265-279.

Lukeš, J., A. Butenko, H. Hashimi, D. A. Maslov, J. Votýpka and V. Yurchenko (2018). "Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree." Trends Parasitol **34**(6): 466-480.

Martin, M. (2011) "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." EMBnet.journal, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 10–12, 2011. Available at: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Matsunaga, K., H. Yamaki, T. Nishimura and N. Tanaka (1986). "Inhibition of DNA replication initiation by aminoglycoside antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **30**(3): 468-474.

Mbongo, N., P. M. Loiseau, M. A. Billion and M. Robert-Gero (1998). "Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **42**(2): 352-357.

Meinzel, T. (2000). "Peptide deformylase of eukaryotic protists: a target for new antiparasitic agents?" Parasitol Today **16**(4): 165-168.

Montalvo, A. M., J. Fraga, I. Maes, J. C. Dujardin and G. Van der Auwera (2012). "Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(7): 1453-1461.

Musa, A. M., J. Mbui, R. Mohammed, J. Olobo, K. Ritmeijer, G. Alcoba, G. Muthoni Ouattara, T. Egondi, P. Nakanwagi, T. Omollo, M. Wasunna, L. Verrest, T. P. C. Dorlo, B. Musa Younis, A. Nour, E. Taha Ahmed Elmukashfi, A. Ismail Omer Haroun, E. A. G. Khalil, S. Njenga, H. Fikre, T. Mekonnen, D. Mersha, K. Sisay, P. Sagaki, J. Alvar, A. Solomos and F. Alves (2023). "Paromomycin and Miltefosine Combination as an Alternative to Treat Patients With Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: A Randomized, Controlled, Multicountry Trial." Clin Infect Dis **76**(3): e1177-e1185.

Ostyn, B., E. Hasker, T. P. Dorlo, S. Rijal, S. Sundar, J. C. Dujardin and M. Boelaert (2014). "Failure of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis in children and men in South-East Asia." PLoS One **9**(6): e100220.

Patino, L. H., M. Muñoz, L. Cruz-Saavedra, C. Muskus and J. D. Ramírez (2020). "Genomic Diversification, Structural Plasticity, and Hybridization in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*." Front Cell Infect Microbiol **10**: 582192.

Patino, L. H., C. Muskus, M. Muñoz and J. D. Ramírez (2020). "Genomic analyses reveal moderate levels of ploidy, high heterozygosity and structural variations in a Colombian isolate of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*." Acta Trop **203**: 105296.

Ponte-Sucre, A., F. Gamarro, J. C. Dujardin, M. P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A. W. Pountain, R. Mwenechanya and B. Papadopoulou (2017). "Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge." PLoS Negl Trop Dis **11**(12): e0006052.

Rahman, R., V. Goyal, R. Haque, K. Jamil, A. Faiz, R. Samad, S. Ellis, M. Balasegaram, M. D. Boer, S. Rijal, N. Strub-Wourgaft, F. Alves, J. Alvar and B. Sharma (2017). "Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh." PLoS Negl Trop Dis **11**(5): e0005635.

Rakotomanga, M., S. Blanc, K. Gaudin, P. Chaminade and P. M. Loiseau (2007). "Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **51**(4): 1425-1430.

Rastrojo, A., R. García-Hernández, P. Vargas, E. Camacho, L. Corvo, H. Imamura, J. C. Dujardin, S. Castanys, B. Aguado, F. Gamarro and J. M. Requena (2018). "Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **8**(2): 246-264.

Real, F., R. O. Vidal, M. F. Carazzolle, J. M. Mondego, G. G. Costa, R. H. Herai, M. Würtele, L. M. de Carvalho, R. Carmona e Ferreira, R. A. Mortara, C. L. Barbiéri, P. Mieczkowski, J. F. da Silveira, M. R. Briones, G. A. Pereira and D. Bahia (2013). "The genome sequence of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models." DNA Res **20**(6): 567-581.

Rhoads, A. and K. F. Au (2015). "PacBio Sequencing and Its Applications." Genomics Proteomics Bioinformatics **13**(5): 278-289.

Rijal, S., B. Ostyn, S. Uranw, K. Rai, N. R. Bhattarai, T. P. Dorlo, J. H. Beijnen, M. Vanaerschot, S. Decuyper, S. S. Dhakal, M. L. Das, P. Karki, R. Singh, M. Boelaert and

J. C. Dujardin (2013). "Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance." Clin Infect Dis **56**(11): 1530-1538.

Rodrigues, J. C., J. L. Godinho and W. de Souza (2014). "Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure." Subcell Biochem **74**: 1-42.

Rogers, M. B., J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J. C. Dujardin, M. Berriman, D. F. Smith, C. Hertz-Fowler and J. C. Mottram (2011). "Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*." Genome Res **21**(12): 2129-2142.

Sacks, D. L. (2001). "*Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence." Cell Microbiol **3**(4): 189-196.

Santi, A. M. M. and S. M. F. Murta (2022). "Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of *Leishmania* spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets." Front Cell Infect Microbiol **12**: 826287.

Schwabl, P., M. C. Boité, G. Bussotti, A. Jacobs, B. Andersson, O. Moreira, A. L. Freitas-Mesquita, J. R. Meyer-Fernandes, E. L. Telleria, Y. Traub-Csekö, S. Vaselek, T. Leštinová, P. Volf, F. N. Morgado, R. Porrozzzi, M. Llewellyn, G. F. Späth and E. Cupolillo (2021). "Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas." Commun Biol **4**(1): 139.

Scorza, B. M., E. M. Carvalho and M. E. Wilson (2017). "Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis." Int J Mol Sci **18**(6).

Sergeeva, O. V., A. A. Bogdanov and P. V. Sergiev (2015). "What do we know about ribosomal RNA methylation in *Escherichia coli*?" Biochimie **117**: 110-118.

Shalev-Benami, M., Y. Zhang, H. Rozenberg, Y. Nobe, M. Taoka, D. Matzov, E. Zimmerman, A. Bashan, T. Isobe, C. L. Jaffe, A. Yonath and G. Skiniotis (2017). "Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin." Nat Commun **8**(1): 1589.

Shaw, C. D., H. Imamura, T. Downing, G. Blackburn, G. D. Westrop, J. A. Cotton, M. Berriman, M. Sanders, S. Rijal, G. H. Coombs, J. C. Dujardin and K. C. Carter (2019). "Genomic and Metabolomic Polymorphism among Experimentally Selected Paromomycin-Resistant *Leishmania donovani* Strains." Antimicrob Agents Chemother **64**(1).

Späth, G. F., L. A. Garraway, S. J. Turco and S. M. Beverley (2003). "The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9536-9541.

Steinbiss, S., F. Silva-Franco, B. Brunk, B. Foth, C. Hertz-Fowler, M. Berriman and T. D. Otto (2016). "Companion: a web server for annotation and analysis of parasite genomes." Nucleic Acids Res **44**(W1): W29-34.

Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, P. K. Sinha and S. K. Bhattacharya (2007). "Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India." N Engl J Med **356**(25): 2571-2581.

Sundar, S., A. Singh, M. Rai, V. K. Prajapati, A. K. Singh, B. Ostyn, M. Boelaert, J. C. Dujardin and J. Chakravarty (2012). "Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use." Clin Infect Dis **55**(4): 543-550.

t'Kindt, R., R. A. Scheltema, A. Jankevics, K. Brunner, S. Rijal, J. C. Dujardin, R. Breitling, D. G. Watson, G. H. Coombs and S. Decuypere (2010). "Metabolomics to unveil and understand phenotypic diversity between pathogen populations." PLoS Negl Trop Dis **4**(11): e904.

Uliana, S. R. B., C. T. Trinconi and A. C. Coelho (2018). "Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges." Parasitology **145**(4): 464-480.

Vassilieva, E. V., Nusrat, A. (2008). "Vesicular trafficking: molecular tools and targets". *Exocytosis and Endocytosis*, 3-14.

Verma, A., V. Bhandari, D. K. Deep, S. Sundar, J. C. Dujardin, R. Singh and P. Salotra (2017). "Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in *Leishmania donovani*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **7**(3): 370-377.

Walker, B. J., T. Abeel, T. Shea, M. Priest, A. Abouelliel, S. Sakthikumar, C. A. Cuomo, Q. Zeng, J. Wortman, S. K. Young and A. M. Earl (2014). "Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement." PLoS One **9**(11): e112963.

Webster, C. M. and M. Shepherd (2022). "A mini-review: environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy." World J Microbiol Biotechnol **39**(1): 7.

Wilson, D. N. (2014). "Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance." Nat Rev Microbiol **12**(1): 35-48.

Younis, B. M., A. Mudawi Musa, S. Monnerat, M. Abdelrahim Saeed, E. Awad Gasim Khalil, A. Elbashir Ahmed, M. Ahmed Ali, A. Noureldin, G. Muthoni Ouattara, G. M. Nyakaya, S. Teshome, T. Omollo, M. Ochieng, T. Egondi, M. Mmbone, W. Y. Chu, T. P. C. Dorlo, E. E. Zijlstra, M. Wasunna, J. Alvar and F. Alves (2023). "Safety and efficacy of paromomycin/miltefosine/liposomal amphotericin B combinations for the treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan: A phase II, open label, randomized, parallel arm study." PLoS Negl Trop Dis **17**(11): e0011780.

Zackay, A., J. A. Cotton, M. Sanders, A. Hailu, A. Nasereddin, A. Warburg and C. L. Jaffe (2018). "Genome wide comparison of Ethiopian *Leishmania donovani* strains reveals differences potentially related to parasite survival." PLoS Genet **14**(1): e1007133.

Zamboni, D. S. and M. Rabinovitch (2003). "Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages." Infect Immun **71**(3): 1225-1233.

Zou, J., W. Zhang, H. Zhang, X. D. Zhang, B. Peng and J. Zheng (2018). "Studies on Aminoglycoside Susceptibility Identify a Novel Function of KsgA To Secure Translational Fidelity during Antibiotic Stress." Antimicrob Agents Chemother **62**(10).

5. Discussão

No Brasil e no mundo, o tratamento das leishmanioses apresenta limitações que englobam o alto custo dos medicamentos, a alta toxicidade que gera efeitos colaterais muitas vezes graves; e a longa duração do tratamento, que diminui a adesão ou continuação do tratamento pelo paciente, podendo favorecer casos de falha terapêutica. Além disso, o número de fármacos é restrito e a via de administração, em sua maioria, é parenteral, o que requer a hospitalização do paciente. Devido a essas limitações, associadas ao alto índice de resistência clínica aos antimoniais, o que inviabilizou seu uso na clínica, foram aprovados dois novos fármacos para o tratamento da LV no Sudeste Asiático. A MF é o primeiro fármaco de administração oral aprovado para o tratamento das leishmanioses e vem sendo utilizado no tratamento da LV no Sudeste Asiático desde 2002 (Sundar, Jha et al. 2002). No Brasil, esse fármaco foi aprovado no tratamento da LT em 2018. Além da MF, a PM também vem sendo utilizada no tratamento da LV causada por *L. (L.) donovani* e tem apresentado boa eficácia clínica quando administrada em monoterapia ou em combinação com a AmB ou a MF (Sundar, Jha et al. 2007, Sundar, Sinha et al. 2011, Jamil, Haque et al. 2015). A PM também apresenta a formulação tópica para infecções causadas por *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*, com taxa de cura de cerca de 82% (Ben Salah, Ben Messaoud et al. 2013, Burza, Croft et al. 2018). Embora a PM apresente bons resultados clínicos no tratamento da LV no Sudeste Asiático, estudos clínicos avaliando o potencial da PM contra as leishmanioses ainda não foram conduzidos em áreas endêmicas no Brasil.

Ensaios pré-clínicos demonstraram que a PM possui atividade contra as principais espécies de *Leishmania* endêmicas no Brasil, causadoras da LT e LV (Coser, Ferreira et al. 2020, Coser, Ferreira et al. 2021, Ferreira, Martins et al. 2022). Devido ao seu potencial para uso no tratamento da LT e pelos poucos estudos descrevendo os mecanismos de ação e resistência à PM em *Leishmania*, foram geradas linhagens resistentes à PM de *L. (L.) amazonensis* que tiveram seus genomas sequenciados como forma de identificar os potenciais alvos moleculares deste fármaco. Além das linhagens resistentes selecionadas *in vitro*, foram sequenciados os respectivos genomas de dois isolados clínicos, ER256 e UB017, altamente suscetíveis à PM (Coser, Ferreira et al. 2020, Coser, Ferreira et al. 2021). O genoma desses isolados também foi analisado com o intuito de identificar potenciais genes associados à suscetibilidade à PM. Conforme mencionado previamente, estes isolados nunca foram expostos à PM e a alta sensibilidade ao fármaco é uma característica intrínseca a esses isolados. As linhagens resistentes selecionadas *in vitro* e os isolados clínicos foram comparados quanto ao

perfil de sensibilidade com a cepa referência M2269, considerada suscetível à PM e também sem exposição prévia a esse fármaco.

As linhagens resistentes à PM foram geradas por três métodos distintos de seleção: a mutagênese química *in vitro*, que aumenta a frequência de mutações e consequentemente o número de mutantes resistentes ao fármaco; e pressão seletiva do fármaco nas formas promastigota e amastigota do parasito. Sabe-se que o cultivo do parasito em presença da PM, ou de outros fármacos, pode selecionar parasitos resistentes que adquiriram mutações, deleções e/ou amplificações gênicas ao longo do processo de seleção (Leprohon, Fernandez-Prada et al. 2015). A seleção de linhagens resistentes à PM por mutagênese *in vitro* foi realizada através do tratamento da cepa M2269 com concentração já conhecida do agente mutagênico MNNG, que restabeleceu a proliferação celular 4 dias em cultura após o tratamento. O perfil de restabelecimento de proliferação também foi descrito por Coelho et al. (2015). Em outro estudo, o restabelecimento da proliferação dos promastigotas de *L. (L.) infantum* foi observado após um intervalo de 24 a 36 horas, mas nesse caso, os agentes mutagênicos utilizados eram distintos (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). A seleção das linhagens resistentes foi feita utilizando 300 µM de PM, concentração previamente determinada e que não ultrapassa duas vezes o valor de EC₅₀ da cepa M2269. A tentativa de seleção de parasitos resistentes com concentrações superiores a 300 µM de PM (500, 750 e 1.000 µM) foi realizada, porém sem sucesso (dados não mostrados). A partir da população resistente gerada, cinco clones foram selecionados. As populações clonais resistentes à PM (PM-M2, PM-M5, PM-M8, PM-M9 e PM-M10) apresentaram valores de EC₅₀ três a cinco vezes maiores quando comparados com a cepa parental M2269 na forma promastigota e três a oito vezes na forma amastigota intracelular. Parasitos resistentes à PM de *L. (L.) infantum* selecionados por mutagênese química apresentaram valores de EC₅₀ similares, de duas a oito vezes maiores que a linhagem parental na forma promastigota (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Estes resultados, juntamente com dados publicados por outros grupos de pesquisa, demonstraram que os parasitos resistentes à MF e metatrexato gerados por mutagênese para diferentes espécies de *Leishmania* apresentaram valores de EC₅₀ que variaram de duas a mais de 400 vezes maiores quando comparado com a linhagem parental (Coelho, Trinconi et al. 2015, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Bigot, Leprohon et al. 2023). Assim, a mutagênese *in vitro* pode ser uma alternativa para a geração e identificação de potenciais genes associados ao mecanismo de resistência a um determinado fármaco.

Além da seleção por mutagênese química, a seleção de parasitos resistentes por pressão seletiva, principalmente na forma amastigota intracelular, permite identificar padrões

de alterações no genoma mais próximos do que é observado ao longo do tratamento clínico, uma vez que a geração de parasitos resistentes pode ocorrer devido à subdosagem de medicamentos (Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). Para a geração de linhagens resistentes à PM na forma promastigota, os parasitos foram selecionados com concentrações crescentes do fármaco, com concentração inicial próxima ao valor de EC_{50} da cepa M2269. Ao final de aproximadamente 180 dias, obteve-se uma população resistente que apresentou um valor de EC_{50} pelo menos 6 vezes maior que o valor de EC_{50} da cepa parental. Para a seleção de linhagens resistentes à PM de *L. (L.) donovani*, as concentrações máximas atingidas variaram cerca de duas a oito vezes maiores que os valores de EC_{50} da cepa parental suscetível (Jhingran, Chawla et al. 2009, Bhandari, Sundar et al. 2014, Verma, Bhandari et al. 2017, Rastrojo, García-Hernández et al. 2018). A partir da população resistente de *L. (L.) amazonensis*, dois clones foram selecionados para as posteriores etapas de validação do fenótipo de resistência *in vitro*, *in vivo* e para o NGS. As linhagens PM-P1 e PM-P2, clones provenientes da população resistente, apresentaram valores de EC_{50} pelo menos 9 vezes maiores que a cepa selvagem na forma promastigota do parasito. Em estudos com *L. (L.) donovani*, as linhagens resistentes selecionadas por pressão seletiva nesse estágio do ciclo de vida do parasito apresentaram valores de EC_{50} três a mais de 10 vezes maiores quando comparado com as suas respectivas cepas selvagens (Jhingran, Chawla et al. 2009, Bhandari, Sundar et al. 2014, Verma, Bhandari et al. 2017, Rastrojo, García-Hernández et al. 2018).

A linhagem PM-P2 apresentou proliferação mais lenta no estágio promastigota do que a cepa M2269, atingindo a fase logarítmica de proliferação entre o terceiro e quarto dia, enquanto a cepa selvagem atingiu essa fase de proliferação já no segundo dia em cultura. Diferentemente das linhagens resistentes de *L. (L.) amazonensis*, parasitos resistentes à PM de *L. (L.) donovani* não demonstraram perfil de proliferação alterado (Bhandari, Sundar et al. 2014, Verma, Bhandari et al. 2017, Rastrojo, García-Hernández et al. 2018). Além disso, contrário às linhagens selecionadas por mutagênese *in vitro*, as linhagens PM-P1 e PM-P2 apresentaram uma redução drástica na capacidade de infecção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs). A capacidade de infecção de macrófagos não foi alterada ou reduzida em linhagens resistentes à PM de *L. (L.) donovani* selecionadas na forma promastigota (Maarouf, Adeline et al. 1998, Shaw, Imamura et al. 2019). Já as linhagens resistentes de *L. (L.) amazonensis* apresentaram redução drástica na capacidade de infecção, fenótipo que foi restaurado quando a pressão de seleção foi removida. Diferentemente, as linhagens resistentes à PM de *L. (L.) amazonensis* selecionadas por mutagênese *in vitro* e por pressão seletiva no estágio amastigota, não tiveram a sua capacidade de infecção impactada. Por outro lado, o fenótipo de resistência

da linhagem PM-P2^{-PM} foi perdido e o valor de EC₅₀ foi praticamente restaurado ao valor de EC₅₀ da cepa parental e suscetível ao fármaco no estágio amastigota. Já no estágio promastigota, a resistência persistiu, embora tenha reduzido quando comparada com a linhagem mantida em presença de PM (PM-P2). Em uma linhagem resistente à PM de *L. (L.) donovani*, a estabilidade da resistência foi observada após a linhagem ser mantida em ausência do fármaco por dois meses (Maarouf, Adeline et al. 1998), diferentemente do observado em *L. (L.) amazonensis* com a linhagem PM-P2^{-PM}. Esses resultados indicam que a resistência à PM pode ser transitória, mostrando tendência à perda do fenótipo de resistência em ausência da pressão seletiva do fármaco.

Devido à perda de capacidade de infecção dos BMDMs, camundongos BALB/c foram infectados com a cepa M2269, a linhagem PM-P2 ou a linhagem PM-P2^{-PM}. Ao final do experimento, não foi observado desenvolvimento de lesão nos animais infectados com a linhagem PM-P2, embora tenham sido detectados parasitos na lesão. Já nos animais infectados com a linhagem PM-P2^{-PM}, foi observado aumento do tamanho das lesões, porém menor do que as lesões dos animais infectados com a cepa selvagem M2269. Nesse caso, a carga parasitária foi similar aos animais infectados com a cepa M2269. Os resultados corroboram os resultados anteriores, demonstrando a transitoriedade da perda de infectividade, associada à pressão de seleção da PM.

Já para a seleção de linhagens resistentes à PM na forma amastigota intracelular, foi padronizado um protocolo baseado naquele descrito por Hendrickx et al. (2014), único grupo de pesquisa que até então havia feito a seleção de linhagens resistentes neste estágio do parasito. Os parasitos selvagens foram submetidos a cinco ciclos de infecção e tratamento e foi observado um aumento nas taxas de infecção a cada passagem realizada, com a linhagem resistente selecionada na quinta e última passagem apresentando porcentagem de infecção em torno de 50% em presença do fármaco. A população selecionada, assim como as demais mencionadas anteriormente, também foi clonada e um dos clones, denominado PM-A1, foi selecionado para as etapas posteriores. Essa linhagem apresentou valores de EC₅₀ maiores que a cepa selvagem submetida aos mesmos ciclos de infecção nas formas promastigota e amastigota do parasito, respectivamente. Ao contrário dos resultados descritos por Hendrickx et al. (2014), no qual não foi observado fenótipo de resistência em promastigotas dos parasitos selecionados por pressão seletiva na forma amastigota, os resultados indicaram que o fenótipo de resistência nesse método de seleção ocorreu em ambos os estágios do parasito. A linhagem PM-A1 apresentou porcentagem de infecção e número de amastigotas por macrófago maiores que a cepa selvagem. Quando mantida em ausência de PM por pelo menos vinte passagens na

forma promastigota, a linhagem PM-A1^{-PM} apresentou redução nos valores de EC₅₀ nas duas formas do parasito, além de diminuição na taxa de infecção quando comparada com a linhagem parental PM-A1. Parasitos resistentes de *L. (L.) donovani* à PM selecionados na forma amastigota intracelular mostraram aumento na replicação dos amastigotas *in vitro*, aumento da carga parasitária de animais infectados e resistência às respostas ao estresse induzidas por macrófagos *in vitro* (Hendrickx, Beyers et al. 2016).

Além da caracterização *in vitro*, avaliamos o potencial de resposta ao tratamento com PM da linhagem PM-A1. Camundongos BALB/c foram infectados com a cepa selvagem ou com a linhagem PM-A1 e o tratamento com PM foi iniciado a partir da quarta semana de infecção. Ao final do tratamento, os animais infectados com a cepa M2269 e tratados com a maior dosagem responderam melhor ao tratamento, com redução na carga parasitária, conforme também demonstrado em estudo anterior do nosso grupo (Coser, Ferreira et al. 2020). Por outro lado, os animais infectados com a linhagem PM-A1 foram refratários ao tratamento, com redução discreta do tamanho da lesão quando comparados com os animais infectados com a cepa selvagem. Além da avaliação de carga parasitária, parasitos das lesões dos animais infectados foram isolados em meio M199 líquido para avaliação da suscetibilidade *in vitro* após o tratamento. Como resultado, os parasitos isolados dos animais infectados com a cepa M2269 e tratados com ambas as dosagens apresentaram aumento nos valores de EC₅₀ em ambas as formas de vida do parasito, sendo dose-dependente. Por outro lado, os parasitos das lesões de animais infectados com a linhagem resistente PM-A1 apresentaram redução nos valores de EC₅₀ nas formas promastigota e amastigota intracelular, demonstrando perda do fenótipo de resistência ao longo do tratamento. Apesar de apresentarem aumento da suscetibilidade, esses parasitos ainda foram considerados resistentes quando comparados com os parasitos da cepa selvagem do grupo não tratado. Durante experimentos de seleção *in vivo* de linhagens de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* resistentes à PM, foi observado um aumento nos valores de EC₅₀ na forma amastigota do parasito após tratamento com 350 mg/kg de PM (Hendrickx, Mondelaers et al. 2015), indicando que o tratamento com o fármaco pode induzir a seleção de parasitos resistentes *in vivo* em espécies de *Leishmania*, após uma exposição curta de tratamento.

Após a seleção das linhagens resistentes e caracterização do fenótipo de resistência e suscetibilidade *in vitro* e *in vivo*, foi avaliado se o fenótipo de resistência dos parasitos resistentes e a suscetibilidade de isolados clínicos à PM poderiam ser resultado do acúmulo diferencial do fármaco no parasito. Para isso, mensuramos o acúmulo de PM utilizando um análogo fluorescente do fármaco. Foi observado que os isolados clínicos, assim como as

linhagens resistentes, acumularam mais PM do que a cepa M2269, indicando que os mecanismos envolvidos na suscetibilidade e resistência ao fármaco em *L. (L.) amazonensis* são distintos. Em *L. (L.) donovani*, parasitos resistentes à PM acumularam menos PM do que a cepa selvagem (Jhingran, Chawla et al. 2009), o oposto do observado neste estudo em linhagens resistentes de *L. (L.) amazonensis*. A linhagem PM-P2^{-PM} apresentou um perfil de acúmulo similar à cepa selvagem, evidenciando novamente a transitoriedade da resistência ao fármaco. A fim de compreender o maior acúmulo de PM pelos isolados e linhagens resistentes, foi realizada uma análise ultraestrutural dos promastigotas. Em um estudo similar, linhagens resistentes à PM de *L. (L.) donovani* apresentaram um número maior de vesículas no citoplasma do que a cepa selvagem e, associado aos dados de proteoma que indicaram uma regulação positiva de proteínas envolvidas no tráfego vesicular, os autores propuseram que o fármaco poderia ser sequestrado para o interior de vesículas, como forma de liberá-lo do citoplasma do parasito (Chawla, Jhingran et al. 2011). Diferentemente do observado por Chawla et al. (2011), as linhagens resistentes à PM de *L. (L.) amazonensis* apresentaram um número reduzido de vesículas em seu citoplasma em comparação com a cepa selvagem, enquanto nos isolados clínicos foi observado um número maior de vesículas. Foi previamente demonstrado que os AGs são internalizados por endocitose mediada por um receptor presente na superfície apical celular de células ciliadas, sendo transportados para os lisossomos através do tráfego vesicular (Hashino and Shero 1995, Hashino, Shero et al. 1997). Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi observado o aumento do tamanho dos compartimentos intralisossomais durante o acúmulo do AG canamicina, sugerindo ser um dos mecanismos envolvidos na degeneração de células ciliadas de animais induzida por AGs, que se acumulam até a ruptura dos lisossomos (Hashino, Shero et al. 1997, Hashino, Shero et al. 2000). O acúmulo de gentamicina, outro AG, nos lisossomos também foi descrito em células ciliadas sensoriais de mamíferos tratadas com esse antibiótico (de Groot, Meeuwsen et al. 1990).

Em um trabalho anterior, foi descrito que uma cepa selvagem de *L. (L.) donovani*, quando em presença de inibidores de endocitose, como o inibidor N-etilmaleimida (NEM), acumulava menos PM comparado com o controle tratado apenas com o fármaco (Jhingran, Chawla et al. 2009). Considerando que o processo de endocitose e a presença de vesículas poderia estar envolvido nos mecanismos de ação e resistência da PM, este inibidor de endocitose foi utilizado em ensaios de suscetibilidade *in vitro*, para determinar concentrações ideais que inibiriam a endocitose e não levariam à morte do parasito. Os valores de EC₅₀ do NEM para o isolado ER256, linhagem resistente PM-P2 e a cepa M2269 indicaram que a suscetibilidade a esse inibidor é variável. Foram utilizadas as concentrações de 0,01, 0,1 e 1

μ M de NEM nos ensaios *in vitro* em presença da PM, a fim de avaliar o impacto da endocitose na resposta à PM em *L. (L.) amazonensis*. Observamos que, à medida que a concentração de NEM aumentava, o isolado ER256 e a cepa M2269 se tornaram mais sensíveis à PM, enquanto a linhagem PM-P2 se tornou mais resistente até mesmo na menor concentração de NEM. Quando avaliado o acúmulo de FI-PM em presença de NEM por citometria de fluxo, os dados indicaram que, tanto a linhagem PM-P2, o isolado ER256 e a cepa M2269 apresentaram redução no acúmulo de PM em presença do inibidor em comparação com os parasitos incubados apenas com a FI-PM, demonstrando que a endocitose pode estar associada de alguma forma com a suscetibilidade à PM, porém seu exato papel na resistência ao fármaco ainda é incerto.

Na última etapa da caracterização *in vitro* das linhagens resistentes à PM, foi possível identificar resistência cruzada com os fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses na forma promastigota do parasito. A linhagem resistente selecionada por mutagênese *in vitro* PM-M10 apresentou aumento da suscetibilidade ao SbIII e PEN. A resistência cruzada aos antimoniais e PM já foi previamente descrita em *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani*, além de análises funcionais de genes envolvidos na resistência ao antimônio ou à PM que demonstram perfil de resistência a ambos os fármacos, como os genes que codificam a quinase CDPK1 e a proteína ribossomal L23a, envolvidas na regulação da tradução do parasito (Liarte and Murta 2010, García-Hernández, Manzano et al. 2012, Das, Shah et al. 2013, Gómez Pérez, García-Hernandez et al. 2016, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Alguns estudos demonstram que linhagens resistentes ao antimônio apresentam expressão alterada de proteínas envolvidas na tradução, sugerindo um possível alvo dos antimoniais em *Leishmania* (Brotherton, Bourassa et al. 2013, Das, Shah et al. 2013, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Em um estudo no qual foram selecionados parasitos resistentes às combinações de fármacos, foi observado que *L. (L.) donovani* pode desenvolver resistência à combinação de SbIII e PM (García-Hernández, Manzano et al. 2012). Até o momento, a resistência cruzada de PEN e PM não havia sido descrita.

Após a caracterização *in vitro*, foi realizado o sequenciamento do genoma completo dos isolados clínicos e linhagens resistentes à PM utilizando a plataforma Illumina. Inicialmente, sequenciamos *de novo* o genoma da cepa M2269 de *L. (L.) amazonensis*, uma vez que a sequência disponível desta cepa nos bancos de dados de genomas não estava completamente anotada e carecia de informações estruturais (Real, Vidal et al. 2013). Assim, foi realizada a montagem híbrida de genoma com as sequências provenientes dos sequenciamentos ONT e Illumina, para montagem do genoma a nível de cromossomos com ONT e para correção de bases por Illumina, além de obter informações como o número de

cópias de cada um dos 34 cromossomos desta cepa do parasito. Diferentemente do observado para outras espécies de *Leishmania* ou cepas de *L. (L.) amazonensis*, no qual o cromossomo 30 possui pelo menos quatro cópias (Patino, Muskus et al. 2020, Goes, Brasil et al. 2023), foi constatado que o cromossomo 30 da cepa M2269 é trissômico, juntamente com os cromossomos 3, 7 e 26, enquanto os demais cromossomos foram considerados dissômicos.

Após a montagem híbrida do genoma da cepa M2269, este foi utilizado como referência para a montagem dos genomas dos isolados clínicos e das linhagens resistentes à PM, a fim de detectar variações de nucleotídeos, como SNPs, InDels e/ou polimorfismos de multi-nucleotídeo (MNP) (mutação em dois ou mais nucleotídeos), que poderiam estar associados com a suscetibilidade e resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*, além de variações no número de cópias de genes e cromossomos nessas linhagens. Em *Leishmania*, parasitos resistentes aos fármacos podem apresentar alterações estruturais, como aneuploidias, amplificação e deleção gênica, além de mutações, que podem estar relacionadas com o fenótipo de resistência (Laffitte, Leprohon et al. 2016). As sequências obtidas dos genomas dos isolados e linhagens resistentes apresentaram uma cobertura de 87 até pouco mais de 100 vezes. Os isolados ER256 e UB017 apresentaram alterações no número de cópias dos cromossomos 3, 12, 23 e 26 quando comparados com a cepa M2269, enquanto as linhagens resistentes selecionadas por pressão seletiva apresentaram alterações em número dos cromossomos 3, 6 e 15. As linhagens resistentes selecionadas por mutagênese não apresentaram alterações no número de cópias dos cromossomos, o que pode ser explicado pelo fato de que a mutagênese química não induz necessariamente alterações na somia do parasito.

Em uma linhagem de *L. (L.) donovani* resistente à PM selecionada por pressão seletiva na forma promastigota, foi observado um aumento no número de cópias do cromossomo 6 (Ghosh, Kumar et al. 2022). A superexpressão de um *locus* que codifica uma proteína hipotética (*LinJ.06.1010*) e a deleção de uma pequena região genômica contendo os genes codificadores dos transportadores ABC, ABCG1 e ABCG2 no cromossomo 6 em *L. (L.) infantum* já foram associados com a resistência à PM nessa espécie (Gazanion, Fernández-Prada et al. 2016, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Ghosh, Kumar et al. 2022). Nas linhagens resistentes selecionadas por pressão seletiva na forma promastigota (PM-P1, PM-P2 e PM-P2^{PM}), o cromossomo 6 mostrou aumento no número de cópias, enquanto a linhagem PM-A1 selecionada na forma amastigota apresentou diminuição. O cromossomo 6 de *Leishmania* contém genes que codificam transportadores de membrana, como os transportadores ABC (ABCG1, ABCG2 e ABCG3), que estão envolvidos no efluxo de fármacos em parasitos resistentes aos fármacos, além de proteínas ribossomais envolvidas no processo de síntese

proteica (Sauvage, Aubert et al. 2009). Linhagens resistentes à PM de *L. (L.) donovani* apresentaram aumento do número de cópias do cromossomo 12 (Ghosh, Kumar et al. 2022), assim como os isolados de *L. (L.) amazonensis* utilizados neste estudo. Além disso, foi observada a diminuição no número de cópias dos cromossomos 15 e 23 em *L. (L.) donovani* e do cromossomo 12 em *L. (L.) infantum* (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Ghosh, Kumar et al. 2022). Os isolados clínicos que possuem um fenótipo de alta sensibilidade à PM, também apresentaram aumento do número de cópias do cromossomo 23, enquanto as linhagens resistentes à PM de *L. (L.) amazonensis* selecionadas por pressão seletiva apresentaram diminuição no cromossomo 15, assim como linhagens resistentes de *L. (L.) donovani* (Ghosh, Kumar et al. 2022). O cromossomo 3 mostrou diminuição na somia tanto dos isolados quanto das linhagens resistentes à PM, com exceção da linhagem PM-P1. A somia do cromossomo 26, por sua vez, foi encontrada diminuída apenas nos isolados clínicos. Linhagens resistentes de *L. (L.) infantum* demonstraram aumento número de cópias desse cromossomo (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019).

As análises de bioinformática dos genomas das linhagens resistentes à PM e dos isolados clínicos altamente suscetíveis ao fármaco identificaram variantes em todos os cromossomos, além daquelas variantes também presentes no genoma da cepa M2269. Entre essas variantes, observamos uma predominância de variantes de nucleotídeo único ou SNP, seguido de deleções, inserções, MNPs e variantes que apresentaram combinação de SNPs, MNPs, inserções e deleções, denominadas como *mixed*. A maioria das variantes estava presente em regiões *downstream* (ou à jusante do gene), seguido de regiões *upstream* (ou à montante do gene), regiões intergênicas e regiões codificantes. Mais de 94% das variantes identificadas apresentaram impacto modificador, no qual as variantes não afetam regiões codificadoras; pelo menos 2% das variantes eram de impacto moderado, seguido de mais de 0,9% de variantes de baixo impacto e menos de 0,1% de alto impacto. Já em regiões codificadoras, a maioria das variantes eram *missense* (superior a 58%), no qual há mudança no aminoácido da cadeia polipeptídica, seguida por mutações silenciosas (superior a 24%), que não levam à mudança de aminoácido, e *nonsense* (acima de 0,4%), com alteração de aminoácido por um códon de parada. Os isolados ER256 e UB017 apresentaram maior número de variantes homozigóticas e proporção transição/transversão acima de 2, enquanto nas linhagens resistentes e na cepa M2269 foram detectados maior número de variantes heterozigóticas e proporção transição/transversão em torno de 2, com exceção da linhagem PM-M2, que apresentou valor de proporção superior a 3. Além disso, a maioria das mudanças de base de único nucleotídeo nas linhagens resistentes, isolados e na cepa M2269 foi de T por G. Foi identificado também

que a maioria das mudanças de códon eram AAG (lisina/K) por ACG (treonina/T) em linhagens resistentes selecionadas por mutagênese *in vitro* e pressão seletiva na forma amastigota, isolados clínicos e cepa M2269, enquanto as linhagens selecionadas na forma promastigota apresentaram mudanças em sua maioria de TTC (fenilalanina/F) por GTC (valina/V). A maioria das trocas de aminoácidos nas linhagens resistentes, isolados e cepa M2269 foi de prolina por prolina, ou seja, mutações silenciosas ou sinônimas, com exceção das linhagens resistentes PM-P2 e PM-P2^{-PM}, que tiveram em sua maioria trocas não sinônimas, de asparagina por treonina e fenilalanina por valina, respectivamente. Em *L. (L.) donovani* resistente à PM, a maioria das mudanças de SNPs foi A por G, com proporção transição/transversão de 1,42. Além disso, foi observado maior número de transições, seguido de inserções, transversões e deleções (Ghosh, Kumar et al. 2022).

Entre as SNVs detectadas, identificamos uma média de 800 SNVs (769 SNPs e 15 InDels) em regiões codificantes nas linhagens resistentes à PM, e uma média de 9.500 SNVs (9.438 SNPs e 126 InDels) nos isolados clínicos. Nas linhagens resistentes, a presença de SNVs pelos cromossomos foi heterogênea. Linhagens resistentes à PM de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* apresentaram de 14 a 2.048 SNVs, dependendo do método de seleção dos parasitos resistentes (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021, Ghosh, Kumar et al. 2022). Os isolados apresentaram SNVs em todos os cromossomos, com predominância nos cromossomos 20, 30, 33 e 34. Os isolados apresentaram maior número de variantes comparado com as linhagens resistentes e isso pode ser explicado pelo fato de que as linhagens resistentes são derivadas da mesma cepa (M2269). É esperado que haja uma menor variação genética nas linhagens resistentes do que nos isolados que foram obtidos de hospedeiros distintos e localizações geográficas distintas (Coser, Ferreira et al. 2021). Estudos recentes demonstraram uma alta diversidade genética entre parasitos circulantes em uma vasta distribuição geográfica (Bussotti, Gouzelou et al. 2018, Zackay, Cotton et al. 2018, B, Rezende et al. 2019, Patino, Muñoz et al. 2020, Schwabl, Boité et al. 2021).

Entre as variações encontradas em regiões codificantes, as mutações de moderado e alto impacto, que levam a mudanças em aminoácidos na cadeia polipeptídica, foram investigadas em análises posteriores. A linhagem resistente PM-M2, selecionada por mutagênese *in vitro*, apresentou SNVs em todos os cromossomos, com predominância no cromossomo 20. Nas demais linhagens, por outro lado, a presença ou ausência de SNVs em determinados cromossomos foi variável. Entre as linhagens resistentes à PM selecionadas por pressão seletiva, o cromossomo 30 apresentou maior predominância de SNVs, assim como as linhagens selecionadas por mutagênese, com exceção da linhagem PM-M9. Os SNPs

encontrados em linhagens resistentes à PM de *L. (L.) donovani* estavam localizados nos cromossomos 6, 12, 31 e 34 (Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021).

Devido ao alto número de variantes de alto e moderado impacto encontradas nos isolados clínicos e linhagens resistentes à PM, excluímos as variantes comuns, presentes nas mesmas posições nos respectivos genes das linhagens resistentes e isolados, e também de outras linhagens resistentes à AmB, PEN e MF de *L. (L.) amazonensis* sequenciadas pelo nosso grupo de pesquisa. Devido ao alto número de variantes detectadas, decidimos priorizar as variantes presentes em regiões codificantes. Ao final desta análise, identificamos mutações em genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e metabolismo de lipídeos, transporte intracelular, tradução, fosforilação de proteínas e regulação pós-transcricional da expressão gênica nos isolados ER256 e UB017. As linhagens resistentes à PM selecionadas por mutagênese *in vitro* apresentaram mutações em genes envolvidos na biossíntese de arginina, desfosforilação de proteínas, metilação de RNA e síntese proteica, como o gene *CDPK1*, previamente envolvido na resistência à PM em *L. (L.) infantum* (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Já as linhagens resistentes selecionadas por pressão seletiva em ambos os estágios de vida do parasito apresentaram mutações em genes envolvidos no metabolismo de manogênio, uma família de oligossacarídeos lineares constituídos por resíduos de manose, e fosforilação de proteínas. Foi observada uma prevalência de mutações em proteínas hipotéticas (média de 355 genes nas linhagens resistentes e 4717 genes nos isolados clínicos), além de uma média de 39 e 7 variantes presentes em genes envolvidos na tradução do parasito nos isolados clínicos e linhagens resistentes, respectivamente. Sabe-se que a tradução é o alvo principal da PM em procariotos (Kotra, Haddad et al. 2000) e também em *Leishmania* (Shalev-Benami, Zhang et al. 2017). Vale ressaltar que não foram encontradas variantes em genes comuns entre todas as linhagens resistentes e isolados clínicos.

Em linhagens resistentes à PM de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* foram encontradas mutações, alterações no número de cópias e/ou expressão de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, glutatona, carboidratos e nucleotídeos; glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, transcrição, tradução, virulência, sinalização, transporte, metabolismo de lipídeos, função mitocondrial, estresse oxidativo, sobrevivência intracelular, transdução de sinal, síntese de ácidos graxos, processamento de RNA e DNA e tráfego de vesículas (Chawla, Jhingran et al. 2011, Gazanion, Fernández-Prada et al. 2016, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Shaw, Imamura et al. 2019, Vacas, Fernández-Rubio et al. 2019, Verma, Nayek et al. 2020, Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021, Ghosh, Kumar et al. 2022). Os genes *BCAT* e *D-LDH* foram encontrados superexpressos em uma linhagem resistente à PM de *L. (L.) donovani*

(Rastrojo, García-Hernández et al. 2018). Além desses genes, em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* foi encontrado uma possível correlação entre mutações presentes em regiões intergênicas que poderiam estar associadas à resistência à PM (Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021, Ghosh, Kumar et al. 2022), como aquelas localizadas nas regiões *upstream* dos genes que codificam a chaperona DnaJ (*LdBPK_181410.1*) e a aspartato aminotransferase (*LdBPK_350840.1*) (Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021).

No gene *CDPK1*, um marcador molecular de resistência à PM em *L. (L.) infantum*, foram encontradas mutações heterozigóticas em apenas duas linhagens resistentes selecionadas por mutagênese *in vitro*, PM-M5 e PM-M8. Esse gene codifica uma proteína quinase envolvida no controle da tradução e essencial para a proliferação celular do parasito (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). A inativação parcial desse gene em *L. (L.) infantum* conferiu resistência à PM, e um aumento nas taxas de tradução do parasito (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). A superexpressão de *CDPK1* tornou os parasitos mais suscetíveis, demonstrando o papel desta proteína na resistência à PM nessa espécie (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Para avaliar o potencial da *CDPK1* na resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*, foi gerada uma linhagem com apenas um dos alelos deste gene inativado, devido à sua provável essencialidade, como demonstrado em *L. (L.) infantum* (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). A inativação parcial do gene em *L. (L.) amazonensis* conferiu resistência à PM, sem alterações no perfil de proliferação e infectividade do parasito. A superexpressão do gene *CDPK1*, por sua vez, ocasionou aumento da suscetibilidade em ambos os estágios de vida do parasito. Estes resultados indicam que, assim como em *L. (L.) infantum*, a *CDPK1* está envolvida na resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*.

Além da *CDPK1*, foi avaliado o papel da proteína ribossomal L23a, envolvida na tradução do parasito e fosforilada por essa quinase. A proteína L23a foi correlacionada com a resistência aos antimoniais e à PM em *L. (L.) donovani* (Das, Shah et al. 2013, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Mutações ou a inativação de um dos alelos do gene *CDPK1* reduzem os níveis de fosforilação da L23a (Bhattacharya, Leprohon et al. 2019). Embora não tenham sido identificadas variantes nas linhagens resistentes e isolados clínicos, validamos funcionalmente o papel da L23a na resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*. Foram gerados mutantes nulos parcial e total para o gene *L23a* que se mostraram resistentes nas formas promastigota e amastigota do parasito. Diferentemente do descrito por Das et al. (2013), no qual isolados clínicos de *L. (L.) donovani* resistentes aos antimoniais apresentaram níveis da proteína L23a aumentados e resistência cruzada à PM, a linhagem superexpressora do gene *L23a* de *L. (L.)*

amazonensis foi mais sensível que a linhagem parental, enquanto a inativação gênica conferiu resistência à PM em ambos os estágios do parasito.

Além dos genes *CDPK1* e *L23a*, um dos potenciais genes identificados que podem estar associados com a suscetibilidade à PM foi uma proteína tirosina fosfatase (*PTP*), que está envolvida no metabolismo de lipídeos (Ramakrishnan, Serricchio et al. 2013). Em *T. brucei*, o ortólogo dessa proteína fosfatase está localizado no glicossomo, conforme observado no banco de dados de localização subcelular de proteínas (*Tb927.10.10610*) (<http://tryptag.org/>) (Gerber, Suppanz et al. 2023). Com função predita pelo banco de genomas de tripanossomatídeos TriTrypDB em *L. (L.) mexicana* (*LmxM.05.0280*) (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/>), pelo banco de dados KEGG em *L. (L.) donovani* (*LDBPK_050280*) (<https://www.genome.jp/kegg/>) e pelo banco de proteínas UniProt (<https://www.uniprot.org/>), essa fosfatase está envolvida na biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa e éter-lipídeos, com atividade de hidroxiaçil-CoA desidratase e liase, sendo um componente de membrana. Os glicossomos estão envolvidos em processos como a β -oxidação e alongação de ácidos graxos, metabolismo de carboidratos, biossíntese de éter-lipídeo e isoprenoides, biossíntese de pirimidina e esqualeno, vias de resgate de purinas e metabolismo de ROS (Rodrigues, Godinho et al. 2014). Em tripanossomatídeos, os glicossomos têm papel essencial na diferenciação das formas de vida do parasito e na adaptação do parasito em um novo hospedeiro (Gualdrón-López, Brennand et al. 2012). A ausência de glicossomos pode resultar na deficiência de enzimas envolvidas na síntese de éter-lipídeo e β -oxidação de ácidos graxos, importantes em alguns estágios de vida do ciclo de vida (Parsons 2004). A síntese de ácidos graxos em tripanossomatídeos pode ser realizada pelo sistema elongase, composto por enzimas que catalisam a extensão de cadeias acil, ou pelas vias de síntese *de novo* do tipo I e do tipo II, além de uma via de alongamento de ácidos graxos, que adiciona dois carbonos a uma molécula iniciadora mais longa (Ramakrishnan, Serricchio et al. 2013, Parreira de Aquino, Mendes Gomes et al. 2021). A fonte de carbono adicionada é o malonil-CoA gerado pela acetil-CoA carboxilase a partir de duas moléculas de acetil-CoA, regulando o fluxo de síntese dos ácidos graxos. A condensação descarboxilativa do malonil com o iniciador produz uma cadeia alongada por dois carbonos, reduzidos pela cetoacil redutase, desidratase e enoil redutase (Ramakrishnan, Serricchio et al. 2013). Em promastigotas de *L. (L.) major*, o LPG é ancorado por fosfoglicerídeos glicosilfosfatidilinositol (GPI) através de um éter-lipídeo. Essa ancoragem é crucial para a sobrevivência do parasito no flebotomíneo e na modulação da interação inicial com o hospedeiro mamífero (Sacks 2001, Späth, Garraway et al. 2003). Em ausência de éter-lipídeo e consequentemente LPG e outros glicoconjugados, não foram observadas alterações na viabilidade celular, porém houve impacto na transição de

formas promastigotas para amastigotas durante a infecção de macrófagos, sem afetar a virulência (Zufferey, Allen et al. 2003).

Uma vez que essa PTP é componente de membrana do parasito e está envolvida no metabolismo de éter-lipídeos que fazem a ancoragem de LPG e GPI, foi gerado um mutante parcial para o gene *PTP* de *L. (L.) amazonensis*. A deleção parcial do gene não causou alteração na proliferação de promastigotas, porém interferiu na capacidade de infecção do parasito, apresentando redução de 31% na infectividade de BMDMs. Na tentativa de inativar os dois alelos do gene, não obtivemos sucesso, demonstrando a sua essencialidade. A ausência de um dos alelos da PTP não mostrou impacto na suscetibilidade à PM na forma promastigota, mas na forma amastigota intracelular houve um aumento do valor de EC₅₀ pelo menos 4 vezes maior quando comparado com a linhagem parental T7/Cas9. O impacto da deleção dessa proteína no fenótipo de resistência à PM foi observado apenas na forma amastigota. A resistência observada pode ser explicada pela possível alteração do perfil lipídico da membrana celular, causado pela deficiência parcial da proteína no metabolismo de lipídeos, que teria impacto apenas na forma amastigota do parasito. A linhagem superexpressora do gene *PTP* não apresentou alteração no perfil de proliferação do parasito e infectividade, embora um aumento da sensibilidade à PM em ambos os estágios de vida do parasito foi observado. Também foi observada uma maior suscetibilidade ao SbIII em parasitos parcialmente nulos para o gene *PTP*. Já foi proposto que os antimoniais pentavalentes inibem a β -oxidação de ácidos graxos em *Leishmania*, além de parasitos resistentes demonstrarem alterações no metabolismo de lipídeos, indicando o potencial dessa via na resistência a esse fármaco (Berman, Gallalee et al. 1987, t'Kindt, Scheltema et al. 2010).

A proteína polipeptídeo deformilase (PDF) está envolvida no processo de tradução do parasito e o gene que codifica essa proteína apresentou três variantes em homozigose nos isolados ER256 e UB017. Em bactéria, os RNAt iniciadores da tradução são funcionais apenas quando a metionina que carregam é formilada, ou seja, quando um grupo formila é adicionado à porção N-terminal da proteína. Em muitos casos, a formil-metionina presente na região N-terminal precisa ser removida para que a proteína seja funcional (Giglione and Meinnel 2001, Giglione, Boularot et al. 2004). Contudo, as aminopeptidases que clivam a metionina N-terminal processam apenas metioninas não formiladas. Para isso, a PDF é necessária para realizar a remoção do grupo formil dessa metionina N-terminal (Giglione and Meinnel 2001, Giglione, Boularot et al. 2004). Esse processo é importante para a sobrevivência bacteriana, uma vez que proteínas maduras não retêm N-formilmietionina e as aminopeptidases N-terminais não podem utilizar peptídeos formilados como substrato (Meinnel, Mechulam et al. 1993,

Solbiati, Chapman-Smith et al. 1999). Em *Escherichia coli*, foi descrito que a PDF, além de ter atividade catalítica, também apresenta interação celular com o ribossomo bacteriano, sendo responsável pelo início do processamento das cadeias polipeptídicas nascentes (Bingel-Erlenmeyer, Kohler et al. 2008). Em *T. brucei*, a PDF está presente nas mitocôndrias e a formilação de metionina-RNA^t é crucial para o início da tradução (Bouzaidi-Tiali, Giglione et al. 2007). Conforme a função predita dessa proteína no banco de dados de tripanossomatídeos TriTrypDB, a PDF está presente apenas no citoplasma e nucleoplasma de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. Essa enzima já foi demonstrada como potencial alvo de medicamentos contra bactérias e protozoários, inclusive os tripanossomatídeos (Meinzel 2000, Giglione and Meinzel 2001, Boularot, Giglione et al. 2004, Leeds and Dean 2006, Bouzaidi-Tiali, Giglione et al. 2007).

Em *L. (L.) amazonensis*, foi gerado um mutante nulo parcial para o gene *PDF*, demonstrando que em *Leishmania* esse gene também parece ser essencial, como previamente descrito em *Mycobacterium smegmatis* (Naor, Gadot et al. 2019). Em *Leishmania*, a inativação de um dos alelos desse gene não impactou a proliferação celular no estágio promastigota, assim como sua superexpressão. Na forma promastigota, o mutante parcial para o gene *PDF* não apresentou diferença significativa de suscetibilidade e, na forma amastigota, o valor de EC₅₀ foi cerca de sete vezes maior quando comparado com a linhagem parental. O superexpressor, por sua vez, foi mais suscetível à PM em ambas as formas de vida do parasito. Uma vez que a PDF é essencial para o início da tradução e também para a função mitocondrial de *T. brucei*, presume-se que essa proteína possua a mesma função em *Leishmania*, pois a proteína PDF de *T. brucei* possui 63% de similaridade com a proteína PDF de *L. (L.) major* (Bouzaidi-Tiali, Giglione et al. 2007). É provável que a inativação de um dos alelos do gene *PDF* possa causar diminuição da formilação em *L. (L.) amazonensis* e consequentemente impacto direto na tradução do parasito. O possível aumento nas taxas de tradução ocasionada pela ausência de um dos alelos da PDF, associada ao fato de que o principal alvo de PM é a tradução do parasito, pode levar a uma compensação da ação dessa enzima por mutações em outros genes, que podem contornar a necessidade desse processo no início da tradução, fazendo com o que parasito se torne resistente ao antibiótico, como ocorre em *Salmonella enterica* resistente à actinonina, um antibiótico natural e inibidor de PDF (Chen, Patel et al. 2000, Nilsson, Zorzet et al. 2006).

Por fim, as variantes presentes no gene RNAr metiltransferase (*rMETTL*) de duas linhagens resistentes selecionadas por mutagênese *in vitro* também foram validadas funcionalmente. A RNAr metiltransferase de procariotos está envolvida no processo de modificação do RNAr nos estágios da montagem e maturação das subunidades ribossômicas (Gu, Gustafsson et al. 1999, Lesnyak, Sergiev et al. 2006, Sergeeva, Bogdanov et al. 2015). A

deleção deste gene em procariotos resulta no aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo, além de comprometer a virulência e aumentar a sensibilidade a outros AGs, como PM (Kyuma, Kizaki et al. 2015, Zou, Zhang et al. 2018). Em *L. (L.) amazonensis*, foi obtido um mutante nulo para o gene *rMETTL*, que demonstrou uma discreta diferença na proliferação na forma promastigota quando comparado com a linhagem parental, assim como a linhagem superexpressora deste gene. Diferentemente do demonstrado em bactéria (Zou, Zhang et al. 2018), a deleção do gene *rMETTL* tornou os parasitos resistentes à PM em ambos os estágios do parasito, enquanto que a linhagem superexpressora foi altamente suscetível à PM em ambos os estágios. Como essa metiltransferase está envolvida na modificação do RNAr, a hipótese é de que, em ausência da metilação em regiões como o centro de decodificação, região na qual os AGs se ligam, a fidelidade da tradução pode ser afetada. Essa alteração pode levar ao aumento das taxas de tradução e consequentemente acarretar na resistência. A inativação de *rMETTL*, assim como os demais genes, fez com que os parasitos se tornassem suscetíveis ao SbIII. Linhagens resistentes aos antimoniais têm apresentado expressão diferencial de proteínas ribossomais, proteínas envolvidas na tradução e reprogramação traducional, sugerindo que a síntese proteica seja um provável alvo desses fármacos (Brotherton, Bourassa et al. 2013, Das, Shah et al. 2013, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Gutierrez Guarnizo, Tikhonova et al. 2023).

Os dados apresentados nesse estudo, em concordância com estudos anteriores em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (Chawla, Jhingran et al. 2011, Gazanion, Fernández-Prada et al. 2016, Rastrojo, García-Hernández et al. 2018, Bhattacharya, Leprohon et al. 2019, Shaw, Imamura et al. 2019, Vacas, Fernández-Rubio et al. 2019, Verma, Nayek et al. 2020, Hendrickx, Reis-Cunha et al. 2021, Ghosh, Kumar et al. 2022), sugerem que os mecanismos de ação e resistência à PM são multifatoriais. De acordo com os resultados obtidos a partir das linhagens resistentes e dos isolados clínicos, o tráfego de vesículas, a tradução e o metabolismo de lipídeos são potenciais processos envolvidos na suscetibilidade e resistência à PM em *Leishmania* spp. Estudos de interactoma dos produtos gênicos dos genes identificados e validados funcionalmente nesse trabalho podem ser úteis para avaliar a atuação individual ou conjunta dessas proteínas. A identificação dos mecanismos de ação e resistência a esse fármaco poderão contribuir para a identificação de marcadores moleculares que podem predizer um melhor prognóstico para a resposta clínica ao tratamento, possibilitando a melhor definição do esquema terapêutico do paciente. Por fim, esses resultados podem contribuir para o desenvolvimento de novos e mais específicos derivados de AGs para o tratamento das leishmanioses no Brasil, especialmente a LT.

6. Conclusão

Através da caracterização fenotípica *in vitro* e *in vivo* de linhagens resistentes à PM selecionadas *in vitro*, assim como dos isolados clínicos altamente suscetíveis à PM, e pela identificação e validação funcional de genes associados com a suscetibilidade e resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*, podemos concluir que:

- As linhagens resistentes à PM selecionadas por mutagênese *in vitro* e pressão seletiva nas formas promastigota e amastigota intracelular apresentaram resistência à PM em um ou ambos os estágios de vida do parasito;
- A linhagem resistente PM-P2 selecionada por pressão seletiva no estágio promastigota teve o *fitness* impactado, comprometendo a proliferação dos promastigotas e a infectividade *in vitro* e *in vivo* no hospedeiro mamífero;
- A resistência à PM em linhagens resistentes selecionadas por pressão seletiva é transitória, demonstrando tendência à perda do fenótipo de resistência quando os parasitos são cultivados em ausência do fármaco;
- Camundongos infectados com a linhagem resistente selecionada por pressão seletiva na forma amastigota, PM-A1, e tratados com PM, foram parcialmente refratários ao tratamento;
- Linhagens resistentes à PM e isolados altamente suscetíveis ao fármaco acumularam mais PM fluorescente do que a cepa M2269, indicando que os mecanismos de suscetibilidade e resistência à PM são distintos;
- Isolados clínicos apresentaram maior número de vesículas intracelulares quando comparados com a cepa M2269, enquanto as linhagens resistentes à PM apresentaram menor número, indicando um possível papel do tráfego de vesículas na suscetibilidade e resistência ao fármaco em *L. (L.) amazonensis*;
- Os isolados clínicos apresentaram alterações no número de cópias dos cromossomos 3, 12, 23 e 26. As linhagens resistentes selecionadas por pressão seletiva demonstraram alterações no número de cópias dos cromossomos 3, 6 e 15, enquanto as linhagens selecionadas por mutagênese *in vitro* não apresentaram mudanças no número de cópias dos 34 cromossomos de *L. (L.) amazonensis*;
- Para os isolados ER256 e UB017, foram identificadas variantes em genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, transporte, tradução, fosforilação de proteínas e regulação pós-transcricional da expressão gênica;

- Para as linhagens resistentes à PM, foram identificadas variantes em genes envolvidos na tradução, biossíntese de arginina, fosforilação e desfosforilação de proteínas, metilação de RNA e metabolismo de manogênio;
- Os produtos dos genes *CDPK1* e *L23a* estão envolvidos na resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*;
- Os genes *PTP*, *PDF* e *rMETTL* foram funcionalmente validados e associados à suscetibilidade e resistência à PM em *L. (L.) amazonensis*.

7. Referências bibliográficas

Abdi Ghavidel, A., V. Jajarmi, M. Bandehpour and B. Kazemi (2022). "Polycistronic Expression of Multi-Subunit Complexes in the Eukaryotic Environment: A Narrative Review." Iran J Parasitol **17**(3): 286-295.

Abdoli, A., N. Maspi and F. Ghaffarifar (2017). "Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β ." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **51**: 15-26.

Adaui, V., L. F. Lye, N. S. Akopyants, M. Zimic, A. Llanos-Cuentas, L. Garcia, I. Maes, S. De Doncker, D. E. Dobson, J. Arevalo, J. C. Dujardin and S. M. Beverley (2016). "Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia." J Infect Dis **213**(1): 112-121.

Adl, S. M., D. Bass, C. E. Lane, J. Lukeš, C. L. Schoch, A. Smirnov, S. Agatha, C. Berney, M. W. Brown, F. Burki, P. Cárdenas, I. Čepička, L. Chistyakova, J. Del Campo, M. Dunthorn, B. Edvardsen, Y. Eglit, L. Guillou, V. Hampl, A. A. Heiss, M. Hoppenrath, T. Y. James, A. Karnkowska, S. Karpov, E. Kim, M. Kolisko, A. Kudryavtsev, D. J. G. Lahr, E. Lara, L. Le Gall, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. Massana, E. A. D. Mitchell, C. Morrow, J. S. Park, J. W. Pawlowski, M. J. Powell, D. J. Richter, S. Rueckert, L. Shadwick, S. Shimano, F. W. Spiegel, G. Torruella, N. Youssef, V. Zlatogursky and Q. Zhang (2019). "Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes." J Eukaryot Microbiol **66**(1): 4-119.

Adler-Moore, J. P., J. P. Gangneux and P. G. Pappas (2016). "Comparison between liposomal formulations of amphotericin B." Med Mycol **54**(3): 223-231.

Ait Maatallah, I., K. Akarid and M. Lemrani (2022). "Tissue tropism: Is it an intrinsic characteristic of *Leishmania* species?" Acta Trop **232**: 106512.

Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votýpka, P. Marty, P. Delaunay and D. Sereno (2016). "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies." PLoS Negl Trop Dis **10**(3): e0004349.

Alpizar-Sosa, E. A., N. R. B. Ithnin, W. Wei, A. W. Pountain, S. K. Weidt, A. M. Donachie, R. Ritchie, E. A. Dickie, R. J. S. Burchmore, P. W. Denny and M. P. Barrett (2022). "Amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*: Alterations to sterol metabolism and oxidative stress response." PLoS Negl Trop Dis **16**(9): e0010779.

Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Cañavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. López-Vélez and J. Moreno (2008). "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years." Clin Microbiol Rev **21**(2): 334-359, table of contents.

Alvar, J., C. Cañavate, B. Gutiérrez-Solar, M. Jiménez, F. Laguna, R. López-Vélez, R. Molina and J. Moreno (1997). "*Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years." Clin Microbiol Rev **10**(2): 298-319.

Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin and M. den Boer (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.

Amato, V. S., F. F. Tuon, H. A. Bacha, V. A. Neto and A. C. Nicodemo (2008). "Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment." Acta Trop **105**(1): 1-9.

Andrade, M. S., O. Courtenay, M. E. Brito, F. G. Carvalho, A. W. Carvalho, F. Soares, S. M. Carvalho, P. L. Costa, R. Zampieri, L. M. Floeter-Winter, J. J. Shaw and S. P. Brandão-Filho (2015). "Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania (Viannia) braziliensis*." PLoS Negl Trop Dis **9**(10): e0004137.

Aronson, N., B. L. Herwaldt, M. Libman, R. Pearson, R. Lopez-Velez, P. Weina, E. Carvalho, M. Ephros, S. Jeronimo and A. Magill (2017). "Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH)." Am J Trop Med Hyg **96**(1): 24-45.

Ashford, R. W. (1996). "Leishmaniasis reservoirs and their significance in control." Clin Dermatol **14**(5): 523-532.

Assis, L. H. C., D. Andrade-Silva, M. E. Shiburah, B. C. D. de Oliveira, S. C. Paiva, B. E. Abuchery, Y. G. Ferri, V. S. Fontes, L. S. de Oliveira, M. S. da Silva and M. I. N. Cano (2021). "Cell Cycle, Telomeres, and Telomerase in *Leishmania* spp.: What Do We Know So Far?" Cells **10**(11).

B, S. L. F. d. S., A. M. Rezende, O. P. Melo Neto, M. E. F. Brito and S. P. Brandão Filho (2019). "Identification of divergent *Leishmania (Viannia) braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through whole genome analysis." PLoS Negl Trop Dis **13**(6): e0007382.

Bahrami, A., M. Mohebbali, H. Reisi Nafchi, R. Raoofian, E. Kazemirad and H. Hajjarian (2022). "Overexpression of Iron Super Oxide Dismutases A/B Genes Are Associated with Antimony Resistance of *Leishmania tropica* Clinical Isolates." Iran J Parasitol **17**(4): 473-482.

Bansal, R., S. S. Sen, R. Muthuswami and R. Madhubala (2020). "Stigmasterol as a potential biomarker for amphotericin B resistance in *Leishmania donovani*." J Antimicrob Chemother **75**(4): 942-950.

Barratt, G., M. Saint-Pierre-Chazalet and P. M. Loiseau (2009). "Cellular transport and lipid interactions of miltefosine." Curr Drug Metab **10**(3): 247-255.

Barrett, M. P., D. E. Kyle, L. D. Sibley, J. B. Radke and R. L. Tarleton (2019). "Protozoan persister-like cells and drug treatment failure." Nat Rev Microbiol **17**(10): 607-620.

Basselin, M., M. A. Badet-Denisot, F. Lawrence and M. Robert-Gero (1997). "Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*." Exp Parasitol **85**(3): 274-282.

Basselin, M., G. H. Coombs and M. P. Barrett (2000). "Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **109**(1): 37-46.

Basselin, M. and M. Robert-Gero (1998). "Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*." Parasitol Res **84**(1): 78-83.

Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." Int J Parasitol **37**(10): 1097-1106.

Batista, M. F., C. A. Nájera, I. Meneghelli and D. Bahia (2020). "The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival." Front Cell Dev Biol **8**: 396.

Beattie, L. and P. M. Kaye (2011). "*Leishmania*-host interactions: what has imaging taught us?" Cell Microbiol **13**(11): 1659-1667.

Becvar, T., B. Vojtkova, P. Siriyasatien, J. Votypka, D. Modry, P. Jahn, P. Bates, S. Carpenter, P. Volf and J. Sadlova (2021). "Experimental transmission of *Leishmania* (*Mundinia*) parasites by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae)." PLoS Pathog **17**(6): e1009654.

Belli, S. I. (2000). "Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids." Int J Parasitol **30**(6): 679-687.

Ben Salah, A., N. Ben Messaoud, E. Guedri, A. Zaatour, N. Ben Alaya, J. Bettaieb, A. Gharbi, N. Belhadj Hamida, A. Boukthir, S. Chlif, K. Abdelhamid, Z. El Ahmadi, H. Louzir, M. Mokni, G. Morizot, P. Buffet, P. L. Smith, K. M. Kopydlowski, M. Kreishman-Deitrick, K. S. Smith, C. J. Nielsen, D. R. Ullman, J. A. Norwood, G. D. Thorne, W. F. McCarthy, R. C. Adams, R. M. Rice, D. Tang, J. Berman, J. Ransom, A. J. Magill and M. Groggl (2013). "Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis." N Engl J Med **368**(6): 524-532.

Beneke, T., R. Madden, L. Makin, J. Valli, J. Sunter and E. Gluenz (2017). "A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids." R Soc Open Sci **4**(5): 170095.

- Benkova, I. and P. Volf (2007). "Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae)." J Med Entomol **44**(1): 150-154.
- Berman, J. D., J. V. Gallalee and J. M. Best (1987). "Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes." Biochem Pharmacol **36**(2): 197-201.
- Bern, C., J. H. Maguire and J. Alvar (2008). "Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **2**(10): e313.
- Bhandari, V., S. Sundar, J. C. Dujardin and P. Salotra (2014). "Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother **58**(5): 2580-2585.
- Bhattacharya, A., P. Leprohon, S. Bigot, P. K. Padmanabhan, A. Mukherjee, G. Roy, H. Gingras, A. Mestdagh, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2019). "Coupling chemical mutagenesis to next generation sequencing for the identification of drug resistance mutations in *Leishmania*." Nat Commun **10**(1): 5627.
- Bhattacharya, S. K., T. K. Jha, S. Sundar, C. P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, K. Junge, J. Karbwang, A. D. Bryceson and J. D. Berman (2004). "Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India." Clin Infect Dis **38**(2): 217-221.
- Bigot, S., P. Leprohon and M. Ouellette (2023). "Delving in folate metabolism in the parasite *Leishmania major* through a chemogenomic screen and methotrexate selection." PLoS Negl Trop Dis **17**(6): e0011458.
- Bingel-Erlenmeyer, R., R. Kohler, G. Kramer, A. Sandikci, S. Antolić, T. Maier, C. Schaffitzel, B. Wiedmann, B. Bukau and N. Ban (2008). "A peptide deformylase-ribosome complex reveals mechanism of nascent chain processing." Nature **452**(7183): 108-111.
- Boozhmehrani, M. J., G. Eslami, A. Khamesipour, A. A. Jafari, M. Vakili, S. S. Hosseini and V. Askari (2022). "The role of ATP-binding cassette transporter genes expression in treatment failure cutaneous leishmaniasis." AMB Express **12**(1): 78.
- Boularot, A., C. Giglione, I. Artaud and T. Meinnel (2004). "Structure-activity relationship analysis and therapeutic potential of peptide deformylase inhibitors." Curr Opin Investig Drugs **5**(8): 809-822.
- Bourreau, E., M. Ginouves, G. Prévot, M. A. Hartley, J. P. Gangneux, F. Robert-Gangneux, J. Dufour, D. Sainte-Marie, A. Bertolotti, F. Pratlong, R. Martin, F. Schütz, P. Couppié, N. Fasel and C. Ronet (2016). "Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse." J Infect Dis **213**(1): 105-111.

Bouzaidi-Tiali, N., C. Giglione, Y. Bulliard, M. Pusnik, T. Meinnel and A. Schneider (2007). "Type 3 peptide deformylases are required for oxidative phosphorylation in *Trypanosoma brucei*." Mol Microbiol **65**(5): 1218-1228.

Brandão-Filho, S. P., M. E. Brito, F. G. Carvalho, E. A. Ishikawa, E. Cupolillo, L. Floeter-Winter and J. J. Shaw (2003). "Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg **97**(3): 291-296.

Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang and D. M. Mosser (1995). "Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis." J Immunol **155**(6): 3102-3111.

Britto, C., C. Ravel, P. Bastien, C. Blaineau, M. Pagès, J. P. Dedet and P. Wincker (1998). "Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes." Gene **222**(1): 107-117.

Brotherton, M. C., S. Bourassa, P. Leprohon, D. Légaré, G. G. Poirier, A. Droit and M. Ouellette (2013). "Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant." PLoS One **8**(11): e81899.

Buermans, H. P. and J. T. den Dunnen (2014). "Next generation sequencing technology: Advances and applications." Biochim Biophys Acta **1842**(10): 1932-1941.

Burchmore, R. J. and M. P. Barrett (2001). "Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes." Int J Parasitol **31**(12): 1311-1320.

Burza, S., S. L. Croft and M. Boelaert (2018). "Leishmaniasis." Lancet **392**(10151): 951-970.

Bussotti, G., E. Gouzelou, M. Côrtes Boité, I. Kherachi, Z. Harrat, N. Eddaikra, J. C. Mottram, M. Antoniou, V. Christodoulou, A. Bali, F. Z. Guerfali, D. Laouini, M. Mukhtar, F. Dumetz, J. C. Dujardin, D. Smirlis, P. Lechat, P. Pescher, A. El Hamouchi, M. Lemrani, C. Chicharro, I. P. Llanes-Acevedo, L. Botana, I. Cruz, J. Moreno, F. Jeddi, K. Aoun, A. Bouratbine, E. Cupolillo and G. F. Späth (2018). "*Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification." mBio **9**(6).

Buxbaum, L. U. (2013). "*Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans." PLoS Negl Trop Dis **7**(5): e2224.

Callahan, H. L., I. F. Portal, S. J. Bensinger and M. Groggl (1996). "Leishmania spp: temperature sensitivity of promastigotes *in vitro* as a model for tropism *in vivo*." Exp Parasitol **84**(3): 400-409.

Camacho, E., A. Rastrojo, Á. Sanchiz, S. González-de la Fuente, B. Aguado and J. M. Requena (2019). "Leishmania Mitochondrial Genomes: Maxicircle Structure and Heterogeneity of Minicircles." Genes (Basel) **10**(10).

Camara, L., J. Queirós, R. Ribeiro and E. Teófilo (2019). "Meglumine antimoniate combination treatment for relapsing Kala-azar after treatment and secondary prophylaxis failure with liposomal amphotericin B in two HIV-coinfected patients." BMJ Case Rep **12**(12).

Cameron, M. M., F. A. Pessoa, A. W. Vasconcelos and R. D. Ward (1995). "Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil." Med Vet Entomol **9**(3): 263-272.

Cantacessi, C., F. Dantas-Torres, M. J. Nolan and D. Otranto (2015). "The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics." Trends Parasitol **31**(3): 100-108.

Cantanhêde, L. M., C. B. Mattos, C. de Souza Ronconi, C. P. B. Filgueira, C. F. da Silva Júnior, C. Limeira, H. P. de Jesus Silva, G. E. M. Ferreira, R. Porrozzi, R. G. M. Ferreira and E. Cupolillo (2019). "First report of *Leishmania (Viannia) lindenbergi* causing tegumentary leishmaniasis in the Brazilian western Amazon region." Parasite **26**: 30.

Cardoso, C. A., G. V. Araujo, C. M. Sandoval, P. M. Nogueira, C. Zúñiga, W. H. Sosa-Ochoa, M. D. Laurenti and R. P. Soares (2020). "Lipophosphoglycans from dermatropic *Leishmania infantum* are more pro-inflammatory than those from viscerotropic strains." Mem Inst Oswaldo Cruz **115**: e200140.

Cardoso, R. M., N. N. de Araújo, G. A. Romero, T. T. Souza, A. G. Dietrich, J. D. Mendes, M. L. Reis, J. B. Ferreira, M. M. Hecht and R. Gurgel-Gonçalves (2015). "Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah." Parasit Vectors **8**: 171.

Castanys-Muñoz, E., N. Alder-Baerens, T. Pomorski, F. Gamarro and S. Castanys (2007). "A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids." Mol Microbiol **64**(5): 1141-1153.

Castanys-Muñoz, E., J. M. Pérez-Victoria, F. Gamarro and S. Castanys (2008). "Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement." Antimicrob Agents Chemother **52**(10): 3573-3579.

Castro, E. A., V. Thomaz-Soccol, C. Augur and E. Luz (2007). "*Leishmania (Viannia) braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil)." Exp Parasitol **117**(1): 13-21.

Cecílio, P., A. Cordeiro-da-Silva and F. Oliveira (2022). "Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites." Commun Biol **5**(1): 305.

Chakraborti, D., M. M. Rahman, M. Murrill, R. Das, Siddayya, S. G. Patil, A. Sarkar, H. J. Dadapeer, S. Yendigeri, R. Ahmed and K. K. Das (2013). "Environmental arsenic contamination and its health effects in a historic gold mining area of the Mangalur greenstone belt of Northeastern Karnataka, India." J Hazard Mater **262**: 1048-1055.

Chawla, B., A. Jhingran, A. Panigrahi, K. D. Stuart and R. Madhubala (2011). "Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*." PLoS One **6**(10): e26660.

Chen, D. Z., D. V. Patel, C. J. Hackbarth, W. Wang, G. Dreyer, D. C. Young, P. S. Margolis, C. Wu, Z. J. Ni, J. Trias, R. J. White and Z. Yuan (2000). "Actinonin, a naturally occurring antibacterial agent, is a potent deformylase inhibitor." Biochemistry **39**(6): 1256-1262.

Chrusciak-Talhari, A., R. Dietze, C. Chrusciak Talhari, R. M. da Silva, E. P. Gadelha Yamashita, G. de Oliveira Penna, P. R. Lima Machado and S. Talhari (2011). "Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil." Am J Trop Med Hyg **84**(2): 255-260.

Clark, D. P., Pazdernik, N. J., McGehee, M. R. (2019). "Mutations and repair." In: Molecular Biology. Academic Cell, 26, 832-879

Clayton, C. and M. Shapira (2007). "Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias." Mol Biochem Parasitol **156**(2): 93-101.

Coelho, A. C., S. M. Beverley and P. C. Cotrim (2003). "Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 83-90.

Coelho, A. C., L. G. Gentil, J. F. da Silveira and P. C. Cotrim (2008). "Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine." Exp Parasitol **120**(1): 98-102.

Coelho, A. C., N. Messier, M. Ouellette and P. C. Cotrim (2007). "Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes." Antimicrob Agents Chemother **51**(8): 3030-3032.

Coelho, A. C., C. T. Trinconi, C. H. Costa and S. R. Uliana (2014). "In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **8**(7): e2999.

Coelho, A. C., C. T. Trinconi, L. Senra, J. K. Yokoyama-Yasunaka and S. R. Uliana (2015). "Leishmania is not prone to develop resistance to tamoxifen." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **5**(3): 77-83.

Cojean, S., S. Houzé, D. Haouchine, F. Huteau, S. Lariven, V. Hubert, F. Michard, C. Bories, F. Pratlong, J. Le Bras, P. M. Loiseau and S. Matheron (2012). "Leishmania resistance to miltefosine associated with genetic marker." Emerg Infect Dis **18**(4): 704-706.

Colwell, D. D., F. Dantas-Torres and D. Otranto (2011). "Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives." Vet Parasitol **182**(1): 14-21.

Coser, E. M., B. A. Ferreira, N. Branco, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2020). "Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility in vitro and the treatment outcome in vivo." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **14**: 91-98.

Coser, E. M., B. A. Ferreira, E. H. Yamashiro-Kanashiro, J. A. L. Lindoso and A. C. Coelho (2021). "Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of *Leishmania* species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil." Acta Trop **215**: 105806.

Cota, G. F., M. R. de Sousa, A. L. de Mendonça, A. Patrocinio, L. S. Assunção, S. R. de Faria and A. Rabello (2014). "Leishmania-HIV co-infection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil." PLoS Negl Trop Dis **8**(4): e2816.

Croft, S. L. and P. Olliaro (2011). "Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities." Clin Microbiol Infect **17**(10): 1478-1483.

Croft, S. L., S. Sundar and A. H. Fairlamb (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.

da Silva, M. S. (2021). "DNA Double-Strand Breaks: A Double-Edged Sword for Trypanosomatids." Front Cell Dev Biol **9**: 669041.

Da Silva, R. P., B. F. Hall, K. A. Joiner and D. L. Sacks (1989). "CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages." J Immunol **143**(2): 617-622.

Damasceno, J. D., L. R. O. Tosi, R. Santos and J. C. Mottram (2019). "DiCre-Based Inducible Gene Expression." Methods Mol Biol **1971**: 225-235.

Dantas-Torres, F. (2007). "The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*." Vet Parasitol **149**(3-4): 139-146.

Dantas-Torres, F. (2009). "Canine leishmaniosis in South America." Parasit Vectors **2 Suppl 1**(Suppl 1): S1.

Das, S., P. Shah, R. K. Baharia, R. Tandon, P. Khare, S. Sundar, A. A. Sahasrabuddhe, M. I. Siddiqi and A. Dube (2013). "Over-expression of 60s ribosomal L23a is associated with cellular proliferation in SAG resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*." PLoS Negl Trop Dis **7**(12): e2527.

Davidson, R. N., M. den Boer and K. Ritmeijer (2009). "Paromomycin." Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(7): 653-660.

de Freitas, T. P., P. S. D'Andrea, D. A. de Paula, L. Nakazato, V. Dutra, C. R. Bonvicino, B. de Almeida Ado, C. Boa-Sorte Eda and V. R. Sousa (2012). "Natural infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in *Mus musculus* captured in Mato Grosso, Brazil." Vector Borne Zoonotic Dis **12**(1): 81-83.

de Groot, J. C., F. Meeuwssen, W. E. Ruizendaal and J. E. Veldman (1990). "Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea." Hear Res **50**(1-2): 35-42.

De Lima, H., Z. De Guglielmo, A. Rodríguez, J. Convit and N. Rodriguez (2002). "Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(2): 169-174.

Dean, S., J. Sunter, R. J. Wheeler, I. Hodgkinson, E. Gluenz and K. Gull (2015). "A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids." Open Biol **5**(1): 140197.

Decuypere, S., S. Rijal, V. Yardley, S. De Doncker, T. Laurent, B. Khanal, F. Chappuis and J. C. Dujardin (2005). "Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal." Antimicrob Agents Chemother **49**(11): 4616-4621.

Dedet, J. P., F. X. Pajot, P. Desjeux, P. Goyot, J. P. Chippaux and B. Geoffroy (1985). "Natural hosts of *Leishmania mexicana amazonensis* Lainson and Shaw, 1972 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in French Guiana." Trans R Soc Trop Med Hyg **79**(3): 302-305.

Deep, D. K., R. Singh, V. Bhandari, A. Verma, V. Sharma, S. Wajid, S. Sundar, V. Ramesh, J. C. Dujardin and P. Salotra (2017). "Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress." PLoS Negl Trop Dis **11**(6): e0005641.

Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan." J Exp Med **185**(12): 2061-2068.

Diro, E., S. Blesson, T. Edwards, K. Ritmeijer, H. Fikre, H. Admassu, A. Kibret, S. J. Ellis, C. Bardonneau, E. E. Zijlstra, P. Soipei, B. Mutinda, R. Omollo, R. Kimutai, G. Omwalo, M. Wasunna, F. Tadesse, F. Alves, N. Strub-Wourgaft, A. Hailu, N. Alexander and J. Alvar (2019). "A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia." PLoS Negl Trop Dis **13**(1): e0006988.

Docampo, R. and S. N. Moreno (2001). "The acidocalcisome." Mol Biochem Parasitol **114**(2): 151-159.

Dorlo, T. P., M. Balasegaram, J. H. Beijnen and P. J. de Vries (2012). "Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis." J Antimicrob Chemother **67**(11): 2576-2597.

Dostálová, A. and P. Volf (2012). "*Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview." Parasit Vectors **5**: 276.

Downing, T., H. Imamura, S. Decuypere, T. G. Clark, G. H. Coombs, J. A. Cotton, J. D. Hilley, S. de Doncker, I. Maes, J. C. Mottram, M. A. Quail, S. Rijal, M. Sanders, G. Schönian, O. Stark, S. Sundar, M. Vanaerschot, C. Hertz-Fowler, J. C. Dujardin and M. Berriman (2011). "Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance." Genome Res **21**(12): 2143-2156.

Duncan, S. M., N. G. Jones and J. C. Mottram (2017). "Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite." Mol Biochem Parasitol **216**: 30-38.

Duncan, S. M., E. Myburgh, E. V. Alves-Ferreira and J. C. Mottram (2019). "DiCre-Based Inducible Disruption of *Leishmania* Genes." Methods Mol Biol **1971**: 211-224.

Duncan, S. M., E. Myburgh, C. Philippon, E. Brown, M. Meissner, J. Brewer and J. C. Mottram (2016). "Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation." Mol Microbiol **100**(6): 931-944.

Eichenberger, A., A. E. Buechi, A. Neumayr, C. Hatz, A. Rauch, M. Huguenot, E. Diamantis-Karamitopoulou and C. Staehelin (2017). "A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure." BMC Infect Dis **17**(1): 81.

el-On, J., S. Halevy, M. H. Grunwald and L. Weinrauch (1992). "Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study." J Am Acad Dermatol **27**(2 Pt 1): 227-231.

Ellis, D. (2002). "Amphotericin B: spectrum and resistance." J Antimicrob Chemother **49 Suppl 1**: 7-10.

Erguler, K., I. Pontiki, G. Zittis, Y. Proestos, V. Christodoulou, N. Tsirigotakis, M. Antoniou, O. E. Kasap, B. Alten and J. Lelieveld (2019). "A climate-driven and field data-assimilated population dynamics model of sand flies." Sci Rep **9**(1): 2469.

Espada, C. R., A. Albuquerque-Wendt, V. Hornillos, E. Gluenz, A. C. Coelho and S. R. B. Uliana (2021). "Ros3 (Lem3p/CDC50) Gene Dosage Is Implicated in Miltefosine Susceptibility in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Clinical Isolates and in *Leishmania (Leishmania) major*." ACS Infect Dis **7**(4): 849-858.

Fagundes-Silva, G. A., G. A. Romero, E. Cupolillo, E. P. Yamashita, A. Gomes-Silva, J. A. Guerra and A. M. Da-Cruz (2015). "*Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected?" Mem Inst Oswaldo Cruz **110**(6): 797-800.

Fan-Minogue, H. and D. M. Bedwell (2008). "Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity." Rna **14**(1): 148-157.

Fernández-García, M., I. Mesquita, C. Ferreira, M. Araújo, B. Saha, M. F. Rey-Stolle, A. García, R. Silvestre and C. Barbas (2023). "*Leishmania donovani* Induces Multiple Dynamic Responses in the Metabolome Associated with Amastigote Differentiation and Maturation Inside the Human Macrophage." J Proteome Res **22**(7): 2256-2270.

Fernández, M. M., E. L. Malchiodi and I. D. Algranati (2011). "Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells." Antimicrob Agents Chemother **55**(1): 86-93.

Ferreira, B. A., T. F. C. Martins, E. M. Coser, L. O. V. da, E. H. Yamashiro-Kanashiro, M. C. Rocha, M. M. Pinto, P. C. Cotrim and A. C. Coelho (2022). "Isolation, typing, and drug susceptibility of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolates from dogs of the municipality of Embu das Artes, an endemic region for canine leishmaniasis in Brazil." Parasitol Res **121**(9): 2683-2695.

Ferreira Cdos, S., P. S. Martins, C. Demicheli, C. Brochu, M. Ouellette and F. Frézard (2003). "Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione." Biometals **16**(3): 441-446.

Fiebig, M., S. Kelly and E. Gluenz (2015). "Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates." PLoS Pathog **11**(10): e1005186.

- Fong, D., M. M. Chan, R. Rodriguez, L. J. Gately, J. D. Berman and M. Grogil (1994). "Paromomycin resistance in *Leishmania tropica*: lack of correlation with mutation in the small subunit ribosomal RNA gene." Am J Trop Med Hyg **51**(6): 758-766.
- Freitas Castro, F., P. C. Ruy, K. Nogueira Zeviani, R. Freitas Santos, J. Simões Toledo and A. Kaysel Cruz (2017). "Evidence of putative non-coding RNAs from *Leishmania* untranslated regions." Mol Biochem Parasitol **214**: 69-74.
- Frézard, F., C. Demicheli and R. R. Ribeiro (2009). "Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs." Molecules **14**(7): 2317-2336.
- Galati, E. A. B. (2019). Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). *Classificação e identificação de táxons das Américas, 1*, 1-133.
- García-Hernández, R., J. I. Manzano, S. Castanys and F. Gamarro (2012). "*Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations." PLoS Negl Trop Dis **6**(12): e1974.
- García-Sánchez, S., M. P. Sánchez-Cañete, F. Gamarro and S. Castanys (2014). "Functional role of evolutionarily highly conserved residues, N-glycosylation level and domains of the *Leishmania* miltefosine transporter-Cdc50 subunit." Biochem J **459**(1): 83-94.
- Garg, R., N. Trudel and M. J. Tremblay (2007). "Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells." Trends Parasitol **23**(7): 317-324.
- Gazanion, É., C. Fernández-Prada, B. Papadopoulou, P. Leprohon and M. Ouellette (2016). "Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(21): E3012-3021.
- Gebel, T. (1997). "Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology." Chem Biol Interact **107**(3): 131-144.
- Gerber, M., I. Suppanz, S. Oeljeklaus, M. Niemann, S. Käser, B. Warscheid, A. Schneider and C. E. Dewar (2023). "A Msp1-containing complex removes orphaned proteins in the mitochondrial outer membrane of *T. brucei*." Life Sci Alliance **6**(11).
- Ghosh, S., V. Kumar, A. Verma, T. Sharma, D. Pradhan, A. Selvapandiyani, P. Salotra and R. Singh (2022). "Genome-wide analysis reveals allelic variation and chromosome copy number variation in paromomycin-resistant *Leishmania donovani*." Parasitol Res **121**(11): 3121-3132.
- Giardini, M. A., M. Segatto, M. S. da Silva, V. S. Nunes and M. I. Cano (2014). "Telomere and telomerase biology." Prog Mol Biol Transl Sci **125**: 1-40.
- Gigliione, C., A. Boularot and T. Meinel (2004). "Protein N-terminal methionine excision." Cell Mol Life Sci **61**(12): 1455-1474.

Giglione, C. and T. Meinnel (2001). "Peptide deformylase as an emerging target for antiparasitic agents." Expert Opin Ther Targets **5**(1): 41-57.

Goad, L. J., G. G. Holz, Jr. and D. H. Beach (1984). "Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis." Mol Biochem Parasitol **10**(2): 161-170.

Goes, W. M., C. R. F. Brasil, J. L. Reis-Cunha, A. Coqueiro-Dos-Santos, V. Grazielle-Silva, J. de Souza Reis, T. C. Souto, M. F. Laranjeira-Silva, D. C. Bartholomeu, A. P. Fernandes and S. M. R. Teixeira (2023). "Complete assembly, annotation of virulence genes and CRISPR editing of the genome of *Leishmania amazonensis* PH8 strain." Genomics **115**(5): 110661.

Gómez, M. A. and M. Olivier (2010). "Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction: paving the road for pathogenesis." Virulence **1**(4): 314-318.

Gómez Pérez, V., R. García-Hernandez, V. Corpas-López, A. M. Tomás, J. Martín-Sanchez, S. Castanys and F. Gamarro (2016). "Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **6**(2): 133-139.

González-de la Fuente, S., R. Peiró-Pastor, A. Rastrojo, J. Moreno, F. Carrasco-Ramiro, J. M. Requena and B. Aguado (2017). "Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and *de novo* assembly into 36 contigs." Sci Rep **7**(1): 18050.

Goodwin, S., J. Gurtowski, S. Ethe-Sayers, P. Deshpande, M. C. Schatz and W. R. McCombie (2015). "Oxford Nanopore sequencing, hybrid error correction, and *de novo* assembly of a eukaryotic genome." Genome Res **25**(11): 1750-1756.

Goodwin, S., J. D. McPherson and W. R. McCombie (2016). "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies." Nat Rev Genet **17**(6): 333-351.

Goto, H. and J. A. Lindoso (2010). "Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Expert Rev Anti Infect Ther **8**(4): 419-433.

Gourbal, B., N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B. P. Rosen and R. Mukhopadhyay (2004). "Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin." J Biol Chem **279**(30): 31010-31017.

Gradoni, L. and M. Gramiccia (1994). "*Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status?" Parasitol Today **10**(7): 264-267.

Gradoni, L., M. Gramiccia and A. Scalone (2004). "[Change in human visceral leishmaniasis treatment in Italy: retrospective study of 630 patients]." Parassitologia **46**(1-2): 199-201.

Grünebast, J. and J. Clos (2020). "*Leishmania*: Responding to environmental signals and challenges without regulated transcription." Comput Struct Biotechnol J **18**: 4016-4023.

Gu, X. R., C. Gustafsson, J. Ku, M. Yu and D. V. Santi (1999). "Identification of the 16S rRNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*." Biochemistry **38**(13): 4053-4057.

Gualdrón-López, M., A. Brennand, V. Hannaert, W. Quiñones, A. J. Cáceres, F. Bringaud, J. L. Concepción and P. A. Michels (2012). "When, how and why glycolysis became compartmentalised in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle." Int J Parasitol **42**(1): 1-20.

Gutierrez Guarnizo, S. A., E. B. Tikhonova, A. L. Karamyshev, C. E. Muskus and Z. N. Karamysheva (2023). "Translational reprogramming as a driver of antimony-drug resistance in *Leishmania*." Nat Commun **14**(1): 2605.

Haile, S., A. Dupé and B. Papadopoulou (2008). "Deadenylation-independent stage-specific mRNA degradation in *Leishmania*." Nucleic Acids Res **36**(5): 1634-1644.

Haldar, A. K., P. Sen and S. Roy (2011). "Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions." Mol Biol Int **2011**: 571242.

Harrington, C. T., E. I. Lin, M. T. Olson and J. R. Eshleman (2013). "Fundamentals of pyrosequencing." Arch Pathol Lab Med **137**(9): 1296-1303.

Hashino, E. and M. Shero (1995). "Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells." Brain Res **704**(1): 135-140.

Hashino, E., M. Shero and R. J. Salvi (1997). "Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells." Brain Res **777**(1-2): 75-85.

Hashino, E., M. Shero and R. J. Salvi (2000). "Lysosomal augmentation during aminoglycoside uptake in cochlear hair cells." Brain Res **887**(1): 90-97.

Haydon, D. T., S. Cleaveland, L. H. Taylor and M. K. Laurensen (2002). "Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge." Emerg Infect Dis **8**(12): 1468-1473.

Heather, J. M. and B. Chain (2016). "The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA." Genomics **107**(1): 1-8.

Hendrickx, S., J. Beyers, A. Mondelaers, E. Eberhardt, L. Lachaud, P. Delputte, P. Cos and L. Maes (2016). "Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in *Leishmania infantum*." J Antimicrob Chemother **71**(7): 1914-1921.

Hendrickx, S., G. Boulet, A. Mondelaers, J. C. Dujardin, S. Rijal, L. Lachaud, P. Cos, P. Delputte and L. Maes (2014). "Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*." Parasitol Res **113**(5): 1875-1881.

Hendrickx, S., A. Mondelaers, E. Eberhardt, P. Delputte, P. Cos and L. Maes (2015). "In Vivo Selection of Paromomycin and Miltefosine Resistance in *Leishmania donovani* and *L. infantum* in a Syrian Hamster Model." Antimicrob Agents Chemother **59**(8): 4714-4718.

Hendrickx, S., J. L. Reis-Cunha, S. Forrester, D. C. Jeffares and G. Caljon (2021). "Experimental Selection of Paromomycin Resistance in *Leishmania donovani* Amastigotes Induces Variable Genomic Polymorphisms." Microorganisms **9**(8).

Hernández, R. and A. M. Cevallos (2014). "Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes." Parasitol Res **113**(7): 2415-2424.

Herrer, A. and H. A. Christensen (1980). "*Leishmania braziliensis* in the Panamanian two-toed sloth, *Choloepus hoffmanni*." Am J Trop Med Hyg **29**(6): 1196-1200.

Hobbie, S. N., S. Akshay, S. K. Kalapala, C. M. Bruell, D. Shcherbakov and E. C. Böttger (2008). "Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20888-20893.

Hobbie, S. N., S. K. Kalapala, S. Akshay, C. Bruell, S. Schmidt, S. Dabow, A. Vasella, P. Sander and E. C. Böttger (2007). "Engineering the rRNA decoding site of eukaryotic cytosolic ribosomes in bacteria." Nucleic Acids Res **35**(18): 6086-6093.

Horvath, P. and R. Barrangou (2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea." Science **327**(5962): 167-170.

Hu, T., N. Chitnis, D. Monos and A. Dinh (2021). "Next-generation sequencing technologies: An overview." Hum Immunol **82**(11): 801-811.

Iantorno, S. A., C. Durrant, A. Khan, M. J. Sanders, S. M. Beverley, W. C. Warren, M. Berriman, D. L. Sacks, J. A. Cotton and M. E. Grigg (2017). "Gene Expression in *Leishmania* Is Regulated Predominantly by Gene Dosage." mBio **8**(5).

Inbar, E., J. Shaik, S. A. Iantorno, A. Romano, C. O. Nzelu, K. Owens, M. J. Sanders, D. Dobson, J. A. Cotton, M. E. Grigg, S. M. Beverley and D. Sacks (2019). "Whole genome sequencing of experimental hybrids supports meiosis-like sexual recombination in *Leishmania*." PLoS Genet **15**(5): e1008042.

Isnard, A., M. T. Shio and M. Olivier (2012). "Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling." Front Cell Infect Microbiol **2**: 72.

Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser,

M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Müller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schäfer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell and P. J. Myler (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-442.

Jafari, S., M. Hajiabdolbaghi, M. Mohebbi, H. Hajjarian and H. Hashemian (2010). "Disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in HIV-positive patients in the Islamic Republic of Iran." East Mediterr Health J **16**(3): 340-343.

Jamil, K. M., R. Haque, R. Rahman, M. A. Faiz, A. T. Bhuiyan, A. Kumar, S. M. Hassan, H. Kelly, P. Dhalaria, S. Kochhar, P. Desjeux, M. A. Bhuiyan, M. M. Khan and R. S. Ghosh (2015). "Effectiveness Study of Paromomycin IM Injection (PMIM) for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (VL) in Bangladesh." PLoS Negl Trop Dis **9**(10): e0004118.

Jara, M., M. Berg, G. Caljon, G. de Muylder, B. Cuypers, D. Castillo, I. Maes, M. D. C. Orozco, M. Vanaerschot, J. C. Dujardin and J. Arevalo (2017). "Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage." PLoS One **12**(7): e0180532.

Jean-Moreno, V., R. Rojas, D. Goyeneche, G. H. Coombs and J. Walker (2006). "*Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays." Exp Parasitol **112**(1): 21-30.

Jeronimo, S. M., P. Duggal, R. F. Braz, C. Cheng, G. R. Monteiro, E. T. Nascimento, D. R. Martins, T. M. Karplus, M. F. Ximenes, C. C. Oliveira, V. G. Pinheiro, W. Pereira, J. M. Peralta, J. Sousa, I. M. Medeiros, R. D. Pearsoni, T. L. Burns, E. W. Pugh and M. E. Wilson (2004). "An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil." Scand J Infect Dis **36**(6-7): 443-449.

Jha, S. N., N. K. Singh and T. K. Jha (1991). "Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial." J Assoc Physicians India **39**(4): 314-316.

Jha, T. K., P. Oliaro, C. P. Thakur, T. P. Kanyok, B. L. Singhania, I. J. Singh, N. K. Singh, S. Akhoury and S. Jha (1998). "Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v

sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India." Bmj **316**(7139): 1200-1205.

Jha, T. K., S. Sundar, C. P. Thakur, P. Bachmann, J. Karbwang, C. Fischer, A. Voss and J. Berman (1999). "Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med **341**(24): 1795-1800.

Jhingran, A., B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett and R. Madhubala (2009). "Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol **164**(2): 111-117.

Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks and W. R. McMaster (2002). "Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor." Mol Biochem Parasitol **120**(1): 33-40.

Jullien, N., F. Sampieri, A. Enjalbert and J. P. Herman (2003). "Regulation of Cre recombinase by ligand-induced complementation of inactive fragments." Nucleic Acids Res **31**(21): e131.

Kane, M. M. and D. M. Mosser (2001). "The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis." J Immunol **166**(2): 1141-1147.

Kanyok, T. P., A. D. Killian, K. A. Rodvold and L. H. Danziger (1997). "Pharmacokinetics of intramuscularly administered aminosidine in healthy subjects." Antimicrob Agents Chemother **41**(5): 982-986.

Karamysheva, Z. N., S. A. Gutierrez Guarnizo and A. L. Karamyshev (2020). "Regulation of Translation in the Protozoan Parasite *Leishmania*." Int J Mol Sci **21**(8).

Kariyawasam, K., A. Selvapandian, H. Siriwardana, A. Dube, P. Karunanayake, S. Senanayake, R. Dey, S. Gannavaram, H. L. Nakhasi and N. D. Karunaweera (2018). "Dermotropic *Leishmania donovani* in Sri Lanka: visceralizing potential in clinical and preclinical studies." Parasitology **145**(4): 443-452.

Kerr, S. F., L. H. Emmons, P. C. Melby, C. Liu, L. E. Perez, M. Villegas and R. Miranda (2006). "*Leishmania amazonensis* infections in *Oryzomys acritus* and *Oryzomys nitidus* from Bolivia." Am J Trop Med Hyg **75**(6): 1069-1073.

Kieft, R., Y. Zhang, A. P. Marand, J. D. Moran, R. Bridger, L. Wells, R. J. Schmitz and R. Sabatini (2020). "Identification of a novel base J binding protein complex involved in RNA polymerase II transcription termination in trypanosomes." PLoS Genet **16**(2): e1008390.

Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.

Killick-Kendrick, R. and M. Killick-Kendrick (1987). "Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*." Med Vet Entomol **1**(3): 297-302.

Kip, A. E., J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen and T. P. C. Dorlo (2018). "Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs." Clin Pharmacokinet **57**(2): 151-176.

Kirsebom, L. A., A. Virtanen and N. E. Mikkelsen (2006). "Aminoglycoside interactions with RNAs and nucleases." Handb Exp Pharmacol **173**(173): 73-96.

Kloehn, J., E. C. Saunders, S. O'Callaghan, M. J. Dagley and M. J. McConville (2015). "Characterization of metabolically quiescent *Leishmania* parasites in murine lesions using heavy water labeling." PLoS Pathog **11**(2): e1004683.

Koley, N. G., C. Tschudi and E. Ullu (2011). "RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges." Eukaryot Cell **10**(9): 1156-1163.

Kornberg, A., N. N. Rao and D. Ault-Riché (1999). "Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions." Annu Rev Biochem **68**: 89-125.

Kotra, L. P., J. Haddad and S. Mobashery (2000). "Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3249-3256.

Krause, K. M., A. W. Serio, T. R. Kane and L. E. Connolly (2016). "Aminoglycosides: An Overview." Cold Spring Harb Perspect Med **6**(6).

Kulshrestha, A., V. Sharma, R. Singh and P. Salotra (2014). "Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*." Parasitol Res **113**(3): 1171-1184.

Kulshrestha, A., R. Singh, D. Kumar, N. S. Negi and P. Salotra (2011). "Antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* are susceptible to paromomycin and sitamaquine." Antimicrob Agents Chemother **55**(6): 2916-2921.

Kumari, S., V. Kumar, R. K. Tiwari, V. Ravidas, K. Pandey and A. Kumar (2022). "Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis." Acta Trop **235**: 106661.

Kyuma, T., H. Kizaki, H. Ryuno, K. Sekimizu and C. Kaito (2015). "16S rRNA methyltransferase KsgA contributes to oxidative stress resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*." Biochimie **119**: 166-174.

Laffitte, M. C., P. Leprohon, D. Légaré and M. Ouellette (2016). "Deep-sequencing revealing mutation dynamics in the miltefosine transporter gene in *Leishmania infantum* selected for miltefosine resistance." Parasitol Res **115**(10): 3699-3703.

Laffitte, M. N., P. Leprohon, B. Papadopoulou and M. Ouellette (2016). "Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance." F1000Res **5**: 2350.

Lainson, R. (2010). "The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy." *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, **1**(2), 13-32.

Lainson, R., P. D. Ready and J. J. Shaw (1979). "*Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **206**(1164): 307-318.

Lainson, R. and J. J. Shaw (1968). "Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis--incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the Lower Amazonian Basin." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **62**(3): 385-395.

Lainson, R. and J. J. Shaw (1974). "[Leishmanias and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil]." *Bol Oficina Sanit Panam* **76**(2): 93-114.

Lainson, R., J. J. Shaw, P. D. Ready, M. A. Miles and M. Póvoa (1981). "Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois"." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **75**(4): 530-536.

Lambert, T. (2012). "Antibiotics that affect the ribosome." *Rev Sci Tech* **31**(1): 57-64.

Landolph Jr, J. R. (2014). Genetic toxicology. *Encyclopedia of Toxicology 3rd ed.*, Academic Press, Oxford, 715-725.

Laranjeira-Silva, M. F., I. Hamza and J. M. Pérez-Victoria (2020). "Iron and Heme Metabolism at the *Leishmania*-Host Interface." *Trends Parasitol* **36**(3): 279-289.

LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L. and Beverley, S. M. (1993). "Coupling of poly (A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*". *Genes & development*, **7**(6), 996-1007.

Leeds, J. A. and C. R. Dean (2006). "Peptide deformylase as an antibacterial target: a critical assessment." *Curr Opin Pharmacol* **6**(5): 445-452.

Lemke, A., A. F. Kiderlen and O. Kayser (2005). "Amphotericin B." *Appl Microbiol Biotechnol* **68**(2): 151-162.

Leprohon, P., C. Fernandez-Prada, É. Gazanion, R. Monte-Neto and M. Ouellette (2015). "Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **5**(1): 26-35.

Leprohon, P., D. Légaré, F. Raymond, E. Madore, G. Hardiman, J. Corbeil and M. Ouellette (2009). "Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*." *Nucleic Acids Res* **37**(5): 1387-1399.

Lesnyak, D. V., P. V. Sergiev, A. A. Bogdanov and O. A. Dontsova (2006). "Identification of *Escherichia coli* m2G methyltransferases: I. the *ycbY* gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA." J Mol Biol **364**(1): 20-25.

Liang, X. H., A. Haritan, S. Uliel and S. Michaeli (2003). "trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation." Eukaryot Cell **2**(5): 830-840.

Liarte, D. B. and S. M. Murta (2010). "Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species." Parasitol Res **107**(1): 205-212.

Liautaud, B., N. Vignier, C. Miossec, Y. Plumelle, M. Kone, D. Delta, C. Ravel, A. Cabié and N. Desbois (2015). "First case of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania martiniquensis*." Am J Trop Med Hyg **92**(2): 317-319.

Lindoso, J. A., R. N. Barbosa, M. P. Posada-Vergara, M. I. Duarte, L. K. Oyafuso, V. S. Amato and H. Goto (2009). "Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World." Br J Dermatol **160**(2): 311-318.

Lira, C. B., M. A. Giardini, J. L. Neto, F. F. Conte and M. I. Cano (2007). "Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions." Trends Parasitol **23**(8): 357-362.

Liu, G., Q. Lin, S. Jin and C. Gao (2022). "The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies." Mol Cell **82**(2): 333-347.

Llanes, A., C. M. Restrepo, G. Del Vecchio, F. J. Anguizola and R. Lleonart (2015). "The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus." Sci Rep **5**: 8550.

Lu, H., F. Giordano and Z. Ning (2016). "Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly." Genomics Proteomics Bioinformatics **14**(5): 265-279.

Lukeš, J., A. Butenko, H. Hashimi, D. A. Maslov, J. Votýpka and V. Yurchenko (2018). "Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree." Trends Parasitol **34**(6): 466-480.

Lukes, J., D. L. Guilbride, J. Votýpka, A. Zíková, R. Benne and P. T. Englund (2002). "Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure." Eukaryot Cell **1**(4): 495-502.

Luque-Ortega, J. R. and L. Rivas (2007). "Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **51**(4): 1327-1332.

Lye, L. F., K. Owens, H. Shi, S. M. Murta, A. C. Vieira, S. J. Turco, C. Tschudi, E. Ullu and S. M. Beverley (2010). "Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans." PLoS Pathog **6**(10): e1001161.

Lypaczewski, P., J. Hoshizaki, W. W. Zhang, L. I. McCall, J. Torcivia-Rodriguez, V. Simonyan, A. Kaur, K. Dewar and G. Matlashewski (2018). "A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence." Sci Rep **8**(1): 16549.

Maarouf, M., M. T. Adeline, M. Solignac, D. Vautrin and M. Robert-Gero (1998). "Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes." Parasite **5**(2): 167-173.

Maarouf, M., Y. de Kouchkovsky, S. Brown, P. X. Petit and M. Robert-Gero (1997). "In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*." Exp Cell Res **232**(2): 339-348.

Maarouf, M., F. Lawrence, S. Brown and M. Robert-Gero (1997). "Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes." Parasitol Res **83**(2): 198-202.

Machado-Coelho, G. L., W. T. Caiaffa, O. Genaro, P. A. Magalhães and W. Mayrink (2005). "Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **99**(1): 55-61.

Machado, P. R., J. Ampuero, L. H. Guimarães, L. Villasboas, A. T. Rocha, A. Schriefer, R. S. Sousa, A. Talhari, G. Penna and E. M. Carvalho (2010). "Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial." PLoS Negl Trop Dis **4**(12): e912.

Madeira, M. F., A. Schubach, T. M. Schubach, R. S. Pacheco, F. S. Oliveira, S. A. Pereira, F. B. Figueiredo, C. Baptista and M. C. Marzochi (2006). "Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg **100**(5): 442-445.

Maharjan, M., S. Singh, M. Chatterjee and R. Madhubala (2008). "Role of aquaglyceroporin (AQP1) gene and drug uptake in antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*." Am J Trop Med Hyg **79**(1): 69-75.

Maia, C., V. Seblova, J. Sadlova, J. Votypka and P. Volf (2011). "Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatotropic strain." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1181.

Mandell, M. A. and S. M. Beverley (2017). "Continual renewal and replication of persistent *Leishmania major* parasites in concomitantly immune hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(5): E801-e810.

Manghwar, H., K. Lindsey, X. Zhang and S. Jin (2019). "CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing." Trends Plant Sci **24**(12): 1102-1125.

Mannaert, A., T. Downing, H. Imamura and J. C. Dujardin (2012). "Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*." Trends Parasitol **28**(9): 370-376.

Manuvakhova, M., K. Keeling and D. M. Bedwell (2000). "Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system." Rna **6**(7): 1044-1055.

Manzano, J. I., R. García-Hernández, S. Castanys and F. Gamarro (2013). "A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony." Antimicrob Agents Chemother **57**(8): 3719-3730.

Marcelino, A. P., E. C. Ferreira, J. S. Avendanha, C. F. Costa, D. Chiarelli, G. Almeida, E. C. Moreira, R. C. Leite, J. K. dos Reis and C. M. Gontijo (2011). "Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil." Vet Parasitol **183**(1-2): 54-58.

Marinho-Júnior, J. F., J. Monteiro, A. W. Sales de Carvalho, F. G. de Carvalho, M. de Paiva Cavalcanti, J. Shaw, O. Courtenay and S. P. Brandão-Filho (2023). "High levels of infectiousness of asymptomatic *Leishmania (Viannia) braziliensis* infections in wild rodents highlights their importance in the epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in Brazil." PLoS Negl Trop Dis **17**(1): e0010996.

Maroli, M., M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel and L. Gradoni (2013). "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern." Med Vet Entomol **27**(2): 123-147.

Martínez-Calvillo, S., L. E. Florencio-Martínez and T. Nepomuceno-Mejía (2019). "Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa." Cells **8**(5).

Martínez-Calvillo, S., J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martínez, R. G. Manning-Cela and E. E. Figueroa-Angulo (2010). "Gene expression in trypanosomatid parasites." J Biomed Biotechnol **2010**: 525241.

Martínez-Calvillo, S., S. M. Sunkin, S. Yan, M. Fox, K. Stuart and P. J. Myler (2001). "Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus." Mol Biochem Parasitol **116**(2): 147-157.

Martínez-Calvillo, S., S. Yan, D. Nguyen, M. Fox, K. Stuart and P. J. Myler (2003). "Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region." Mol Cell **11**(5): 1291-1299.

Matsunaga, K., H. Yamaki, T. Nishimura and N. Tanaka (1986). "Inhibition of DNA replication initiation by aminoglycoside antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **30**(3): 468-474.

Mayer, M. G. and L. M. Floeter-Winter (2005). "Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(5): 501-513.

Mayrink, W., P. Williams, M. V. Coelho, M. Dias, A. V. Martins, P. A. Magalhães, C. A. Da Costa, A. R. Falcão, M. N. Melo and A. L. Falcão (1979). "Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil." Ann Trop Med Parasitol **73**(2): 123-137.

Mbongo, N., P. M. Loiseau, M. A. Billion and M. Robert-Gero (1998). "Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother **42**(2): 352-357.

McConville, M. J., D. de Souza, E. Saunders, V. A. Likic and T. Naderer (2007). "Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes." Trends Parasitol **23**(8): 368-375.

McQuarrie, S., K. Kasper, D. C. Moffatt, D. Marko and Y. Keynan (2015). "Relapse of visceral leishmaniasis in an HIV-infected patient successfully treated with a combination of miltefosine and amphotericin B." Can J Infect Dis Med Microbiol **26**(6): 325-329.

Meinzel, T. (2000). "Peptide deformylase of eukaryotic protists: a target for new antiparasitic agents?" Parasitol Today **16**(4): 165-168.

Meinzel, T., Y. Mechulam and S. Blanquet (1993). "Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*." Biochimie **75**(12): 1061-1075.

Merriman, B. and J. M. Rothberg (2012). "Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing." Electrophoresis **33**(23): 3397-3417.

Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman and V. Hannaert (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1463-1477.

Ministério da Saúde (2017). Secretaria de Vigilância em Saúde. "Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar". 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 12 de janeiro de 2024.

Disponível em:
https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf.

Minton, J. A., S. E. Flanagan and S. Ellard (2011). "Mutation surveyor: software for DNA sequence analysis." Methods Mol Biol **688**: 143-153.

Monte-Neto, R., M. C. Laffitte, P. Leprohon, P. Reis, F. Frézard and M. Ouellette (2015). "Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis*." PLoS Negl Trop Dis **9**(2): e0003476.

Moradin, N. and A. Descoteaux (2012). "*Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages." Front Cell Infect Microbiol **2**: 121.

Morelle, C., A. Mukherjee, J. Zhang, F. Fani, A. Khandelwal, H. Gingras, J. Trottier, O. Barbier, P. Leprohon, M. D. Burke and M. Ouellette (2021). "Well-Tolerated Amphotericin B Derivatives That Effectively Treat Visceral Leishmaniasis." ACS Infect Dis **7**(8): 2472-2482.

Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." Lancet **366**(9496): 1561-1577.

Musa, A. M., J. Mbui, R. Mohammed, J. Olobo, K. Ritmeijer, G. Alcoba, G. Muthoni Ouattara, T. Egondi, P. Nakanwagi, T. Omollo, M. Wasunna, L. Verrest, T. P. C. Dorlo, B. Musa Younis, A. Nour, E. Taha Ahmed Elmukashfi, A. Ismail Omer Haroun, E. A. G. Khalil, S. Njenga, H. Fikre, T. Mekonnen, D. Mersha, K. Sisay, P. Sagaki, J. Alvar, A. Solomos and F. Alves (2023). "Paromomycin and Miltefosine Combination as an Alternative to Treat Patients With Visceral Leishmaniasis in Eastern Africa: A Randomized, Controlled, Multicountry Trial." Clin Infect Dis **76**(3): e1177-e1185.

Mwenechanya, R., J. Kovářová, N. J. Dickens, M. Mudaliar, P. Herzyk, I. M. Vincent, S. K. Weidt, K. E. Burgess, R. J. S. Burchmore, A. W. Pountain, T. K. Smith, D. J. Creek, D. H. Kim, G. I. Lepesheva and M. P. Barrett (2017). "Sterol 14 α -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*." PLoS Negl Trop Dis **11**(6): e0005649.

Naderer, T., M. A. Ellis, M. F. Sernee, D. P. De Souza, J. Curtis, E. Handman and M. J. McConville (2006). "Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5502-5507.

Naderer, T., J. Heng and M. J. McConville (2010). "Evidence that intracellular stages of *Leishmania major* utilize amino sugars as a major carbon source." PLoS Pathog **6**(12): e1001245.

Nagy, A. (2000). "Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring." Genesis **26**(2): 99-109.

Nakamura, K., T. Oshima, T. Morimoto, S. Ikeda, H. Yoshikawa, Y. Shiwa, S. Ishikawa, M. C. Linak, A. Hirai, H. Takahashi, M. Altaf-Ul-Amin, N. Ogasawara and S. Kanaya (2011). "Sequence-specific error profile of Illumina sequencers." Nucleic Acids Res **39**(13): e90.

Naor, N., O. Gadot, M. Meir and D. Barkan (2019). "Peptide Deformylase (def) is essential in *Mycobacterium smegmatis*, but the essentiality is compensated by inactivation of methionine formylation." BMC Microbiol **19**(1): 232.

Nateghi-Rostami, M., M. Tasbihi and F. Darzi (2022). "Involvement of trypanothione reductase (TryR) and trypanothione reductase (TryP) in antimony unresponsive of *Leishmania tropica* clinical isolates of Iran." Acta Trop **230**: 106392.

Negrão, F., D. R. Abánades, C. F. Jaeger, D. F. O. Rocha, K. R. A. Belaz, S. Giorgio, M. N. Eberlin and C. F. F. Angolini (2017). "Lipidomic alterations of *in vitro* macrophage infection by *L. infantum* and *L. amazonensis*." Mol Biosyst **13**(11): 2401-2406.

Nilsson, A. I., A. Zorzet, A. Kanth, S. Dahlström, O. G. Berg and D. I. Andersson (2006). "Reducing the fitness cost of antibiotic resistance by amplification of initiator tRNA genes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 6976-6981.

Ning, Y., C. Frankfater, F. F. Hsu, R. P. Soares, C. A. Cardoso, P. M. Nogueira, N. M. Lander, R. Docampo and K. Zhang (2020). "Lathosterol Oxidase (Sterol C-5 Desaturase) Deletion Confers Resistance to Amphotericin B and Sensitivity to Acidic Stress in *Leishmania major*." mSphere **5**(4).

Oliveira, C. C., H. G. Lacerda, D. R. Martins, J. D. Barbosa, G. R. Monteiro, J. W. Queiroz, J. M. Sousa, M. F. Ximenes and S. M. Jeronimo (2004). "Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface." Acta Trop **90**(2): 155-162.

Oliveira, W. N., L. E. Ribeiro, A. Schrieffer, P. Machado, E. M. Carvalho and O. Bacellar (2014). "The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis." Cytokine **66**(2): 127-132.

Ostyn, B., E. Hasker, T. P. Dorlo, S. Rijal, S. Sundar, J. C. Dujardin and M. Boelaert (2014). "Failure of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis in children and men in South-East Asia." PLoS One **9**(6): e100220.

Oxford Nanopore Technologies (2024). "How Nanopore sequencing works". Acesso em 03 de abril de 2024. Disponível em: <https://nanoporetech.com/platform/technology>.

Oza, S. L., M. P. Shaw, S. Wyllie and A. H. Fairlamb (2005). "Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **139**(1): 107-116.

Pace, D. (2014). "Leishmaniasis." J Infect **69 Suppl 1**: S10-18.

Paranaíba, L. F., L. J. Pinheiro, A. C. Torrecilhas, D. H. Macedo, A. Menezes-Neto, W. L. Tafuri and R. P. Soares (2017). "*Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay." PLoS Pathog **13**(5): e1006303.

Parreira de Aquino, G., M. A. Mendes Gomes, R. Köpke Salinas and M. F. Laranjeira-Silva (2021). "Lipid and fatty acid metabolism in trypanosomatids." Microb Cell **8**(11): 262-275.

Parsons, M. (2004). "Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose." Mol Microbiol **53**(3): 717-724.

Patino, L. H., M. Muñoz, L. Cruz-Saavedra, C. Muskus and J. D. Ramírez (2020). "Genomic Diversification, Structural Plasticity, and Hybridization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*." Front Cell Infect Microbiol **10**: 582192.

Patino, L. H., C. Muskus, M. Muñoz and J. D. Ramírez (2020). "Genomic analyses reveal moderate levels of ploidy, high heterozygosity and structural variations in a Colombian isolate of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*." Acta Trop **203**: 105296.

Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabbinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith and M. Berriman (2007). "Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease." Nat Genet **39**(7): 839-847.

Perea, A., J. I. Manzano, S. Castanys and F. Gamarro (2016). "The LABCG2 Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* Is Involved in Antimony Resistance." Antimicrob Agents Chemother **60**(6): 3489-3496.

Pereira, A. A. S., E. C. Ferreira, A. Lima, G. B. Tonelli, F. D. Rêgo, A. P. Paglia, J. D. Andrade-Filho, G. F. Paz and C. M. F. Gontijo (2017). "Detection of *Leishmania* spp in silvatic mammals and isolation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil." PLoS One **12**(11): e0187704.

Pérez-Victoria, F. J., M. P. Sánchez-Cañete, S. Castanys and F. Gamarro (2006). "Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites." J Biol Chem **281**(33): 23766-23775.

Pérez-Victoria, J. M., B. I. Bavchvarov, I. R. Torrecillas, M. Martínez-García, C. López-Martín, M. Campillo, S. Castanys and F. Gamarro (2011). "Sitamaquine overcomes ABC-

mediated resistance to miltefosine and antimony in *Leishmania*." Antimicrob Agents Chemother **55**(8): 3838-3844.

Perry, M., S. Wyllie, V. Prajapati, J. Menten, A. Raab, J. Feldmann, D. Chakraborti, S. Sundar, M. Boelaert, A. Picado and A. Fairlamb (2015). "Arsenic, antimony, and *Leishmania*: has arsenic contamination of drinking water in India led to treatment-resistant kala-azar?" Lancet **385 Suppl 1**: S80.

Perry, M. R., V. K. Prajapati, J. Menten, A. Raab, J. Feldmann, D. Chakraborti, S. Sundar, A. H. Fairlamb, M. Boelaert and A. Picado (2015). "Arsenic exposure and outcomes of antimonial treatment in visceral leishmaniasis patients in Bihar, India: a retrospective cohort study." PLoS Negl Trop Dis **9**(3): e0003518.

Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain and D. Sacks (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-974.

Peters, N. C. and D. L. Sacks (2009). "The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis." Cell Microbiol **11**(9): 1290-1296.

Piccica, M., F. Lagi, A. Bartoloni and L. Zammarchi (2021). "Efficacy and safety of pentamidine isethionate for tegumentary and visceral human leishmaniasis: a systematic review." J Travel Med **28**(6).

Pimenta, P. F., G. B. Modi, S. T. Pereira, M. Shahabuddin and D. L. Sacks (1997). "A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut." Parasitology **115 (Pt 4)**: 359-369.

Podinovskaia, M. and A. Descoteaux (2015). "*Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction." Future Microbiol **10**(1): 111-129.

Ponte-Sucré, A., F. Gamarro, J. C. Dujardin, M. P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A. W. Pountain, R. Mwenechanya and B. Papadopolou (2017). "Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge." PLoS Negl Trop Dis **11**(12): e0006052.

Potvin, J. E., P. Leprohon, M. Queffeuilou, S. Sundar and M. Ouellette (2021). "Mutations in an Aquaglyceroporin as a Proven Marker of Antimony Clinical Resistance in the Parasite *Leishmania donovani*." Clin Infect Dis **72**(10): e526-e532.

Pountain, A. W., S. K. Weidt, C. Regnault, P. A. Bates, A. M. Donachie, N. J. Dickens and M. P. Barrett (2019). "Genomic instability at the locus of sterol C24-methyltransferase promotes amphotericin B resistance in *Leishmania* parasites." PLoS Negl Trop Dis **13**(2): e0007052.

Pradhan, S., R. A. Schwartz, A. Patil, S. Grabbe and M. Goldust (2022). "Treatment options for leishmaniasis." Clin Exp Dermatol **47**(3): 516-521.

Prajapati, V. K., S. Mehrotra, S. Gautam, M. Rai and S. Sundar (2012). "In vitro antileishmanial drug susceptibility of clinical isolates from patients with Indian visceral leishmaniasis--status of newly introduced drugs." Am J Trop Med Hyg **87**(4): 655-657.

Prokhorova, I., R. B. Altman, M. Djumagulov, J. P. Shrestha, A. Urzhumtsev, A. Ferguson, C. T. Chang, M. Yusupov, S. C. Blanchard and G. Yusupova (2017). "Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(51): E10899-e10908.

Purkait, B., A. Kumar, N. Nandi, A. H. Sardar, S. Das, S. Kumar, K. Pandey, V. Ravidas, M. Kumar, T. De, D. Singh and P. Das (2012). "Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*." Antimicrob Agents Chemother **56**(2): 1031-1041.

Quiñonez-Díaz, L., J. Mancilla-Ramírez, M. Avila-García, J. Ortiz-Avalos, A. Berron, S. González, Y. Paredes and N. Galindo-Sevilla (2012). "Effect of ambient temperature on the clinical manifestations of experimental diffuse cutaneous leishmaniasis in a rodent model." Vector Borne Zoonotic Dis **12**(10): 851-860.

Quintal, A. P., S. Ribeiro Ede, F. P. Rodrigues, F. S. Rocha, L. M. Floeter-Winter and C. M. Nunes (2011). "*Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil." Vet Parasitol **176**(2-3): 112-119.

Rabaan, A. A., M. A. Bakhrebah, R. K. Mohapatra, R. A. Farahat, M. Dhawan, S. Alwarthan, M. Aljeldah, B. R. Al Shammari, A. H. Al-Najjar, M. A. Alhusayyen, G. H. Al-Absi, Y. Aldawood, A. A. Alsaleh, S. A. Alshamrani, S. A. Almuthree, A. Alawfi, A. Alshengeti, A. S. S. Alwashmi, K. Hajissa and M. S. Nassar (2022). "Omics Approaches in Drug Development against Leishmaniasis: Current Scenario and Future Prospects." Pathogens **12**(1).

Ralton, J. E., T. Naderer, H. L. Piraino, T. A. Bashtannyk, J. M. Callaghan and M. J. McConville (2003). "Evidence that intracellular beta1-2 mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites." J Biol Chem **278**(42): 40757-40763.

Ramakrishnan, S., M. Serricchio, B. Striepen and P. Bütikofer (2013). "Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans." Prog Lipid Res **52**(4): 488-512.

Ramalho-Ortigao, M., E. M. Saraiva and Y. M. Traub-Csekö (2010). "Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy." Open Parasitol J **4**: 195-204.

Rangel, E. F. and M. L. Vilela (2008). "*Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil." Cad Saude Publica **24**(12): 2948-2952.

Rastrojo, A., R. García-Hernández, P. Vargas, E. Camacho, L. Corvo, H. Imamura, J. C. Dujardin, S. Castanys, B. Aguado, F. Gamarro and J. M. Requena (2018). "Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **8**(2): 246-264.

Ready, P. D. (2013). "Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents." Annu Rev Entomol **58**: 227-250.

Real, F., R. O. Vidal, M. F. Carazzolle, J. M. Mondego, G. G. Costa, R. H. Herai, M. Würtele, L. M. de Carvalho, R. Carmona e Ferreira, R. A. Mortara, C. L. Barbiéri, P. Mieczkowski, J. F. da Silveira, M. R. Briones, G. A. Pereira and D. Bahia (2013). "The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models." DNA Res **20**(6): 567-581.

Reimão, J. Q., E. M. Coser, M. R. Lee and A. C. Coelho (2020). "Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods." Microorganisms **8**(11).

Reithinger, R. and C. R. Davies (1999). "Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence." Am J Trop Med Hyg **61**(4): 530-541.

Reithinger, R., J. C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander and S. Brooker (2007). "Cutaneous leishmaniasis." Lancet Infect Dis **7**(9): 581-596.

Reynolds, D. L., B. T. Hofmeister, L. Cliffe, T. N. Siegel, B. A. Anderson, S. M. Beverley, R. J. Schmitz and R. Sabatini (2016). "Base J represses genes at the end of polycistronic gene clusters in *Leishmania major* by promoting RNAP II termination." Mol Microbiol **101**(4): 559-574.

Rhoads, A. and K. F. Au (2015). "PacBio Sequencing and Its Applications." Genomics Proteomics Bioinformatics **13**(5): 278-289.

Ribeiro-Gomes, F. L., N. C. Peters, A. Debrabant and D. L. Sacks (2012). "Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*leishmania* response." PLoS Pathog **8**(2): e1002536.

Ribeiro-Romão, R. P., O. C. Moreira, E. Y. Osorio, L. Cysne-Finkelstein, A. Gomes-Silva, J. G. Valverde, C. Pirmez, A. M. Da-Cruz and E. F. Pinto (2014). "Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus*

auratus) infected by inocula with different *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* concentrations." Infect Immun **82**(12): 5203-5213.

Rijal, S., B. Ostyn, S. Uranw, K. Rai, N. R. Bhattarai, T. P. Dorlo, J. H. Beijnen, M. Vanaerschot, S. Decuyper, S. S. Dhakal, M. L. Das, P. Karki, R. Singh, M. Boelaert and J. C. Dujardin (2013). "Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance." Clin Infect Dis **56**(11): 1530-1538.

Ritmeijer, K., R. ter Horst, S. Chane, E. M. Aderie, T. Piening, S. M. Collin and R. N. Davidson (2011). "Limited effectiveness of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high HIV prevalence." Clin Infect Dis **53**(12): e152-158.

Rocha, N. M., M. N. Melo, E. H. Babá, M. Dias, M. S. Michalick, C. A. Da Costa, P. Williams and W. Mayrink (1988). "*Leishmania braziliensis braziliensis* isolated from *Akodon arviculoides* captured in Caratinga, Minas Gerais, Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg **82**(1): 68.

Rodrigues, J. C., J. L. Godinho and W. de Souza (2014). "Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure." Subcell Biochem **74**: 1-42.

Rogers, M. B., J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J. C. Dujardin, M. Berriman, D. F. Smith, C. Hertz-Fowler and J. C. Mottram (2011). "Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*." Genome Res **21**(12): 2129-2142.

Rogers, M. E. (2012). "The role of *leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the Mammalian host." Front Microbiol **3**: 223.

Rogers, M. E. and P. A. Bates (2007). "*Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission." PLoS Pathog **3**(6): e91.

Rogers, M. E., M. L. Chance and P. A. Bates (2002). "The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*." Parasitology **124**(Pt 5): 495-507.

Roque, A. L. and A. M. Jansen (2014). "Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas." Int J Parasitol Parasites Wildl **3**(3): 251-262.

Rosenzweig, D., D. Smith, P. J. Myler, R. W. Olafson and D. Zilberstein (2008). "Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation." Proteomics **8**(9): 1843-1850.

Rostamian, M., D. Jafari, M. Abolghazi, H. Farahani and H. M. Niknam (2018). "*Leishmania tropica*: suggestive evidences for the effect of infectious dose on pathogenicity and immunogenicity in an experimental model." Parasitol Res **117**(9): 2949-2956.

Rugani, J. N., C. M. F. Gontijo, F. Frézard, R. P. Soares and R. L. D. Monte-Neto (2019). "Antimony resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake." Mem Inst Oswaldo Cruz **114**: e190111.

Sacks, D. L. (2001). "*Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence." Cell Microbiol **3**(4): 189-196.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.

Santos, J. L., A. A. Andrade, A. A. Dias, C. A. Bonjardim, L. F. Reis, S. M. Teixeira and M. F. Horta (2006). "Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression." J Interferon Cytokine Res **26**(9): 682-688.

Santos, R., G. L. A. Silva, E. V. Santos, S. M. Duncan, J. C. Mottram, J. D. Damasceno and L. R. O. Tosi (2017). "A DiCre recombinase-based system for inducible expression in *Leishmania major*." Mol Biochem Parasitol **216**: 45-48.

Sauvage, V., D. Aubert, S. Escotte-Binet and I. Villena (2009). "The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites." Mol Biochem Parasitol **167**(2): 81-94.

Schwabl, P., M. C. Boité, G. Bussotti, A. Jacobs, B. Andersson, O. Moreira, A. L. Freitas-Mesquita, J. R. Meyer-Fernandes, E. L. Telleria, Y. Traub-Csekö, S. Vaselek, T. Leštinová, P. Volf, F. N. Morgado, R. Porrozzzi, M. Llewellyn, G. F. Späth and E. Cupolillo (2021). "Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas." Commun Biol **4**(1): 139.

Scorza, B. M., E. M. Carvalho and M. E. Wilson (2017). "Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis." Int J Mol Sci **18**(6).

Séguin, O. and A. Descoteaux (2016). "*Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite." Cell Immunol **309**: 1-6.

Seifert, K., F. J. Pérez-Victoria, M. Stettler, M. P. Sánchez-Cañete, S. Castanys, F. Gamarro and S. L. Croft (2007). "Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*." Int J Antimicrob Agents **30**(3): 229-235.

- Selimoglu, E. (2007). "Aminoglycoside-induced ototoxicity." Curr Pharm Des **13**(1): 119-126.
- Serafim, T. D., I. V. Coutinho-Abreu, R. Dey, R. Kissinger, J. G. Valenzuela, F. Oliveira and S. Kamhawi (2021). "Leishmaniasis: the act of transmission." Trends Parasitol **37**(11): 976-987.
- Serafim, T. D., I. V. Coutinho-Abreu, F. Oliveira, C. Meneses, S. Kamhawi and J. G. Valenzuela (2018). "Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity." Nat Microbiol **3**(5): 548-555.
- Serafim, T. D., A. B. Figueiredo, P. A. Costa, E. A. Marques-da-Silva, R. Gonçalves, S. A. de Moura, N. F. Gontijo, S. M. da Silva, M. S. Michalick, J. R. Meyer-Fernandes, R. P. de Carvalho, S. R. Uliana, J. L. Fietto and L. C. Afonso (2012). "*Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines." PLoS Negl Trop Dis **6**(9): e1833.
- Sereno, D., P. Holzmüller, I. Mangot, G. Cuny, A. Ouaisi and J. L. Lemesre (2001). "Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes." Antimicrob Agents Chemother **45**(7): 2064-2069.
- Sergeeva, O. V., A. A. Bogdanov and P. V. Sergiev (2015). "What do we know about ribosomal RNA methylation in *Escherichia coli*?" Biochimie **117**: 110-118.
- Seyffart G (1991). Drug dosing in renal insufficiency. Dordrecht: Springer, p. 448.
- Shalev-Benami, M., Y. Zhang, D. Matzov, Y. Halfon, A. Zackay, H. Rozenberg, E. Zimmerman, A. Bashan, C. L. Jaffe, A. Yonath and G. Skiniotis (2016). "2.8-Å Cryo-EM Structure of the Large Ribosomal Subunit from the Eukaryotic Parasite *Leishmania*." Cell Rep **16**(2): 288-294.
- Shalev-Benami, M., Y. Zhang, H. Rozenberg, Y. Nobe, M. Taoka, D. Matzov, E. Zimmerman, A. Bashan, T. Isobe, C. L. Jaffe, A. Yonath and G. Skiniotis (2017). "Atomic resolution snapshot of *Leishmania* ribosome inhibition by the aminoglycoside paromomycin." Nat Commun **8**(1): 1589.
- Shapiro, T. A. and P. T. Englund (1995). "The structure and replication of kinetoplast DNA." Annu Rev Microbiol **49**: 117-143.
- Shaw, C. D., H. Imamura, T. Downing, G. Blackburn, G. D. Westrop, J. A. Cotton, M. Berriman, M. Sanders, S. Rijal, G. H. Coombs, J. C. Dujardin and K. C. Carter (2019). "Genomic and Metabolomic Polymorphism among Experimentally Selected Paromomycin-Resistant *Leishmania donovani* Strains." Antimicrob Agents Chemother **64**(1).
- Sheetlin, S. L., Y. Park, M. C. Frith and J. L. Spouge (2014). "Frameshift alignment: statistics and post-genomic applications." Bioinformatics **30**(24): 3575-3582.

Shimabukuro, P. H. F., A. J. de Andrade and E. A. B. Galati (2017). "Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution." Zookeys(660): 67-106.

Shio, M. T., K. Hassani, A. Isnard, B. Ralph, I. Contreras, M. A. Gomez, I. Abu-Dayyeh and M. Olivier (2012). "Host cell signalling and *leishmania* mechanisms of evasion." J Trop Med **2012**: 819512.

Silva, E. M., L. C. Alves, N. R. Guerra, M. P. Farias, E. L. Oliveira, R. C. de Souza, C. da Cunha, R. A. Ramos and W. J. Porto (2016). "*LEISHMANIA* SPP. IN *DIDELPHIS* SPP. FROM NORTHEASTERN BRAZIL." J Zoo Wildl Med **47**(3): 942-944.

Simpson, L. (1997). "The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions." Mol Biochem Parasitol **86**(2): 133-141.

Simpson, L., S. M. Douglass, J. A. Lake, M. Pellegrini and F. Li (2015). "Comparison of the Mitochondrial Genomes and Steady State Transcriptomes of Two Strains of the Trypanosomatid Parasite, *Leishmania tarentolae*." PLoS Negl Trop Dis **9**(7): e0003841.

Sinha, P. K., T. K. Jha, C. P. Thakur, D. Nath, S. Mukherjee, A. K. Aditya and S. Sundar (2011). "Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India." J Trop Med **2011**: 645203.

Slatko, B. E., A. F. Gardner and F. M. Ausubel (2018). "Overview of Next-Generation Sequencing Technologies." Curr Protoc Mol Biol **122**(1): e59.

Smith, D. F., C. S. Peacock and A. K. Cruz (2007). "Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis." Int J Parasitol **37**(11): 1173-1186.

Solbiati, J., A. Chapman-Smith, J. L. Miller, C. G. Miller and J. E. Cronan, Jr. (1999). "Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal." J Mol Biol **290**(3): 607-614.

Soto, J., B. A. Arana, J. Toledo, N. Rizzo, J. C. Vega, A. Diaz, M. Luz, P. Gutierrez, M. Arboleda, J. D. Berman, K. Junge, J. Engel and H. Sindermann (2004). "Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis." Clin Infect Dis **38**(9): 1266-1272.

Spadari, C. C., L. P. Borba-Santos, S. Rozental and K. Ishida (2023). "Miltefosine repositioning: A review of potential alternative antifungal therapy." J Mycol Med **33**(4): 101436.

Späth, G. F., L. A. Garraway, S. J. Turco and S. M. Beverley (2003). "The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9536-9541.

Srivastava, P., V. K. Prajapati, M. Rai and S. Sundar (2011). "Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic." J Clin Microbiol **49**(8): 3088-3091.

Sterkers, Y., L. Lachaud, N. Bourgeois, L. Crobu, P. Bastien and M. Pagès (2012). "Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*." Mol Microbiol **86**(1): 15-23.

Steverding, D. (2017). "The history of leishmaniasis." Parasit Vectors **10**(1): 82.

Sundar, S. (2001). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis." Trop Med Int Health **6**(11): 849-854.

Sundar, S. and J. Chakravarty (2013). "Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy." Expert Opin Pharmacother **14**(1): 53-63.

Sundar, S. and J. Chakravarty (2015). "Investigational drugs for visceral leishmaniasis." Expert Opin Investig Drugs **24**(1): 43-59.

Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, S. K. Bhattacharya and M. Rai (2006). "Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **100** Suppl 1: S26-33.

Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson and J. Berman (2002). "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med **347**(22): 1739-1746.

Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, P. K. Sinha and S. K. Bhattacharya (2007). "Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India." N Engl J Med **356**(25): 2571-2581.

Sundar, S., H. Mehta, A. V. Suresh, S. P. Singh, M. Rai and H. W. Murray (2004). "Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations." Clin Infect Dis **38**(3): 377-383.

Sundar, S., D. K. More, M. K. Singh, V. P. Singh, S. Sharma, A. Makharia, P. C. Kumar and H. W. Murray (2000). "Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic." Clin Infect Dis **31**(4): 1104-1107.

Sundar, S. and A. Singh (2018). "Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments." Parasitology **145**(4): 481-489.

Sundar, S., A. Singh, M. Rai, V. K. Prajapati, A. K. Singh, B. Ostyn, M. Boelaert, J. C. Dujardin and J. Chakravarty (2012). "Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use." Clin Infect Dis **55**(4): 543-550.

Sundar, S., P. K. Sinha, M. Rai, D. K. Verma, K. Nawin, S. Alam, J. Chakravarty, M. Vaillant, N. Verma, K. Pandey, P. Kumari, C. S. Lal, R. Arora, B. Sharma, S. Ellis, N. Strub-

Wourgaft, M. Balasegaram, P. Oliaro, P. Das and F. Modabber (2011). "Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial." Lancet **377**(9764): 477-486.

Sundar, S., P. K. Sinha, D. K. Verma, N. Kumar, S. Alam, K. Pandey, P. Kumari, V. Ravidas, J. Chakravarty, N. Verma, J. Berman, H. Ghalib and B. Arana (2011). "Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar." Trans R Soc Trop Med Hyg **105**(2): 115-117.

SUS – Sistema Único de Saúde (2018). Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Brasília, CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. 365: 34.

t'Kindt, R., R. A. Scheltema, A. Jankevics, K. Brunner, S. Rijal, J. C. Dujardin, R. Breitling, D. G. Watson, G. H. Coombs and S. Decuypere (2010). "Metabolomics to unveil and understand phenotypic diversity between pathogen populations." PLoS Negl Trop Dis **4**(11): e904.

Tamiru, A., B. Tigabu, S. Yifru, E. Diro and A. Hailu (2016). "Safety and efficacy of liposomal amphotericin B for treatment of complicated visceral leishmaniasis in patients without HIV, North-West Ethiopia." BMC Infect Dis **16**(1): 548.

Terrão, M. C., E. J. Rosas de Vasconcelos, T. A. Defina, P. J. Myler and A. K. Cruz (2017). "Disclosing 3' UTR cis-elements and putative partners involved in gene expression regulation in *Leishmania* spp." PLoS One **12**(8): e0183401.

Thakur, C. P., G. P. Sinha, A. K. Pandey, N. Kumar, P. Kumar, S. M. Hassan, S. Narain and R. K. Roy (1998). "Do the diminishing efficacy and increasing toxicity of sodium stibogluconate in the treatment of visceral leishmaniasis in Bihar, India, justify its continued use as a first-line drug? An observational study of 80 cases." Ann Trop Med Parasitol **92**(5): 561-569.

Tolezano, J. E., S. R. Uliana, H. H. Taniguchi, M. F. Araújo, J. A. Barbosa, J. E. Barbosa, L. M. Floeter-Winter and J. J. Shaw (2007). "The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil." Vet Parasitol **149**(3-4): 280-284.

Torres-Guerrero, E., M. R. Quintanilla-Cedillo, J. Ruiz-Esmenjaud and R. Arenas (2017). "Leishmaniasis: a review." F1000Res **6**: 750.

Turetz, M. L., P. R. Machado, A. I. Ko, F. Alves, A. Bittencourt, R. P. Almeida, N. Mobashery, W. D. Johnson, Jr. and E. M. Carvalho (2002). "Disseminated leishmaniasis: a new

and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil." *J Infect Dis* **186**(12): 1829-1834.

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

Uliana, S. R. B., C. T. Trinconi and A. C. Coelho (2018). "Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges." *Parasitology* **145**(4): 464-480.

Ungureanu, G., S. Santos, R. Boaventura and C. Botelho (2015). "Arsenic and antimony in water and wastewater: overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption." *J Environ Manage* **151**: 326-342.

University of Michigan (2012). Center for Statistic Genetics. SNP call set properties. Disponível em: https://genome.sph.umich.edu/wiki/SNP_Call_Set_Properties. Acesso em: 10 de maio de 2024.

Utaile, M., A. Kassahun, T. Abebe and A. Hailu (2013). "Susceptibility of clinical isolates of *Leishmania aethiopica* to miltefosine, paromomycin, amphotericin B and sodium stibogluconate using amastigote-macrophage *in vitro* model." *Exp Parasitol* **134**(1): 68-75.

Vacas, A., C. Fernández-Rubio, M. Algarabel, J. Peña-Guerrero, E. Larrea, F. Rocha Formiga, A. T. García-Sosa and P. A. Nguewa (2019). "The Novel Serine/Threonine Protein Kinase LmjF.22.0810 from *Leishmania major* may be Involved in the Resistance to Drugs such as Paromomycin." *Biomolecules* **9**(11).

Valashani, H. T., M. Ahmadpour, S. R. Naddaf, M. Mohebbi, H. Hajjarian, A. Latifi, M. Salimi, M. Farahmand, S. Naeimi, V. Raissi and E. Kazemirad (2024). "Insights into the trypanothione system in antimony-resistant and sensitive *Leishmania tropica* clinical isolates." *Acta Trop* **254**: 107190.

Van Assche, T., M. Deschacht, R. A. da Luz, L. Maes and P. Cos (2011). "*Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology." *Free Radic Biol Med* **51**(2): 337-351.

van Griensven, J., E. Carrillo, R. López-Vélez, L. Lynen and J. Moreno (2014). "Leishmaniasis in immunosuppressed individuals." *Clin Microbiol Infect* **20**(4): 286-299.

van Luenen, H. G., C. Farris, S. Jan, P. A. Genest, P. Tripathi, A. Velds, R. M. Kerkhoven, M. Nieuwland, A. Haydock, G. Ramasamy, S. Vainio, T. Heidebrecht, A. Perrakis, L. Pagie, B. van Steensel, P. J. Myler and P. Borst (2012). "Glucosylated hydroxymethyluracil, DNA base J, prevents transcriptional readthrough in *Leishmania*." *Cell* **150**(5): 909-921.

Vanaerschot, M., S. Huijben, F. Van den Broeck and J. C. Dujardin (2014). "Drug resistance in vectorborne parasites: multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race." FEMS Microbiol Rev **38**(1): 41-55.

Verma, A., V. Bhandari, D. K. Deep, S. Sundar, J. C. Dujardin, R. Singh and P. Salotra (2017). "Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in *Leishmania donovani*." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **7**(3): 370-377.

Verma, A., A. Nayek, A. Kumar, R. Singh and P. Salotra (2020). "Elucidation of role of an acetyltransferase like protein in paromomycin resistance in *Leishmania donovani* using in silico and in vitro approaches." J Biomol Struct Dyn **38**(15): 4449-4460.

Vincent, I. M., S. Weidt, L. Rivas, K. Burgess, T. K. Smith and M. Ouellette (2014). "Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism." Int J Parasitol Drugs Drug Resist **4**(1): 20-27.

Vinet, A. F., M. Fukuda, S. J. Turco and A. Descoteaux (2009). "The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V." PLoS Pathog **5**(10): e1000628.

Wang, Y., Y. Zhao, A. Bollas, Y. Wang and K. F. Au (2021). "Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications." Nat Biotechnol **39**(11): 1348-1365.

Warburg, A., E. Saraiva, G. C. Lanzaro, R. G. Titus and F. Neva (1994). "Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1312): 223-230.

Wargo, K. A. and J. D. Edwards (2014). "Aminoglycoside-induced nephrotoxicity." J Pharm Pract **27**(6): 573-577.

Webster, C. M. and M. Shepherd (2022). "A mini-review: environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy." World J Microbiol Biotechnol **39**(1): 7.

Wincker, P., C. Ravel, C. Blaineau, M. Pages, Y. Jauffret, J. P. Dedet and P. Bastien (1996). "The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species." Nucleic Acids Res **24**(9): 1688-1694.

Woollard, P. M., N. A. Mehta, J. J. Vamathevan, S. Van Horn, B. K. Bonde and D. J. Dow (2011). "The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development." Drug Discov Today **16**(11-12): 512-519.

World Health Organization (2023). "Leishmaniasis". Acesso em: 22 de abril de 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

Yan, S., F. Li, K. Ding and H. Sun (2003). "Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione." J Biol Inorg Chem **8**(6): 689-697.

Zackay, A., J. A. Cotton, M. Sanders, A. Hailu, A. Nasereddin, A. Warburg and C. L. Jaffe (2018). "Genome wide comparison of Ethiopian *Leishmania donovani* strains reveals differences potentially related to parasite survival." PLoS Genet **14**(1): e1007133.

Zhang, W. W., P. Lypaczewski and G. Matlashewski (2020). "Application of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania*." Methods Mol Biol **2116**: 199-224.

Zhang, W. W. and G. Matlashewski (2001). "Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection." Mol Microbiol **39**(4): 935-948.

Zhang, W. W. and G. Matlashewski (2019). "Single-Strand Annealing Plays a Major Role in Double-Strand DNA Break Repair following CRISPR-Cas9 Cleavage in *Leishmania*." mSphere **4**(4).

Zhang, W. W., S. Mendez, A. Ghosh, P. Myler, A. Ivens, J. Clos, D. L. Sacks and G. Matlashewski (2003). "Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection." J Biol Chem **278**(37): 35508-35515.

Zhao, C., B. Papadopoulou and M. J. Tremblay (2004). "*Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured *ex vivo* by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha." J Immunol **172**(5): 3086-3093.

Zijlstra, E. E. (2014). "PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses." PLoS Negl Trop Dis **8**(11): e3258.

Zou, J., W. Zhang, H. Zhang, X. D. Zhang, B. Peng and J. Zheng (2018). "Studies on Aminoglycoside Susceptibility Identify a Novel Function of KsgA To Secure Translational Fidelity during Antibiotic Stress." Antimicrob Agents Chemother **62**(10).

Zufferey, R., S. Allen, T. Barron, D. R. Sullivan, P. W. Denny, I. C. Almeida, D. F. Smith, S. J. Turco, M. A. Ferguson and S. M. Beverley (2003). "Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*." J Biol Chem **278**(45): 44708-44718.

8. Anexos

8.1 Certificado da aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

CERTIFICADO CEUA nº 94/2021



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Identificação e validação funcional de genes associados à suscetibilidade e resistência à paromomicina em *Leishmania spp.***, registrada com o nº **5719-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Elizabeth Magiolo Coser**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/03/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2021 a 31/07/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/03/2021 a 31/07/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	120
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	120 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas

CERTIFICADO CEUA nº 94/2021

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	10
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	CEMIB UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

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

Campinas, **06 de maio de 2021.**

 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente

 Rosangela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 06/05/2021, às 19:54 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 06/05/2021, às 16:14 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
34921753 1B5F4413 8A2FAE45 593CCD09



8.2 Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio)

INFORMAÇÃO SECAPA nº 3/2021



INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto **CIBio 2019/02 Tipo 2 - " Paromomicina no tratamento da leishmaniose tegumentar: investigação in vitro, in vivo e na identificação de marcadores moleculares associados à suscetibilidade e resistência"**, cujo pesquisador responsável é o **Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho**, sub-projeto "Identificação e validação funcional de genes associados à suscetibilidade e resistência à paromomicina em *Leishmania* spp.", da pós-graduanda **Elizabeth M. Coser**, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
28 de janeiro de 2021.

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia - Unicamp

CIBio/IB-Unicamp
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13083-862 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 – e-mail: comisib@unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 92DEF2D7 30514B27 877F57D6 9769BE8B

INFORMAÇÃO SECAPA nº 3/2021

Documento assinado eletronicamente por **JOSÉ LUIZ PROENÇA MODENA, PRESIDENTE DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA IB-UNICAMP**, em 28/01/2021, às 15:51 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
92DEF2D7 30514B27 877F57D6 9769BE8B



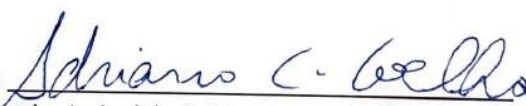
8.3 Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Identificação e validação funcional de genes associados à suscetibilidade e resistência à paromomicina em *Leishmania spp.***, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 18 de julho de 2024

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Elizabeth Magiolo Coser**
RG n.º 49.914.122-2

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Adriano Cappellazzo Coelho**
RG n.º 26.111.655-1

9. Produção Científica

Durante o período em que este trabalho foi desenvolvido (2020-2024), os seguintes trabalhos foram publicados:

1. Coser, E. M.; Ferreira, B. A.; Branco, N.; Yamashiro-Kanashiro, E. H.; Lindoso, J. A. L.; Coelho, A. C. (2020). Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility *in vitro* and the treatment outcome *in vivo*. ***International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance***, v. 14, p. 91-98, 2020.
2. Reimão, J. Q.; Coser, E. M.; Lee, M. R.; Coelho, A. C. (2020). Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. ***Microorganisms***, v. 8, p. 1632.
3. Coser, E. M.; Ferreira, B. A.; Yamashiro-Kanashiro, E. H.; Lindoso, J. A. L.; Coelho, A. C. (2021). Susceptibility to paromomycin in clinical isolates and reference strains of *Leishmania* species responsible for tegumentary leishmaniasis in Brazil. ***Acta Tropica***, v. 215, p. 105806, 2021.
4. Ferreira, B. A.; Martins, T. F. C.; Coser, E. M.; Oliveira, V. L.; Yamashiro-Kanashiro, E. H.; Rocha, M. C.; Pinto, M. M.; Cotrim, P. C.; Coelho, A. C. (2022). Isolation, typing, and drug susceptibility of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolates from dogs of the municipality of Embu das Artes, an endemic region for canine leishmaniasis in Brazil. ***Parasitology Research***, v. 121, p. 2683-2695.
5. Brioschi, M. B. C.; Coser, E. M.; Coelho, A. C.; Gadelha, F. R.; Miguel, D. C. (2022). Models for cytotoxicity screening of antileishmanial drugs: what has been done so far? ***International Journal of Antimicrobial Agents***, v. 60, p. 106612.
6. Ferreira, B. A.; Coser, E. M.; Saborito, C.; Yamashiro-Kanashiro, E. H.; Lindoso, J. A. L.; Coelho, A. C. (2023). *In vitro* miltefosine and amphotericin B susceptibility of strains and clinical isolates of *Leishmania* species endemic in Brazil that cause tegumentary leishmaniasis. ***Experimental Parasitology***, v. 246, p. 108462.
7. Ferreira, B. A.; Santos, G. A.; Coser, E. M.; Sousa, J. M.; Gama, M. E. A.; Júnior, L. L. B.; Pessoa, F. S.; Lima, M. I. S.; Uliana, S. R. B.; Coelho, A. C. (2023). *In Vitro* Drug Susceptibility of a *Leishmania (Leishmania) infantum* Isolate from a Visceral Leishmaniasis Pediatric Patient after Multiple Relapses. ***Tropical Medicine and Infectious Disease***, v. 8, p. 354.

8. Ferreira, B. A.; Coser, E. M.; de la Roca, S.; Aoki, J. I.; Branco, N.; Soares, G. H. C.; Lima, M. I. S.; Coelho, A. C. (2024). Amphotericin B resistance in *Leishmania amazonensis*: *In vitro* and *in vivo* characterization of a Brazilian clinical isolate. ***PLOS Neglected Tropical Diseases***. 18(5): e0012175.
9. Coser, E. M.; Aoki, J. I.; Saborito, C.; de la Roca, S.; Brufatto, J. P. T.; Angerami, R.; Stelini, R. F.; Velho, P. E. N. F., Coelho, A. C. Imported cutaneous leishmaniasis from Peru caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in a Brazilian patient: case report and *in vitro* drug susceptibility. – Artigo submetido em abril de 2024 na ***IDCases***.