

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CEPA ATENUADA DE
Leishmania infantum MEDIANTE DELEÇÃO DO GENE *KHARON1***

por

ANA MARIA MURTA SANTI

Belo Horizonte
2017

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR A.M.M. SANTI 2017

ANA MARIA MURTA SANTI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CEPA ATENUADA DE
Leishmania infantum MEDIANTE DELEÇÃO DO GENE *KHARON1***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Rubens Lima do Monte Neto

Coorientação: Silvane Maria Fonseca Murta

Belo Horizonte
2017

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S235o Santi, Ana Maria Murta.
2017

Obtenção e caracterização de uma cepa atenuada de *Leishmania Infantum* mediante deleção do gene *Kharon1* / Ana Maria Murta Santi. – Belo Horizonte, 2017.

xvii, 127 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 102 - 139

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose Visceral/patologia 2. *Leishmania Infantum*/genética 3. Vacinas/uso terapêutico I. Título. II. Monte Neto, Rubens Lima do (Orientação). III. Murta, Silvane Maria Fonseca (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

ANA MARIA MURTA SANTI

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CEPA ATENUADA DE
Leishmania infantum MEDIANTE DELEÇÃO DO GENE *KHARON1***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rubens Lima do Monte Neto (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Santuza Teixeira (UFMG) Titular

Profa. Dra. Andrea Teixeira (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 17/02/2017

*“Não tenha medo de trabalho duro.
Nada que vale a pena vem facilmente.”*

Gertrude B. Elion

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e por todas as coisas boas que vivi.

À minha família por ser morada da minha verdadeira felicidade e onde encontro todas as minhas forças.

Ao Dr. Rubens Lima do Monte Neto e à Dra. Silvane Maria Fonseca Murta pela oportunidade de participar desse trabalho, pela excelente orientação e por todos ensinamentos, tão preciosos para minha formação.

Às Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira, Dra. Rosiane Aparecida da Silva Pereira e Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, por aceitarem o nosso convite para compor a banca examinadora.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou- FIOCRUZ-MG, na pessoa da Dra. Zélia Maria Profeta da Luz, pela excelente estrutura oferecida.

Às Agências de Fomento: CNPq; CAPES; FAPEMIG e ISID.

Às Plataformas de Citometria, de PCR em Tempo Real, de Sequenciamento e de Microscopia e Microanálise de Imagens pelos serviços oferecidos.

Às equipes do Biotério, da Central de Esterilização, da Limpeza, da Manutenção, e da Portaria, essenciais para o bom funcionamento do CPqRR, pela agradável convivência diária.

À Rosana, Rhudyara, Kênia e Graça por toda dedicação na organização do laboratório e na grande ajuda para solução dos problemas.

Aos amigos do GFP e LQPN por toda ajuda, amizade e encorajamento nessa etapa: Agna, Armando, Bethânia, Bruna, Christiana, Daniela, Douglas, Edinéia, Elisângela, Ellen, Isabel, Jerônimo, Larissa, Luiza, Maísa, Mariana Eduarda, Mariana Xavier, Nayara, Paula, Policarpo, Renata, Roberta e Tamara.

RESUMO

Apesar da vacinação ser considerada a melhor estratégia para prevenir a infecção por *Leishmania*, não existe até o momento nenhuma vacina segura e eficaz para uso humano disponível. As vacinas atenuadas, consideradas padrão-ouro para proteção contra patógenos intracelulares, têm sido largamente estudadas como estratégia de imunização contra as leishmanioses. Dessa forma, com o objetivo de obter uma cepa atenuada de *Leishmania*, foi realizado o nocaute do gene *Kharon1* (*Kh1*) em *L. infantum*, o qual foi descrito como sendo essencial para citocinese das formas amastigotas de *L. mexicana*. Os mutantes *LiKh1*^{-/-} foram obtidos com sucesso por meio de recombinação homóloga e a deleção de ambas as cópias do gene foi confirmada por PCR, qPCR e *Southern blot*. Em seguida foram também obtidos mutantes complementados nos quais o gene *Kh1* foi reinserido nos parasitos *LiKh1*^{-/-} (*add-back*). Apesar das formas promastigotas dos mutantes *LiKh1*^{-/-} não apresentaram alteração do crescimento quando comparadas com *LiWT*, parasitos *LiKh1*^{-/-} apresentam alteração morfológica, que não é detectada nos parasitos complementados. Apesar de *Kh1* estar indiretamente relacionado com o transporte de glicose, os mutantes *LiKh1*^{-/-} não apresentaram alteração da captação de glicose e nem alteração na sensibilidade ao antimônio. Por outro lado, as formas amastigotas de *LiKh1*^{-/-} foram incapazes de manter a infecção em macrófagos humanos ou murinos, formando estruturas multinucleadas que não sobrevivem por mais de 16 dias *in vitro*. A análise do ciclo celular dos mutantes demonstrou que as amastigotas *LiKh1*^{-/-} apresentam retenção em G₂/M, confirmando que os mutantes *LiKh1*^{-/-} apresentaram defeito na citocinese. Os parasitos deficientes em *Kh1* também possuem menor capacidade de manter a infecção *in vivo*, até mesmo em camundongos imunossuprimidos. A deleção do gene *Kh1* não interferiu na produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais murinos. Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* nesse trabalho demonstram que os parasitos *LiKh1*^{-/-} apresentam fenótipo atenuado, devido à alteração na divisão celular. Esses parasitos poderão ser futuramente testados como potenciais candidatos vacinais contra as leishmanioses.

Palavras-chave: *Leishmania*, *Kharon1*, cepa viva atenuada, vacina

ABSTRACT

Although vaccination is the most suitable approach to prevent *Leishmania* infection, there is no safe and efficacious vaccine against human leishmaniasis available. Live attenuated vaccines - golden-standard against intracellular pathogens - also have been used as strategy for immunization against *Leishmania*. In order to obtain an attenuated *Leishmania* parasite for vaccine purposes, we performed KO of *L. infantum* *Kharon1* (*KH1*) gene - a target that was previously associated with growth defects in the amastigote stage of *L. mexicana* - by two rounds of conventional homologous gene replacement. *LiKH1^{-/-}* mutants were confirmed by PCR, qPCR and *Southern blot*. We also generate a *Kh1 add-back* line with an episomal copy of *Kh1*. Despite there is no difference between the growth of *LiKh1^{-/-}* promastigotas when compared with *LiWT* parasites, we observed morphological alterations in those mutants. Although *Kh1* mediates flagellar targeting of a glucose transporter, there is no difference in the glucose uptake of the mutants when compared with the WT line and there is no change in the sensitivity of the parasites to antimony. On the other hand, *LiKH1^{-/-}* amastigotes was not able to sustain the infection in neither human THP-1 macrophages or murine peritoneal macrophages, forming multinucleate cells that unable to survive more than 16 days. The cell cycle analysis of *LiKh1^{-/-}* amastigotes shows an accumulation of cells in the G₂/M phase, indicating a cytokinesis defect. The *LiKH1^{-/-}* mutants displayed an attenuated growth *in vivo*, even in immunosuppressed mice. The *Kh1* deletion did not interfere with the production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages. Taken together, these results shows that these *LiKH1^{-/-}* parasites present a atennuated phenotype due to a cytokinesis defect. These *LiKH1^{-/-}* parasites could be further tested as a potential vaccine against leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*; *Kharon1*; live attenuated strain; vaccine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica das principais espécies de <i>Leishmania</i> , seus vetores e reservatórios.....	20
Figura 2. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	22
Figura 3. Alterações morfológicas em promastigotas de <i>L. major</i> durante a mitose.....	23
Figura 4. Critério morfológico usado para discriminar entre as diferentes formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	24
Figura 5. Mapa do vetor pGEM [®] -T Easy (Promega).....	51
Figura 6. Mapa do vetor pSP72αZEOα.....	52
Figura 7. Construção dos cassetes por PCR de Fusão.....	61
Figura 8. Triagem de colônias por perfil de restrição enzimática.....	62
Figura 9. Purificação dos cassetes.....	62
Figura 10. Construção do plasmídeo pSP72αZEOα::Kh1.....	64
Figura 11. Deleção do gene <i>Kh1</i> por recombinação homóloga usando os cassetes NEO e HYG.....	67
Figura 12. Padronização da qPCR. Amplificação dos genes <i>Kh1</i> , GAPDH e DNA polimerase por qPCR.....	69
Figura 13. Comparação do número de cópias do gene <i>Kh1</i> nos mutantes.....	70
Figura 14. <i>Southern blot</i> para confirmar a deleção de <i>Kh1</i> em <i>L. infantum</i>	72
Figura 15. Crescimento das formas promastigotas mediante perda do gene <i>Kh1</i>	73
Figura 16. Morfologia das formas promastigotas ao longo da curva de crescimento.....	74
Figura 17. Sensibilidade dos mutantes WT, <i>Kh1</i> ^{+/-} e <i>Kh1</i> ^{-/-} ao antimônio.....	75
Figura 18. Captação de glicose por formas promastigotas de WT e <i>Kh1</i> ^{-/-}	76

Figura 19. Análise da infectividade dos parasitos <i>Kh1^{-/-}</i> em macrófagos THP-1.	79
Figura 20. Análise da infectividade dos parasitos <i>LiKh1^{-/-}</i> em macrófagos peritoneais murinos.	80
Figura 21. Análise quantitativa do número de núcleos dos parasitos.....	81
Figura 22. Comparação da morfologia das amastigotas WT e <i>Kh1^{-/-}</i> por microscopia ótica.....	82
Figura 23. Avaliação do ciclo celular dos mutantes de <i>L. infantum Kh1^{-/-}</i>	83
Figura 24. Infecção por parasitos <i>Kh1^{-/-}</i> não estimula a produção de óxido nítrico.	84
Figura 25. Carga parasitária de camundongos infectados com <i>L. infantum</i> WT e <i>Kh1^{-/-}</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores e Sondas utilizados no estudo	48
Tabela 2. Condições das Reações de PCR.....	49
Tabela 3. Marcadores de resistência usados no estudo	54
Tabela 4. Esquema de infecção dos Camundongos.....	59
Tabela 5. Mutantes gerados no estudo.....	65
Tabela 6. Infecção de camundongos e recuperação dos parasitos	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - porcentagem/por cento

® - Marca registrada

°C - Graus Celsius

μF – Microfaraday

μg – Micrograma

μL - Microlitro

μM – Micromolar

2-NBDG - 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose

A2 - Antígeno específico de amastigotas de *Leishmania*

α-MEM - Meio de cultura de células (*Minimum Essential Medium α*)

AMP – Ampicilina

β – Beta

BleO - Gene que confere resistência à bleomicina

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

Cas - *CRISPR associated proteins*

CD4⁺ - Linfócitos T auxiliares

CD8⁺ - Linfócitos T citotóxicos

CRISPR - *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*

Δ – Delta

Da – Daltons

DC - Célula dendrítica

dCTP³² - Fósforo 32 radioativo

DiCre - Recombinase dimerizável

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPP - Teste rápido (*Dual Plath Platform*)

dsRBP - *dsRNA binding protein*

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA -Teste imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Fcγ - Receptores de imunoglobulinas

γ - Gama

g - unidade de Força G (força gravitacional ou força centrífuga relativa)

G418 - Antibiótico com estrutura similar à gentamicina B1

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

gp63 - Protease de superfície presente em *Leishmania*

h - hora(s)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HASPB - *Recombinant hydrophilic acylated surface protein B1*

HCl - Ácido clorídrico

HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico

HFS - solução fluorocrômica hipotônica

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

Hyg - *Hygromycin phosphotransferase* (gene que confere resistência à higromicina)

IC₅₀ - concentração inibitória de 50 % do crescimento

IFI - Imunofluorescência indireta

IFN- γ - Interferon-gama

IL – Interleucina

IPTG – isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

K₂HPO₄ – Fosfato de potássio dibásico

kb – Kilobase

KCl - cloreto de potássio

kDa – Quilodalton

kDNA - DNA mitocondrial (do cinetoplasto)

Kh - Kharon (*T. brucei*)

Kh1 - Kharon1 (*Leishmania*)

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

KMP11 - *Kinetoplastid Membrane Protein-11*

L – Litro

L3/L5 - proteínas ribossomais L3 e L5 de *L. major*

LACK - *Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase

LB - Meio de cultivo Luria-Bertani

LdSir2HP - Silent Information regulatory-2 (SIR2 family or sirtuin) protein

LeishF1 – Leish-111f – Poliproteína de *Leishmania*

LeishH1 – histona H1 de *L. infantum*

LiWT - *L. infantum* selvagem

LiKh1^{-/-} - *L. infantum* nocaute para o gene *Kh1* (null mutante)

LiKh1^{-/-}[pSP72 α ZEO α ::Kh1] - *L. infantum* nocaute para o gene *Kh1* com reinserção do gene *Kh1* (add-back)

LiKh1^{-/-}[pSP72 α ZEO α :: \emptyset] - *L. infantum* nocaute para o gene *Kh1* com vetor vazio

LiKh1^{-/+} - *L. infantum* nocaute em uma das cópias do gene *Kh1* (single nocaute)

LmxGT - transportador de glicose de *L. mexicana*

LPG – Lipofosfoglicano

LT - Linfócitos T

LT – Leishmaniose tegumentar

LV - Leishmaniose visceral

M – Molar

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg – Miligramas

min - minuto(s)

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mRNA - RNA mensageiro

MS – Ministério da Saúde

Na₂H₂PO₄– Fosfato de sódio dibásico

NaCl - Cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato de sódio monobásico

NaOH – hidróxido de sódio

Neo - *Neomycin phosphotransferase* (Gene que confere resistência à neomicina)

NETs - *neutrophil extracellular traps*

ng – Nanogramas

nm – nanômetro

NO – óxido nítrico

∅ – vazio

O₂⁻ - Radical superóxido

oligo-d(T) – pequena sequência de nucleotídeos de deoxitimina

ONOO⁻ - Peroxinitrito

ORF - Sequência potencialmente codificante (*open reading frame*)

ORFF - Open-reading frame do locus LD1 de *L. donovani*

PAM - protospacer adjacent motif

PapLe22 - antígeno de *L. infantum*

pb – Pares de bases

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pGEM[®]-T Easy – vetor

pH - Potencial Hidrogeniônico

PI - Iodeto de propídeo

PM - Padrão de peso molecular

PPG – Proteofosfoglicanos

pSP72 α ZEO α – *vetor*

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RISC - *RNA-induced-silencing complex*

RNA - Ácido ribonucleico

RNAse – Ribonuclease

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPMI-1640 - Meio de cultura (meio Roswell Park Memorial Institute)

rRNA - RNA ribossomal

qPCR - PCR quantitativa em Tempo Real

SbIII - Antimônio trivalente

SbV – Antimônio pentavalente

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

sgRNA - RNA guia (*single guide RNA*)

SSC - *saline-sodium citrate*

SSU - unidade menor do RNA ribossomal (Small subunit ribosomal RNA)

T4 DNA ligase - Enzima que liga extremidades (coesivas ou não) de DNA dupla fita e alguns híbridos de DNA/RNA

T_H1 - T helper 1

T_H2 - T helper 2

THP-1 - célula de linhagem monocítica humana derivada de leucemia monocítica crônica

™ - *Trade Mark*

TNF- α - Fator de necrose tumoral

TOP10F' - cepa de E. coli quimiocompetente

Tris-HCl - *2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol*

Triton X-100 - *Éter terc-octilfenil polietileno glicol*

Tween-20 - Polioxietileno (20) sorbitam monolaurato

UTR - Região não codificante (untranslated region)

UV - Radiação ultravioleta

V – Volts

WHO - Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

X-Gal - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside*

Zeo – Droga Zeocina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Epidemiologia	18
1.2	Ciclo biológico e interação parasito-hospedeiro	21
1.3	Formas clínicas	27
1.3.1	Leishmaniose Cutânea:	28
1.3.2	Leishmaniose mucosa:	29
1.3.3	Leishmaniose disseminada:	29
1.3.4	Leishmaniose Visceral:	29
1.4	Diagnóstico	30
1.5	Tratamento	31
1.6	Prevenção e Controle	32
1.7	Vacina	33
1.8	Genoma	37
1.9	Manipulação genética de <i>Leishmania</i>	38
1.9.1	Deleções	39
1.9.2	Silenciamento	40
1.9.3	Superexpressão	41
1.10	A proteína Kharon1	42
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo Geral	45
3.2	Objetivos Específicos	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Cultivo e manutenção dos parasitos	46
4.2	Cultivo e manutenção das células THP-1	46
4.3	Extração de DNA genômico	46
4.4	Produção das construções destinadas à deleção de KH1	47
4.5	Eletroforese de DNA em gel de agarose	50
4.6	Preparo de Células Cálcio competentes	50
4.7	Clonagem dos cassetes de deleção de <i>Kh1</i> em pGEM-T easy	50
4.8	Sequenciamento	51
4.9	Clonagem do gene <i>Kh1</i> em vetor pSP72αZEOα	52
4.10	Transfecções em formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	53
4.11	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmar deleções	54
4.12	Quantificação do número de cópias gênicas	54

4.13	<i>Southern blot</i>	55
4.14	Curva de Crescimento das formas promastigotas.....	55
4.15	Avaliação da suscetibilidade dos mutantes <i>Kh1^{-/-}</i> ao antimônio	56
4.16	Modulação do transporte de glicose nos mutantes <i>Kh1^{-/-}</i>	56
4.17	Infecção de células THP-1	56
4.18	Infecção de Macrófagos peritoneais murinos.....	57
4.19	Avaliação da produção de óxido nítrico pelo método de Griess	57
4.20	Avaliação do ciclo celular dos mutantes <i>Kh1^{-/-}</i>	58
4.21	Infecção de camundongos e recuperação dos parasitos	59
4.22	Diluição limitante	59
5	RESULTADOS	60
5.1	Produção das construções destinadas à deleção do gene <i>Kh1</i>	60
5.2	Clonagem do gene <i>Kh1</i> em vetor pSP72αZEOα	63
5.3	Transfecções em <i>L. infantum</i>	64
5.4	<i>Kh1</i> não é um gene essencial para <i>L. infantum</i>	66
5.5	A deleção de <i>Kh1</i> não altera o crescimento das formas promastigotas, mas modifica sua morfologia	73
5.6	A deleção de <i>Kh1</i> não altera a sensibilidade das formas promastigotas ao antimônio	75
5.7	A deleção de <i>Kh1</i> não altera a captação de glicose por formas promastigotas	76
5.8	Parasitos <i>LiKh1^{-/-}</i> não são capazes de manter a infecção em macrófagos....	77
5.9	Mutantes <i>Kh1^{-/-}</i> apresentam alteração no ciclo celular	83
5.10	Infecção por parasitos <i>LiKh1^{-/-}</i> não interfere na produção de óxido nítrico	84
5.11	Infecção de camundongos e recuperação dos parasitos	85
5.12	Resumo dos resultados.....	88
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÃO	100
8	PERSPECTIVAS	101
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXOS	140
	ANEXO I	140
	ANEXO II	141
	ANEXO III	1412
	ANEXO IV	1413
	ANEXO V	144

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de graves doenças negligenciadas, de caráter zoonótico ou antroponótico, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae) (Ross, 1903). As leishmanioses podem ser classificadas em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) e são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de insetos flebotomíneos das diferentes espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Já foram descritas cerca de cinquenta e três espécies de *Leishmania*, sendo que dessas, vinte e uma são capazes de causar doença em humanos. Originalmente a classificação dos parasitos do gênero *Leishmania* era feita com base na morfologia, na patogenia e na distribuição geográfica (Adler 1964; Lainson & Shaw 1972; Lainson & Shaw 1973). Atualmente os parasitos são classificados em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com o desenvolvimento dos parasitos no inseto vetor e com base em marcadores moleculares filogenéticos (Lainson, Ward, and Shaw 1987; Shaw et al. 1991; Boité et al. 2012).

1.1 Epidemiologia

Recentemente, 98 países, distribuídos na Europa, África, Ásia, Américas e Oceania, reportaram a transmissão endêmica de leishmanioses; doenças que afetam principalmente populações pobres e marginalizadas. As leishmanioses são a segunda doença parasitária que causa maior mortalidade - cerca de 20.000 a 30.000 mortes anuais - ficando atrás apenas da malária. Anualmente são reportados mais de 58.000 casos de LV e 220.000 casos de LT. Entretanto, devido às altas taxas de subnotificação, estima-se que ocorram anualmente mais de 2 milhões de casos de leishmaniose (Alvar et al. 2012; Kevric, Cappel, and Keeling 2015).

Enquanto a LT apresenta distribuição geográfica ampla, com a maioria dos casos ocorrendo no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica Paquistão e Peru; a LV apresenta alta concentração de casos, sendo mais de 90 % dos casos ocorrem em apenas 6 países: Índia, Somália, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (Alvar *et al.*

2012; WHO, 2014). A Figura 1 esquematiza a distribuição geográfica mundial das principais espécies *Leishmania*, seus vetores e reservatórios.

No Brasil as leishmanioses são doenças de notificação compulsória e constituem um grave problema de saúde pública, estando amplamente distribuídas por todo território nacional (Ministério da Saúde 2016). Nos últimos anos o número de casos da doença vem aumentando. No período de 2003 a 2007, foram reportados uma média de 3.481 casos de LV e 26.008 casos LT por ano no país, sendo que em 2006 a taxa de mortalidade por LV reportada no país foi de 7,2 %. Estima-se que nesse mesmo período possam ter ocorrido até 6.300 casos anuais de LV e até 119.600 de LT (Alvar *et al.* 2012; Karagiannis-Voules *et al.* 2013).

A ocorrência dos casos de leishmaniose se correlaciona diretamente com variáveis socioambientais e socioeconômicas, de forma que as populações pobres são as mais afetadas pela doença. As áreas com as maiores incidências de casos de LT no Brasil são áreas de desmatamento e áreas que apresentam clima ameno e com alta umidade. Apresenta maior incidência em homens, no geral devido à exposição ocupacional (Ministério da Saúde 2013). Por outro lado, no caso da LV, o principal reservatório é o cão, e nos últimos anos a doença tem se tornado de caráter eminentemente urbano. A maior incidência de casos de LV ocorre em crianças menores de 10 anos, devido principalmente à imaturidade do sistema imunológico e à desnutrição. (Karagiannis-Voules *et al.* 2013; Ministério da Saúde 2014).

A busca por alternativas para controle e erradicação das leishmanioses é considerada uma prioridade pela Organização Mundial da Saúde (WHO 2012).

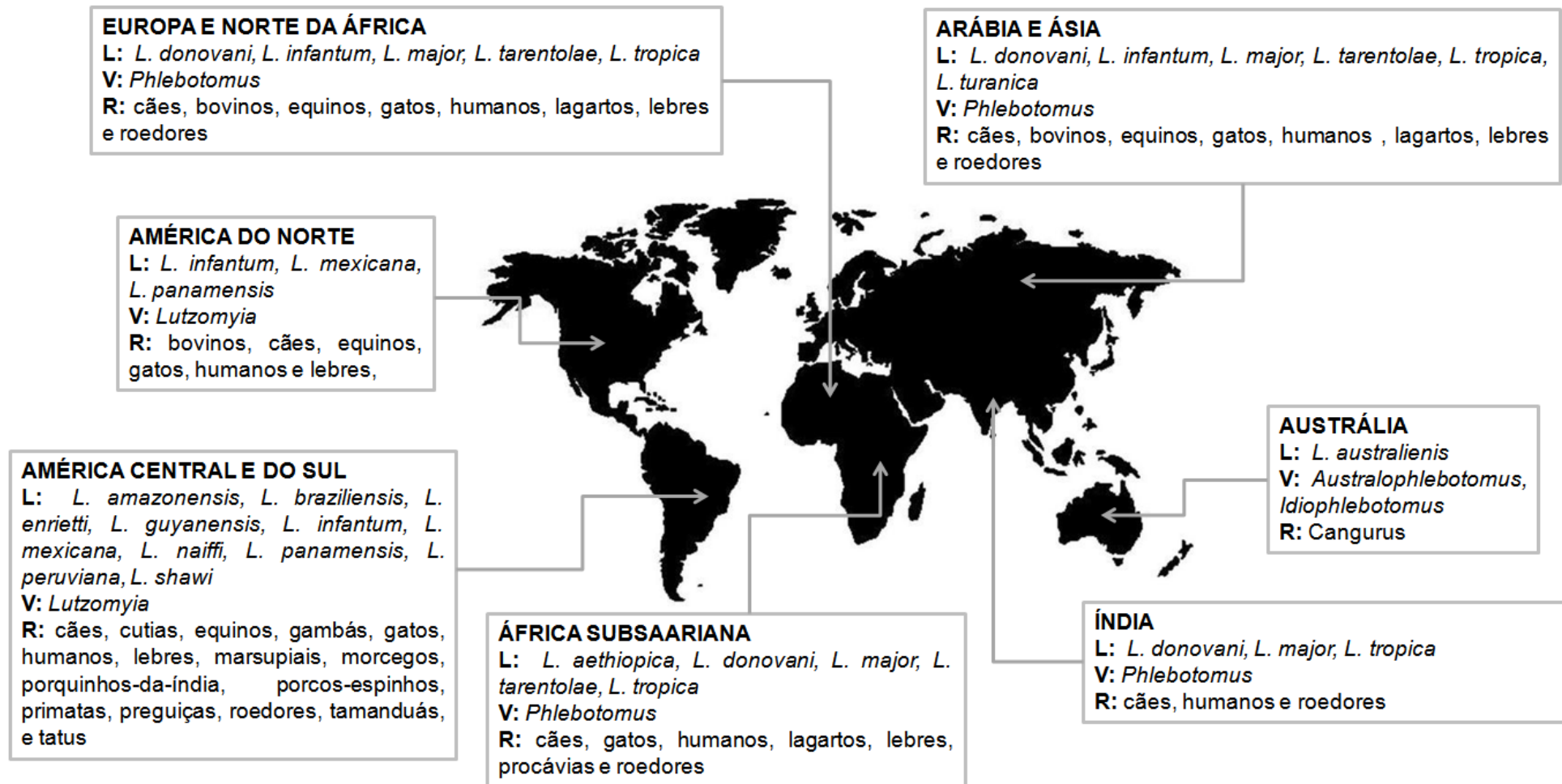


Figura 1. Distribuição geográfica das principais espécies de *Leishmania*, seus vetores e reservatórios. L: *Leishmania*; V: Vetores; R: Reservatórios (Adaptado de Akhoundi *et al.* 2016)

1.2 Ciclo biológico e interação parasito-hospedeiro

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo heteroxênico, passando por um hospedeiro invertebrado e por um hospedeiro vertebrado. Os hospedeiros vertebrados são mais comumente os roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos e primatas, incluindo o homem (Figura 1). Os flebotomíneos, insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae são os hospedeiros invertebrados. De forma simplificada, no Velho Mundo (Europa, África e Ásia) os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos por espécies do gênero *Phlebotomus*, enquanto que no Novo Mundo (Américas e Oceania) as espécies do gênero *Lutzomyia* fazem esse papel (Desjeux 1996; Quinnell and Courtenay 2009; Stockdale and Newton 2013; Akhoundi et al. 2016). Dentre as mais de 800 espécies de flebotomíneos descritas, aproximadamente 375 são encontradas no Velho Mundo e cerca de 464 no Novo Mundo. Dentre estas, 31 são comprovadamente capazes de transmitir *Leishmania* no Velho Mundo e 47 no Novo Mundo, sendo que esse número pode ser bem maior (Seccombe et. al 1993; Galati 2003). O esquema do ciclo da leishmaniose pode ser observado na Figura 2.

Nos flebotomíneos as leishmanias são encontradas como promastigotas, móveis e delgadas, com 10 a 40 μM de comprimento, um longo flagelo em sua porção anterior e núcleo arredondado na região mediana ou anterior. O cinetoplasto, que encerra o DNA mitocondrial, localiza-se entre a região anterior e o núcleo (Hoare and Wallace 1966; Gossage, Rogers, and Bates 2003; Ambit et al. 2011; Wheeler, Gluenz, and Gull 2011).

Promastigotas dos diferentes subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*) apresentam comportamentos distintos em seus vetores. Espécies do subgênero *Leishmania* se desenvolvem em regiões do trato digestivo anteriores ao piloro, em especial no intestino médio. Por outro lado, os parasitos do subgênero *Viannia*, encontrados no Novo Mundo, iniciam seu desenvolvimento no vetor em regiões posteriores do trato digestivo e depois migram para porções anteriores (Lainson, Ward, and Shaw 1987).

A multiplicação das formas promastigotas, por divisão binária simples, ocorre no sentido ântero-posterior do parasito. A divisão e segregação do núcleo e do cinetoplasto não ocorrem de forma sincronizada, e, em diferentes espécies de *Leishmania*, esses eventos podem ocorrer em ordens variadas. Em *L. major* e *L.*

tarentolae a divisão do cinetoplasto se completa antes do fim da divisão nuclear. Já em *L. mexicana* e *L. donovani* esses eventos ocorrem em ordem inversa. A duplicação do flagelo em *L. major* termina antes da duplicação do cinetoplasto, como podemos observar na Figura 3 (Simpson 1964; Havens et al. 2000; Tammana et al. 2010; Minocha 2011; Wheeler, Gluenz, and Gull 2011; Ambit et al. 2011).

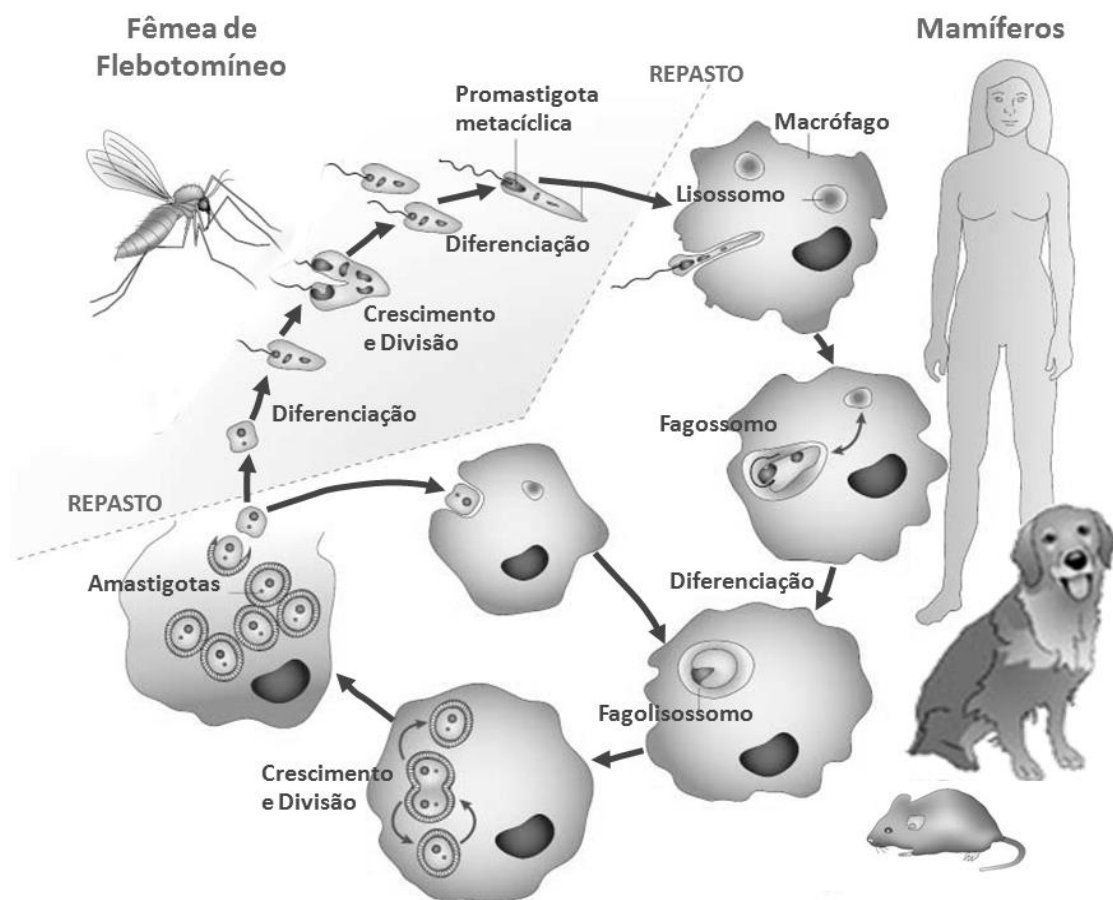
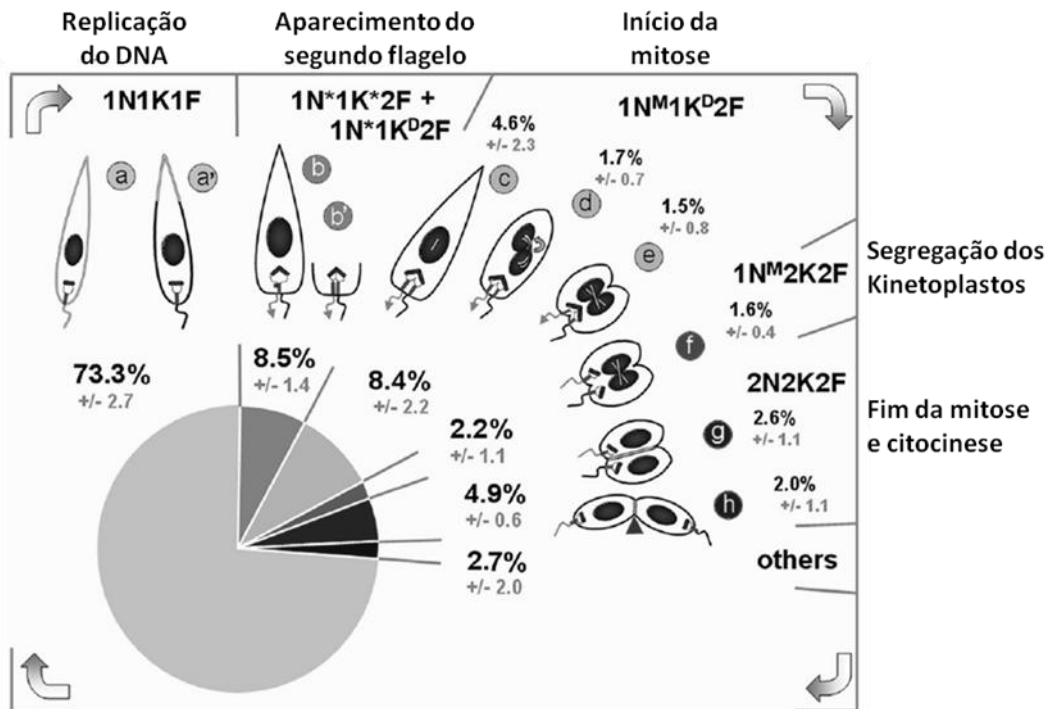


Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania*. Formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são transmitidas para os hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos e no interior do fagolisossomo se transformam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam e saem dos macrófagos, podendo infectar outros macrófagos ou serem transmitidas para fêmeas de flebotomíneos. No trato digestivo dos flebotomíneos, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas que passam por processo de divisão. Posteriormente, se transformam em promastigotas metacíclicas, infectantes, que não se dividem. Essas formas migram para a válvula do estomodeu do vetor, sendo então transmitidas durante o repasto sanguíneo (Adaptado de Sacks & Noben-trauth 2002).

A)



B)

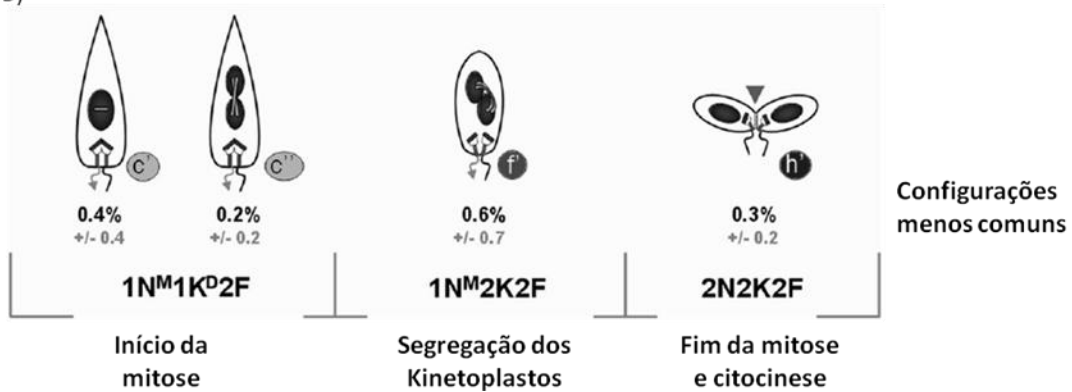



Figura 3. Representação esquemática das configurações morfológicas de promastigotas de *L. major* ao longo do ciclo celular. Na figura estão representados o número de núcleos (N), de cinetoplastos (K) e de flagelos (F) em cada configuração. Também estão indicadas as porcentagens da população correspondentes a cada configuração. Os asteriscos indicam se a organela se encontra em S ou G2; M indica mitose nuclear e K indica divisão do cinetoplasto (D). A) Configurações mais abundantes na população; B) Configurações menos frequentes que foram omitidas em A. (Adaptado de Ambit *et. al*, 2011).



	Procílicas	Nectomonadas	Leptom onadas	Metacíclicas
Comprimento (μm)	6,5 - 11,5	> 12	6,5 - 11,5	6,5 - 11,5
Largura (μm)	> 1,5	> 1,5	> 1,5	<1,5
Relação entre o flagelo (F) e o corpo (C)	F<C	—	F>C	F>C

Figura 4. Critério morfológico usado para discriminar entre as diferentes formas promastigotas de *L. infantum*. (Adaptado de Lei & Romine, 2010)

No vetor as promastigotas passam por vários estágios de desenvolvimento, caracterizados por alterações morfológicas e funcionais. Nesse processo, denominado metaciclo, os parasitos se apresentam inicialmente como promastigotas procíclicas, que se diferenciam sequencialmente em formas nectomonadas, haptomonadas, leptomonadas e por fim em promastigotas metacíclicas (Kamhawi 2006) (Figura 4). As promastigotas metacíclicas têm o corpo pequeno, flagelo muito longo e se movimentam rapidamente. Essas formas são transmitidas para os vertebrados pela picada das fêmeas de flebotomíneos (Sacks and Perkins 1984). De forma semelhante ao que ocorre no ciclo natural da doença, em cultura as formas leptomonadas predominam durante a fase logarítmica de crescimento (Lei, Romine, and Beetham 2010; Lei et al. 2010) e as formas metacíclicas estão presentes durante a fase estacionária, sendo aquelas com maior capacidade de infecção (Sacks & Perkins 1984,1985; Gossage *et al.* 2003).

Durante o repasto sanguíneo, além de inocular as formas promastigotas metacíclicas, os flebotomíneos também inoculam saliva, que tem papel fundamental no sucesso do repasto sanguíneo: nela está presente uma variedade de substâncias, como anticoagulantes, peptídeos vasodilatadores, e substâncias para impedir a agregação plaquetária (Ribeiro *et al.* 1988; Charlab *et al.* 1999; Ribeiro *et al.* 2003). Além disso, a saliva é responsável por modular a resposta imune do hospedeiro, diminuindo a ativação de linfócitos T e inibindo a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos macrófagos, favorecendo a infecção por *Leishmania* (Theodos & Titus 1993; Hall and Titus 1995; Soares et al. 1998).

Ao serem inoculadas no hospedeiro vertebrado, as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos, que são as primeiras células a serem atraídas para o sítio da picada, e posteriormente por macrófagos e células dendríticas (Rittig and Bogdan 2000). Os neutrófilos podem também matar os parasitos pela liberação de NETs (*neutrophil extracellular traps*) que são compostas de DNA, histonas e proteínas, como a elastase (Guimarães-Costa *et al.* 2009; Rochael *et al.* 2015). Os neutrófilos infectados podem ser fagocitados por macrófagos e contribuem para que as leishmanias entrem de forma silenciosa nessas células (teoria do “Cavalo de Tróia”) (van Zandbergen *et al.* 2004; Peters *et al.* 2008; Gueirard *et al.* 2008; Ribeiro-Gomes *et al.* 2012).

Diferentes espécies de *Leishmania* podem interagir com diferentes receptores do macrófago, como receptores do complemento, receptores de manose, receptores de fibronectina ou receptores de imunoglobulinas Fcγ (Uenoa and Wilson 2013). A infectividade das leishmanias depende de vários fatores presentes em sua superfície como por exemplo a metaloprotease GP63 e o lipofosfoglicano (LPG), pois essas moléculas são importantes alvos para várias opsoninas, atraindo neutrófilos e monócitos para o sítio de picada e favorecendo a internalização dos parasitos (Olivier *et al.* 2012). Além disso, GP63, é um fator de virulência, presente em ambas formas dos parasitos (Schneider *et al.* 1992), que auxilia na aderência dos parasitos aos macrófagos (Brittingham *et al.* 1999) e também interfere em vias de sinalização dessas células (Olivier *et al.* 2012). O LPG também é um importante fator de virulência, sendo um dos componentes mais abundantes na superfície das formas promastigotas (Turco & Descoteaux, 1992). Nos hospedeiros vertebrados o LPG é responsável, por exemplo, por prevenir a lise dos parasitos pelo sistema complemento (Puentes *et al.* 1989) e por interferir na resposta anti-inflamatória (Becker *et al.* 2003).

Outros fatores importantes para internalização das leishmanias são: (I) a composição da membrana plasmática do macrófago, sendo o colesterol e os microdomínios de lipídio essenciais para a infecção; e (II) a integridade do citoesqueleto de actina dos macrófagos (Liu, Uzonna, and Bengoechea 2012; Duque and Descoteaux 2015; Podinovskaia and Descoteaux 2015).

Após a internalização, os fagolisossomos do macrófago contendo as leishmanias se fundem com lisossomos, formando fagolisossomos, ricos em enzimas hidrolíticas e com baixo pH. Além disso, os macrófagos produzem

óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) como por exemplo o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o e o peroxinitrito ($ONOO^-$), que são responsáveis por eliminar os patógenos fagocitados (Lima-Junior *et al.* 2013). Outros fatores de estresse no novo hospedeiro são o aumento da temperatura e a mudança na disponibilidade de nutrientes. No entanto, a *Leishmania* desenvolveu uma série de mecanismos para sobreviver e replicar nesse microambiente hostil: as promastigotas se diferenciam em formas amastigotas, que são arredondadas e medem de 3 a 4 μ M. Possuem núcleo grande e arredondado, cinetoplasto em bastonete e flagelo vestigial intracitoplasmático, que raramente pode ser observado. As amastigotas possuem taxas de crescimento mais baixas e um metabolismo distinto, com diminuição da utilização de glicose e aminoácidos e aumento da β -oxidação de ácido graxos (Mcconville *et al.* 2007; Naderer and Mcconville 2008; Naderer and Mcconville 2011; Podinovskaia and Descoteaux 2015).

As leishmanias possuem uma via antioxidante única e muito eficiente, que se baseia na síntese e redução da tripanotona, que reduz as espécies reativas de oxigênio produzidos pelo macrófago. As leishmanias também expressam a enzima ferro-superóxido dismutase, que transforma o O_2^- em H_2O_2 ; e as enzimas triparredoxina e peroxirredoxina, as quais têm importante papel na redução do H_2O_2 (Krauth-siegel and Comini 2008; Assche *et al.* 2011).

Outros mecanismos de escape utilizados pelas leishmanias incluem a interferência na sinalização celular dos macrófagos; a subversão das vias de sinalização dos receptores *Toll-like*; a contenção do processo inflamatório; o controle da apresentação de antígenos; a redução da ativação dos macrófagos; a modulação da produção de citocinas e quimiocinas; a modificação das respostas de linfócitos T e a indução de autofagia (Gupta, Oghumu, and Satoskar 2013; Podinovskaia and Descoteaux 2015).

O tamanho do vacúolo parasitóforo pode variar, dependendo da espécie de *Leishmania*. Enquanto que para *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum* cada parasito se encontra em um pequeno vacúolo, parasitos das espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana* se encontram em um único vacúolo grande, comum para todas as amastigotas presentes naquela célula (Antoine *et al.* 1998; Courret *et al.* 2002). Após sucessivas multiplicações das amastigotas no interior dos macrófagos ocorre a última etapa no ciclo de vida das leishmanias: a

liberação das amastigotas, as quais podem ser então internalizadas por outros macrófagos ou infectar flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. A liberação pode ocorrer com ou sem morte da célula hospedeira. Ao evadir, as leishmanias retêm componentes da célula hospedeira em sua superfície (de forma que não ocorre exposição ao meio extracelular) e são seletivamente internalizadas por macrófagos adjacentes. Essa transferência célula-célula também constitui um ponto fundamental para o estabelecimento do parasito no hospedeiro, pois permite escapar do sistema imune e modular a produção de citocinas (Real *et al.* 2014).

1.3 Formas clínicas

As leishmanioses podem se manifestar de diferentes formas, que são didaticamente divididas em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). Tanto a LT quanto a LV são doenças espectrais, sendo que a LT pode ser subdividida em leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e leishmaniose difusa; enquanto que a LV pode se apresentar como assintomática, oligossintomática ou clássica. Vários fatores contribuem para ocorrência dessas diferentes formas clínicas: características do vetor, como composição da saliva e inóculo de *Leishmania*; características da espécie de *Leishmania*, como tropismo e virulência; e características do hospedeiro, como a idade, o estado nutricional e o status imunológico (Herwaldt 1999; Murray *et al.* 2005; Lipoldová and Demant 2006).

A resposta imune está intimamente relacionada com o desenvolvimento de diferentes formas clínicas. As respostas iniciais do sistema imune adaptativo contra a infecção por *Leishmania* são protagonizadas por neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Posteriormente ocorre a ativação dos linfócitos, efetores das respostas imunes adaptativas celular e humoral. Como a *Leishmania* é um parasito intracelular, a resposta humoral não tem papel importante no controle da doença, e a resolução da infecção depende da resposta imune celular (Frederick P Heinzl *et al.* 1991; P. Scott and Farrell 1998; D. Sacks and Noben-trauth 2002; Rostami *et al.* 2010; Scott & Novais 2016).

Classicamente, a resposta imune protetora contra *Leishmania* é do tipo T_H1 (*T helper 1*), na qual a produção de interleucina 12 (IL-12) por células dendríticas ativa linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) e linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$).

A produção de interferon- γ (IFN- γ), IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF- α) por linfócitos T CD4⁺ ativa macrófagos e elicit a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando na morte do parasito (Frederick P Heinzl et al. 1991; F P Heinzl et al. 1993; Sypek et al. 1993; Moura et al. 2005). Por outro lado, um aumento da resposta do tipo T_H2 (*T helper 2*), com alta produção de IL-4, IL-10 e anticorpos, está relacionada com a maior suscetibilidade à infecção e desenvolvimento de formas mais graves da doença (Chatelain, Varkila, and Coffman 1992).

Essa dicotomização foi inicialmente demonstrada em camundongos, mas recentemente tem sido proposta uma maior complexidade da resposta imune contra leishmaniose, sendo necessário um balanço entre as respostas T_H1 e T_H2. Uma resposta do tipo T_H1 exacerbada está relacionada com uma imunopatologia severa e, por outro lado, a produção basal de citocinas anti-inflamatórias na resposta T_H2 pode acelerar o processo de cicatrização (B. Y. P. Scott et al. 1988; Frederick P Heinzl et al. 1991; D. Sacks and Noben-trauth 2002; Scott & Novais 2016; Maspi, Abdoli, and Ghaffarifar 2016).

1.3.1 Leishmaniose Cutânea:

As principais espécies que causam leishmaniose cutânea no Brasil são *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. A leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões ulceradas locais, únicas ou múltiplas, com bordas elevadas e fundo granulomatoso (Ministério da Saúde 2013; Kevric, Cappel, and Keeling 2015). Apesar das lesões serem classicamente consideradas como indolores, atualmente podemos considerar que o paciente pode ou não apresentar dor, dependendo da cepa do parasito, carga parasitária e da resposta imune do hospedeiro (Borghi *et al.* 2017).

As respostas do tipo T_H1 e T_H2 na leishmaniose cutânea são balanceadas, de forma que o paciente geralmente responde bem ao tratamento e pode até mesmo apresentar cura espontânea. Por outro lado, apesar do tratamento, os parasitos podem persistir na cicatriz da lesão e nos linfonodos, podendo gerar uma reativação em período de imunossupressão (Reithinger *et al.* 2007; Nylén & Eidsmo 2012; Scott & Novais 2016).

1.3.2 Leishmaniose mucosa:

A leishmaniose mucosa é uma manifestação clínica severa, causada principalmente por leishmanias do Novo Mundo, como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Possui caráter altamente inflamatório devido a uma resposta T_H1 exacerbada, com elevada citotoxicidade, elevada produção de ROS e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Bacellar *et al.* 2002; Scott & Novais 2016). Poucos parasitos são encontrados nas lesões, mas, por outro lado, ocorre extensa lesão tecidual, com rápida destruição das mucosas nasal e oral e da cavidade faríngea. As lesões são altamente desfigurantes e geram grande sofrimento e estigma social por toda vida (Reithinger *et al.* 2007; Nylén & Eidsmo 2012; Ministério da Saúde 2013).

1.3.3 Leishmaniose disseminada:

A leishmaniose disseminada é a forma menos frequente e constitui o polo anérgico da LT, sendo causada por *L. amazonensis*. Também é uma forma severa, que ocorre em indivíduos com defeito na resposta imune celular. Esses indivíduos apresentam um predomínio da resposta do tipo T_H2 , de caráter anti-inflamatório. Os pacientes apresentam cargas parasitárias muito elevadas, altos níveis de anticorpos e elevados níveis de IL-10 (Nylén & Eidsmo 2012; Scott & Novais 2016). As lesões, que não curam de forma espontânea, são disseminadas por toda pele em semelhança às da hanseníase lepromatosa. A ulceração não é característica dessa forma, mas pode ocorrer (Ministério da Saúde 2013).

1.3.4 Leishmaniose Visceral:

No Brasil o agente etiológico da LV é a *L. infantum*. A LV pode ser classificada em assintomática, oligossintomática e LV clássica. Na LV clássica são acometidos principalmente fígado, baço e medula óssea, e os pacientes apresentam pancitopenia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, perda de peso e febre. É uma forma extremamente grave e normalmente letal caso não seja tratada (Ministério da Saúde 2014). Um importante fator de complicação para LV é a co-infecção com HIV. Pacientes com HIV têm maior chance de desenvolver a forma clássica da LV, devido à diminuição tanto da resposta humoral quanto celular. Pacientes co-infectados apresentam formas mais severas da LV além de poder manifestar apresentações atípicas da LV, como por exemplo presença de parasitos no intestino, cavidade oral, pele e

pulmões. Da mesma forma, pacientes com leishmaniose apresentam maior susceptibilidade ao HIV e uma progressão mais rápida da AIDS. Além disso, o tratamento desses pacientes é menos eficaz e com maior risco de apresentar reativação da LV. Condições semelhantes são observadas em pacientes transplantados ou acometidos por doenças autoimunes (Saporito *et al.* 2013; Griensven *et al.* 2014).

Na LV clássica existe um perfil misto das respostas T_H1 e T_H2, mas com predomínio de T_H2, favorecendo a sobrevivência dos parasitos. Por outro lado, indivíduos assintomáticos apresentam indução de uma resposta do tipo T_H1 (Nylén & Sacks 2007). Os dois principais órgãos acometidos pela LV, fígado e baço, desenvolvem respostas específicas: enquanto o fígado produz granulomas em torno das células de *Kupffer*, de forma a resistir à infecção, o baço se torna um local de persistência dos parasitos. Os granulomas no fígado são um ambiente inflamatório, com elevada produção de IFN- γ e TNF- α , que estimulam as células de *Kupffer* a produzir ROS, o que controla a proliferação dos parasitos (Rodrigues *et al.* 2016). Já no baço são produzidas grandes quantidades de TNF e IL-10. Altos níveis de IL-10 – que é uma citocina regulatória, produzida para evitar danos teciduais decorrentes da inflamação exacerbada – estão intimamente relacionados com a replicação dos parasitos e progressão da doença (Nylén & Sacks 2007; Stanley and Engwerda 2007; Rodrigues *et al.* 2016).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser feito por meio de métodos parasitológicos, sorológicos ou moleculares. O diagnóstico de certeza é dado pelos métodos parasitológicos (diretos), nos quais é investigada a presença do parasito. Em pacientes com LT o diagnóstico parasitológico é feito por meio do achado do parasito em raspado de lesão, biópsia e punção aspirativa. A partir da biópsia são realizados *imprint*, cortes histológicos, cultura e PCR; a punção aspirativa é usada para preparar lâminas e para realizar a cultura e a PCR. A partir dos raspados são preparadas lâminas. No caso da LV, a detecção é realizada em amostras de biópsia da medula óssea, linfonodo, baço ou fígado; mas esses métodos são extremamente invasivos e possuem sensibilidade variável (Chappuis *et al.* 2007; Ameen 2010; Elmahallawy *et al.* 2014; CDC 2016).

Os exames imunológicos que podem ser usados para o diagnóstico das leishmanioses são a imunofluorescência (RIFI), o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), o teste de aglutinação e o *Western blot*. Uma das principais limitações dos exames sorológicos é a detecção dos anticorpos em indivíduos curados ou em indivíduos saudáveis de áreas endêmicas. A sorologia tem pouca utilidade no diagnóstico da LT, mas na LV a RIFI e o ELISA são invariavelmente reativos (Chappuis *et al.* 2007; Ameen 2010; Elmahallawy *et al.* 2014). No Brasil, os kits de diagnóstico para leishmaniose humana e canina são produzidos pela Fundação Oswaldo Cruz em Bio-Manguinhos. Para diagnóstico da leishmaniose humana é usada a RIFI e para o diagnóstico de leishmaniose canina o teste rápido (DPP[®]) e o ELISA (Fiocruz 2014).

A intradermoreação (Teste de Montenegro) é usada como método diagnóstico para LT, mas na LV é frequentemente negativa. O teste apresenta resultado falso positivo para pacientes que já realizaram o teste anteriormente, e apresenta reação cruzada com doença de Chagas, hanseníase, tuberculose, esporotricose e cromomicose. Apresenta resultado falso negativo para imunossuprimidos e no início da infecção (Borges *et al.* 2003; Ministério da Saúde 2013).

O diagnóstico molecular por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta sensibilidade e especificidade elevadas, sendo capaz de detectar o DNA dos parasitos antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos da LV. A PCR também pode ser usada no diagnóstico da LT, sendo capaz de determinar a espécie de *Leishmania*, o que é útil principalmente em regiões onde várias espécies coexistem (Dawit, Girma, and Simenew 2013; Ministério da Saúde 2013).

1.5 Tratamento

As drogas de primeira escolha para a quimioterapia das leishmanioses são fármacos antimoniais pentavalentes (SbV): antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]) e o estibogluconato sódico (Pentostam[®]); e a Anfotericina B, nas formulações desoxicolato e lipossomal. O tratamento possui várias limitações, como alta toxicidade, alto custo (no caso da anfotericina B lipossomal), a dificuldade de administração e a ocorrência de cepas resistentes. Outras drogas também utilizadas no tratamento das leishmanioses são: Pentamidina, a Miltefosina e a Paromomicina, além de

combinações de drogas (Herwaldt 1999; Croft, Sundar, and Fairlamb 2006). Tratamentos alternativos vêm sendo testados, mas se baseiam principalmente em reformulações e em reposicionamento de fármacos, especialmente devido a lacunas na compreensão da biologia das diferentes espécies de *Leishmania* e da resposta imunológica do hospedeiro (Sundar and Singh 2016).

1.6 Prevenção e Controle

A diminuição do número de casos de leishmaniose é uma tarefa complexa que requer que medidas de prevenção e de controle sejam tomadas de forma integrada. Como o tratamento dos pacientes tem pouco impacto na epidemiologia das leishmanioses do Novo Mundo, para diminuição dos casos são fundamentais: a educação em saúde, o controle dos vetores e o controle dos reservatórios. O controle vetorial é realizado principalmente por meio da limpeza urbana, com a retirada de entulhos e de depósitos de lixo para eliminar os locais de proliferação do vetor. Também pode ser realizado o uso de inseticidas no domicílio e peridomicílio, mas já existem relatos de casos de resistência dos vetores aos inseticidas organoclorados, organofosforados e piretróides. É recomendado utilizar medidas de proteção individual e evitar exposição nos horários de maior atividade do vetor: crepúsculo e noite (Ministério da Saúde 2014; World Health Organization 2010).

Para o controle dos reservatórios caninos no Brasil é recomendada a eutanásia de todos os cães soropositivos e/ou com exame parasitológico positivo (Ministério da Saúde 2013). Entretanto, a demora para a realização do diagnóstico, o longo tempo entre o diagnóstico e a eutanásia, a baixa sensibilidade dos testes diagnósticos e o exame de apenas parte da população canina torna essa medida ineficaz, já que os cães infectados, mesmo assintomáticos, têm papel ativo na transmissão da leishmaniose (Dietzi *et al.* 1997; Palatnik-de-Sousa *et al.* 2001; Gontijo & Melo 2004). Uma diminuição significativa do número de casos só ocorre quando essa medida é aplicada em conjunto com outras medidas de prevenção e controle (Magalhães *et al.* 1980, Ashford *et al.* 1998; Barata *et al.* 2011).

De acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426 de 11 de Julho de 2008 é proibido o tratamento de cães infectados com medicamentos usados no tratamento de humanos devido à baixa eficácia (os cães não apresentam cura parasitológica e continuam transmitindo a doença) e devido à possibilidade de

desenvolvimento de parasitos resistentes (Gómez Pérez *et al.* 2016). Recentemente o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento emitiram nota técnica permitindo o uso veterinário do Milteforan (Miltefosina) no país, já que no Brasil a droga não é utilizada para tratamento da leishmaniose humana. A nota emitida no ano de 2016 ressalta que o tratamento de cães não configura uma medida de saúde pública para controle da leishmaniose visceral (MAPA/MS 2016).

A proteção dos cães pode ser feita por meio do uso de inseticidas locais (coleiras impregnadas com deltametrina), ou pela vacinação (Solano-gallego *et al.* 2009; World Health Organization 2010; Maroli *et al.* 2010; Otranto and Dantas-torres 2013; Ministério da Saúde 2014). A vacina canina Leish-Tec[®], composta pela proteína recombinante A2 e saponina, foi aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde, e está atualmente disponível no mercado (Fernandes *et al.* 2008; Barreto *et al.* 2014; Souza *et al.* 2014).

1.7 Vacina

Diante dos inúmeros desafios enfrentados na prevenção e controle das leishmanioses, o desenvolvimento de uma vacina humana eficaz e acessível é a melhor estratégia para o controle dessa grave doença. Mas, apesar do grande esforço empregado nos últimos anos, ainda não existe nenhuma vacina disponível para uso humano. As principais questões a serem solucionadas são o custo elevado, a complexidade antigênica dos parasitos e a grande complexidade de respostas produzidas pelo hospedeiro (Evans and Kedzierski 2012; Singh and Sundar 2012; Duarte *et al.* 2016; Srivastava *et al.* 2016). No entanto, alguns fatos indicam a possibilidade de se desenvolver uma vacina contra as leishmanioses: (I) existem formas subclínicas de leishmaniose nas quais a resposta imune controla a infecção (Zijlstra *et al.* 1994) e, (II) o hospedeiro é capaz de gerar células de memória após infecção por *Leishmania* e se tornar resistente no caso de uma segunda exposição (Zaph *et al.* 2004).

As primeiras tentativas de se desenvolver uma vacina contra a leishmaniose datam do século XX na ex-União Soviética, Ásia e Oriente

Médio, onde era realizado o inóculo de *L. major* virulenta em regiões do corpo que não ficavam expostas, a fim de se desenvolver imunidade contra infecções subsequentes (Nadim et al. 1988; Nadim, Javadian, and Mohebbali 1997; Dunning 2009). Essa prática, conhecida como leishmanização, apesar de eficiente, foi abandonada devido a questões de segurança, éticas, problemas no controle de qualidade (como a perda de virulência dos parasitos após sucessivas passagens *in vitro*), e devido à persistência do parasito no hospedeiro, o que é uma questão grave, principalmente em pacientes com supressão do sistema imune (Amini 1991; Housseini, Hatam, and Ardehali 2005; Yazdanpanab et al. 2006; Khamesipour et al. 2012).

A primeira geração de vacinas inclui, além do uso de parasitos virulentos, vacinas de parasitos mortos e de parasitos atenuados. Vacinas de parasitos mortos, apesar de seguras, não têm composição bem definida, apresentam baixa eficácia e não produzem respostas imunológicas duradouras (Streit et al. 2001). Por outro lado, as vacinas de parasitos vivos atenuados, consideradas padrão ouro contra patógenos intracelulares, são uma opção promissora no desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses. A infecção por *Leishmania* atenuada é semelhante à infecção por parasitos patogênicos, de forma que ocorre apresentação de vários antígenos do parasito para às células do sistema imune. Ao induzir uma infecção subclínica, as leishmanias atenuadas elicitam a geração de células de memória (Silvestre, Cordeiro, and Ouaiissi 2008; Kaye and Aebischer 2011; Chhajer and Ali 2014; Srivastava et al. 2016). Além disso, vacinas de parasitos atenuados vivos são muito imunogênicas e dispensam o uso de adjuvantes (Mitchell et al. 1984; Gorczynski 1985; Rivier et al. 1993; Kimsey et al 1993; Daneshvar et al. 2003, Fiuza et al. 2015).

Ainda como estratégia para o desenvolvimento de vacinas vivas, podemos citar o uso da *L. tarentolae*. Apesar de não causar doença, essa espécie de *Leishmania* simula o curso natural de infecção das demais leishmanias e imunizações com *L. tarentolae* foram capazes de gerar proteção contra *L. infantum* (Breton et al. 2005). Na tentativa de melhorar a resposta induzida por *L. tarentolae* estudos têm sido conduzidos associando antígenos que podem ser expressos pela própria *L. tarentolae* (Mizbani et al. 2010; Mizbani, Taslimi, and Zahedifard 2011; Saljoughian et al. 2013; Zahedifard et al. 2014; Katebi et al. 2015; Shahbazi et al. 2015).

Ao longo dos anos, várias técnicas foram utilizadas para realizar atenuação de *Leishmania*, como exposição à radiação, a altas temperaturas ou a drogas (Nagill and Kaur 2011). Atualmente, por conhecer o genoma de várias espécies de *Leishmania* é possível realizar modificações definidas por meio de deleções de genes específicos para assim obter parasitos atenuados (Silvestre, Cordeiro, and Ouaiissi 2008; Dunning 2009; Chhajer and Ali 2014; Srivastava et al. 2016). Além da obtenção de parasitos atenuados por deleção gênica, é possível introduzir no genoma da *Leishmania* “sequências suicidas”, que são responsáveis por matar os parasitos em resposta a um estímulo externo (Davoudi et al. 2005).

Vários parasitos nocautes já foram avaliados quanto a capacidade de gerar uma resposta protetora (Silvestre, Cordeiro, and Ouaiissi 2008). Para realizar atenuação podem ser deletados genes essenciais para o parasito, genes relacionados com a divisão celular ou fatores de virulência (Selvapandiyan et al. 2014). Como exemplo, podemos citar os parasitos deficientes em centrina, uma proteína do citoesqueleto, envolvida na divisão celular, cuja deleção resulta na atenuação específica das formas amastigotas intracelulares, mas não das promastigotas (Selvapandiyan et al. 2001; Selvapandiyan et al. 2004). Imunizações com parasitos nocautes para centrina foram capazes de promover uma resposta imune protetora duradoura em camundongos, hamsters e cães (Selvapandiyan et al. 2009; Fiuza et al. 2013; Fiuza et al. 2015; Fiuza et al. 2016; Bhattacharya et al. 2016). Parasitos com deleções de gene que codificam para enzimas do metabolismo das poliaminas, como espermidina, ornitina descarboxilase e tripanotiona redutase, também mostraram menor virulência *in vitro* e *in vivo*, pois essa é uma via essencial para regulação do estresse oxidativo nos tripanossomatídeos (Dumas et al. 1997; Boitz et al. 2009; Gilroy et al. 2011). Outro exemplo de parasitos atenuados são os nocautes para fatores de virulência, como parasitos nocautes para lipofosfoglicanos (*lpg1^{-/-}* e *lpg2^{-/-}*) (Ryan et al. 1993; Huang and Turco 1993; Uzonna et al. 2004) e parasitos deficientes em cisteína-proteinases (Alexander, Coombs, and Jeremy 1998).

A maioria dos estudos de vacinas contra as leishmanioses se baseia nas vacinas de segunda geração, que englobam vacinas de composição bem definida, como por exemplo, vacinas de proteínas recombinantes e as vacinas de frações purificadas de *Leishmania*. As vacinas de segunda geração são

seguras e têm menor custo de produção, mas são menos imunogênicas e apresentam taxas variáveis de proteção, de acordo com a formulação, com o adjuvante usado e o modelo animal no qual foi testada (Duarte *et al.* 2016). Assim, além da escolha de um bom antígeno, a escolha do adjuvante é um passo essencial no desenvolvimento desse tipo de vacina, já que o adjuvante poderá direcionar a resposta imune. Adjuvantes como IL-12 recombinante, saponina, BCG, Monofosforil lípido A (MPL), CpG e vírus recombinantes são capazes de induzir uma resposta do tipo T_H1 (Mutiso, Macharia, and Gicheru 2010; Raman *et al.* 2012). As emulsões oleosas e os sais de alumínio, que são os adjuvantes mais empregados em vacinas de uso veterinário e humano, induzem produção de anticorpos, mas são fracos indutores da resposta do tipo T_H1 (Coler and Reed 2005; Singh and Sundar 2012; Duarte *et al.* 2016; Srivastava *et al.* 2016).

Vários antígenos de *Leishmania* já tiveram sua capacidade imunogênica avaliada e, dentre os que ofereceram proteção em modelos animais, podemos citar: a proteína A2 (A. Ghosh, Zhang, and Matlashewski 2002; Coelho *et al.* 2003; Zanin *et al.* 2007; Fernandes *et al.* 2008; Souza *et al.* 2014), cisteína-proteinases (Rafati, Zahedifard, and Nazgouee 2006; Khoshgoo *et al.* 2008), HASPB (Stäger *et al.* 2000), KMP11 (Basu *et al.* 2005), LdSir2HP (Baharia *et al.* 2015), LeishF1 ou Leish-111f (Chakravarty *et al.* 2011), LeishH1 (Agallou *et al.* 2012), L3/L5 (Ramirez *et al.* 2014) e ORFF (Tewary *et al.* 2005). Levando em consideração que mais de um antígeno é geralmente necessário para se produzir uma resposta imune eficaz, também têm sido estudadas vacinas compostas de proteínas ou peptídeos de fusão (vacinas quiméricas) além de coquetéis de antígenos (Duarte *et al.* 2016; Srivastava *et al.* 2016).

Além das vacinas compostas por antígenos de *Leishmania*, um campo promissor é o estudo de vacinas compostas por proteínas da saliva dos vetores, que são capazes de induzir uma resposta do tipo T_H1 (Giunchetti *et al.* 2008; Collin *et al.* 2009; Gomes *et al.* 2012; Zahedifard *et al.* 2014; Katebi *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2015).

Ainda como estratégia vacinal contra as leishmanioses podemos citar vacinas de DNA e as vacinas de células dendríticas. Várias vacinas de DNA têm sido estudadas, como vacinas para expressão dos antígenos LACK (Gurunathan *et al.* 1997), PapLe22 (Fragaki *et al.* 2001) e Kmp11 (Basu *et al.* 2005); mas no geral conferem proteção apenas parcial. As vacinas de células

dendríticas podem ser administradas com antígenos de *Leishmania* e podem ser transformadas para expressar grandes quantidades de IL-12 e assim aumentar a proteção contra *Leishmania* (Ahuja *et al.* 1999).

1.8 Genoma

O número de cromossomos varia entre as diferentes espécies do gênero: enquanto *L. donovani*, *L. infantum* e *L. major* possuem 36 cromossomos, *L. braziliensis* possui 35 (devido à fusão dos cromossomos 20 e 34) e *L. mexicana* possui 34 (devido à fusão dos cromossomos 8 e 29, e dos cromossomos 20 e 36) (Britto *et al.* 1998; Peacock *et al.* 2007). Apesar das espécies de *Leishmania* serem consideradas diplóides, a ploidia também varia entre as diferentes espécies e/ou cepas/isolados de uma mesma espécie. Trinta cromossomos de *L. braziliensis*, nove em *L. infantum* e um de *L. mexicana* são trissômicos. Os demais cromossomos de *L. braziliensis* são tetrassômicos, pentassômicos ou hexassômicos. *L. infantum*, *L. major* e *L. mexicana* possuem cada uma um cromossomo tetrassômico (Rogers *et al.* 2011). O sequenciamento do genoma de isolados clínicos revelou que a ploidia das diferentes cepas de *L. donovani* é variável e altamente instável (Downing *et al.* 2011). Estudos em *L. major* demonstraram que a ploidia pode sofrer alterações inclusive durante a mitose, com o conteúdo cromossomal variando de célula para célula em uma mesma população (Sterkers *et al.* 2011). Estes fenômenos ocorrem devido à grande plasticidade do genoma da *Leishmania*, que permite a duplicação de genes e até mesmo de cromossomos inteiros, gerando rápida diversidade entre os parasitos, o que os permite adaptar aos diferentes ambientes que encontra durante seu ciclo de vida (Sterkers *et al.* 2012; Lachaud *et al.* 2013).

Além do DNA nuclear, parasitos da ordem Kinetoplastidae apresentam o cinetoplasto, que consiste no DNA mitocondrial ou kDNA, presente na mitocôndria única desses parasitos. O kDNA é composto por maxicírculos e minicírculos de DNA concatenados e, assim como mitocôndrias de outros eucariotos, o kDNA contém sequências de RNA ribossomal e de componentes de complexos respiratórios (Borst and Hoeijmakers 1979; Lukes *et al.* 2002; B. Liu *et al.* 2005).

O genoma destes organismos não apresenta *introns*, de forma que o DNA genômico pode ser utilizado como molde para realização da PCR. A organização genômica e os mecanismos de controle da expressão gênica da *Leishmania* são pouco usuais, em especial devido à transcrição policistrônica. Possuem as RNA polimerases I, II e III (Sadhukhan *et al.* 1997) e os pré-mRNAs são processados para dar origem a RNAs maduros, por meio de *transplicing* e poliadenilação (Borst 1986; Lebowitz *et al.* 1993; Myler *et al.* 1999; Martinez-Calvillo *et al.* 2003; Peacock *et al.* 2007). A expressão diferencial de genes em diferentes etapas do ciclo de vida desses parasitos é mediada por eventos pós-transcricionais; pela estabilidade dos RNAs; pela mobilidade do mRNA no polissomo e pela reciclagem de proteínas. Como o conteúdo genético das diferentes espécies é altamente conservado e poucos genes são espécie-específicos, muitas diferenças podem ser devido à expressão diferencial que conta com fatores epigenéticos. Dos mais de 8000 genes preditos no genoma das diferentes espécies de *Leishmania*, cerca de 40 % codificam proteínas hipotéticas de função desconhecida e vários outros são anotados com base na homologia com genes ortólogos (Peacock *et al.* 2007; Martinez-Calvillo *et al.* 2010; Kazemi 2011).

Além da reprodução assexuada, parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de realizar troca de material genético durante sua passagem pelo vetor (Pages *et al.* 1989; Panton *et al.* 1991; Akopyants *et al.* 2009; Calvo-Álvarez *et al.* 2014). Estudos têm demonstrado que a reprodução sexuada ocorre com elevada frequência em *Leishmania* e que é uma estratégia reprodutiva natural desses parasitos (Inbar *et al.* 2013; Romano *et al.* 2014). No entanto, para melhor compreender o impacto evolutivo desse fenômeno na estrutura genética dos parasitos, são necessários estudos adicionais com ferramentas de genética populacional e marcadores genéticos adequados (Rougeron, Meeûs, and Bañuls 2016).

1.9 Manipulação genética de *Leishmania*

Várias ferramentas podem ser usadas para manipulação genética de *Leishmania*. Em conjunto com o sequenciamento do genoma, a manipulação genética tem propiciado grandes avanços no conhecimento da função de

genes dos parasitos, da regulação de vias metabólicas e da biologia dos parasitos (Clayton 1999; Roberts 2011).

1.9.1 Deleções

As deleções gênicas em *Leishmania*, muito utilizadas para estudar a função de genes, têm sido realizadas principalmente por meio de recombinação homóloga. Essa técnica consiste em substituir um gene alvo por um marcador de resistência a drogas, de forma a selecionar os parasitos nocautes. São transfectadas, por eletroporação, sequências que contêm o marcador de resistência a drogas e regiões que flanqueiam o gene alvo, para que ocorra a recombinação homóloga. Estando o gene em um cromossomo diplóide, para se obter o nocaute são necessárias duas transfecções, com marcadores que conferem resistência a dois antibióticos marcadores diferentes, para a substituição alélica. Ao utilizar essa técnica, cópias adicionais do gene alvo podem aparecer no genoma, devido à plasticidade desses parasitos, principalmente no caso da deleção de genes alvo essenciais (Sterkers *et al.* 2012; Lachaud *et al.* 2013). Após a deleção se faz necessário reinserir o gene no parasito nocaute, a fim de verificar que o fenótipo observado se deve realmente à deleção, e não à outra mutação não relacionada que possa ter ocorrido (Clayton 1999; Roberts 2011; Späth and Clos 2016).

Com o objetivo de aumentar a eficiência e a facilidade de edição gênica nos tripanosomatídeos, novas ferramentas surgiram recentemente, como o uso do sistema DiCre (Duncan *et al.* 2016) e do sistema CRISPR/Cas9 (Sollelis *et al.* 2015; W. Zhang and Matlashewski 2015; W.-W. Zhang, Lypaczewski, and Matlashewski 2017). O Sistema DiCre, que teve origem a partir do sistema Cre-Lox, permite a deleção induzível de um alvo por meio da recombinação que ocorre entre duas sequências Lox, com excisão mediada pela recombinase dimerizável (DiCre) (Sauer 1987). Essa abordagem, assim como a recombinação homóloga, também não previne o aparecimento de cópias extras no genoma dos parasitos. O sistema DiCre também não tem grande utilidade na realização de deleções de genes multicópias, já que também exige que seja feita a transfecção com um cassete diferente para deleção de cada alelo. No entanto esse sistema, por permitir deleções induzíveis, se mostra como uma ferramenta muito útil para realizar estudos *in*

vivo de genes que são essenciais não só para amastigotas mas também para promastigotas (Duncan et al. 2016; Späth and Clos 2016).

O CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)-Cas (*CRISPR associated proteins*) é um conjunto de repetições palindrômicas curtas encontradas no genoma de bactérias e Arqueas (Ishino et al. 1987; Jansen et al. 2002) que funcionam como sistema imune adaptativo desses organismos (Bolotin et al. 2005; Barrangou 2012). Recentemente foi descrito que o sistema CRISPR/Cas9 pode ser usado para realizar edição genômica com elevada eficiência (Jinek et al. 2013; Gasiunas et al. 2012), iniciando uma nova era na Biologia Molecular. De forma simplificada, no sistema CRISPR/Cas9 é realizada uma transfecção com um plasmídeo que contém sequência da endonuclease Cas9 e de um RNA guia (sgRNA). O sgRNA irá se ligar ao DNA alvo, em uma região denominada *protospacer*, que deve ser localizada imediatamente antes de uma sequência NGG, denominada PAM (*protospacer adjacent motif*). A Cas9 reconhece a sequência PAM e o sgRNA, e forma um complexo, que irá quebrar a fita dupla de DNA. De acordo com o mecanismo de reparo presente no organismo, erros serão inseridos na sequência alvo (Lander, Chiurillo, and Docampo 2016). Recentemente, o sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para edição do genoma de *L. major* (Sollelis et al. 2015; W.-W. Zhang, Lypaczewski, and Matlashewski 2017), *L. donovani* (W. Zhang and Matlashewski 2015; W.-W. Zhang, Lypaczewski, and Matlashewski 2017) e *L. mexicana* (W.-W. Zhang, Lypaczewski, and Matlashewski 2017). Por meio do uso do CRISPR/Cas9 os parasitos nocautes podem ser facilmente selecionados com uma única transfecção (Lander, Chiurillo, and Docampo 2016).

1.9.2 Silenciamento

A interferência de RNA (RNAi) é uma técnica muito usada para realizar o silenciamento de genes em diferentes organismos por meio da indução da degradação de um RNA mensageiro (mRNA) específico. Um RNA dupla-fita e homólogo ao mRNA alvo é reconhecido e processado pela enzima Dicer e pela dsRBP (*dsRNA binding protein*). Uma das fitas do RNA é degradada e a outra é incorporada no complexo RISC (*RNA-induced-silencing complex*). Após reconhecer o mRNA homólogo, a enzima Argonata faz a clivagem do alvo (Ullu, Tschudi, and Chakraborty 2004). Essa abordagem apresenta

vantagens, como o fato do alvo ser o mRNA, e assim o número de cópias do gene ser irrelevante na realização da técnica. Além disso, é possível reduzir a expressão dos genes de forma induzida, o que permite estudar genes essenciais. No entanto, em alguns casos só é possível obter uma redução parcial da expressão do gene, o que é a principal limitação da técnica (Kolev, Tschudi, and Ullu 2011). Apesar de ser uma técnica muito usada em estudos com *Trypanosoma brucei*, a maioria das espécies de *Leishmania* não possui maquinaria para realizar o RNAi, exceto por espécies do subgênero *Viannia* (Lye *et al.* 2010).

1.9.3 Superexpressão

A superexpressão de proteínas endógenas ou a expressão de proteínas heterólogas pode ser realizada em *Leishmania* por meio de transfecção estável ou por meio da transfecção transiente. O primeiro caso, mais usado em estudos quantitativos e funcionais, consiste na transfecção de DNA plasmidial, linearizado com enzimas de restrição, que irá integrar do genoma da *Leishmania* (Kapler, Coburn, and Beverley 1990; Laban *et al.* 1990). No segundo caso, é realizada a transfecção de um plasmídeo circular, que irá se manter nos parasitos na forma episomal (Kelly *et al.* 1992). Nesse último caso, as culturas devem ser mantidas sob pressão contínua de droga para que a *Leishmania* não elimine o plasmídeo “obsoleto” transfectado. Para que os genes sejam expressos é necessário adicionar aos plasmídeos os sinais necessários para que ocorra a maturação do mRNA (Clayton 1999; Roberts 2011).

Vários estudos estão sendo realizados a fim de se obter ferramentas para regular a expressão de uma proteína específica, como por exemplo estudos com a utilização de promotores induzíveis, controlados pela adição de drogas (Yan, Myler, and Stuart 2001; Yan *et al.* 2002; Kushnir *et al.* 2005; Yao *et al.* 2008; Kraeva *et al.* 2014), e estudos com a adição de um domínio de desestabilização à proteína alvo, que é degradada, a não ser que seja adicionado um ligante que a proteja essa proteína da degradação (Madeira *et al.* 2009).

1.10 A proteína Kharon1

A proteína Kharon1 (Kh1) foi recentemente descrita durante a caracterização de um transportador de glicose em *L. mexicana* (LmxGT1). Para melhor compreender o mecanismo de endereçamento desse transportador, foi realizado a purificação de proteínas que interagem com LmxGT1, seguida da espectrometria de massas, sendo então identificada a proteína Kharon1. Foi demonstrado que Kh1 está localizada na base do flagelo e se associa com o citoesqueleto e com o axonema flagelar, sendo necessária para o transporte de LmxGT1 da bolsa flagelar para o flagelo. O nome da proteína deriva-se dessa função, já que se assemelha a função do Kharon mitológico (em português Caronte), barqueiro de Hades que transportava os recém-falecidos para o submundo (Tran *et al.* 2013).

Durante esse estudo foi observado que as formas amastigotas dos mutantes *LmxKh1*^{-/-} não foram capazes de manter a infecção em macrófagos, mas que as formas promastigotas não apresentam nenhuma alteração no *fitness* (Tran *et al.* 2013). Mais tarde foi demonstrado que os mutantes *LmxKh1*^{-/-} são capazes de infectar os macrófagos e se diferenciar em amastigotas, mas as amastigotas possuem uma falha na citocinese, gerando formas multinucleadas inviáveis. Como consequência, os mutantes *LmxKh1*^{-/-} não foram capazes de gerar lesão *in vivo* (Tran *et al.* 2015).

Um trabalho posterior, realizado em *T. brucei* demonstrou que Kharon é uma proteína essencial para a viabilidade do parasito em todas as etapas do seu ciclo de vida, diferente do observado em *L. mexicana*. Além disso, em *T. brucei*, Kh não está relacionada com o endereçamento de um transportador de glicose, mas de um transportador de cálcio. Foi demonstrado ainda que além da associação com os microtúbulos subpeliculares, TbKh está associada ao fuso mitótico. Em parasitos *TbKh*^{-/-} o fuso mitótico não é capaz de se formar, o que provavelmente é a principal causa de letalidade desses parasitos. Como o gene *Kharon* só possui ortólogos entre os Kinetoplastídeos, possivelmente possui papel fundamental na biologia desses parasitos (Sanchez *et al.* 2016).

No presente trabalho realizamos a obtenção e caracterização de *L. infantum* deficiente em Kh1. Esse parasito recombinante é uma ferramenta tanto para o desenvolvimento de vacinas quanto para a geração de

conhecimento sobre a proteína Kh1, sobre os aspectos da biologia do parasito e de sua interação com o hospedeiro.

Em *L. infantum*, o gene que codifica a proteína Kh1 (*LinJ.36.6110*) está presente no cromossomo 36 e possui 1593 pb.

2 JUSTIFICATIVA

Diante das inúmeras dificuldades enfrentadas na profilaxia e controle das leishmanioses, o desenvolvimento de uma vacina eficaz se torna uma missão urgente, já que a vacinação é uma das formas mais eficientes de se realizar o controle de doenças. Apesar dos esforços empregados nos últimos anos, ainda não existe nenhuma vacina segura e eficaz contra leishmaniose disponível para humanos. Sabe-se que para patógenos intracelulares as vacinas consideradas padrão-ouro são aquelas constituídas de vírus e bactérias atenuados, sendo essa a composição da maioria das vacinas disponíveis. Estudos utilizando leishmanias atenuadas têm demonstrado que essa é uma boa estratégia para se produzir uma resposta imune protetora duradoura. Dessa forma, no presente estudo foi obtida e caracterizada uma cepa atenuada de *L. infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil. A cepa foi atenuada mediante a deleção do gene *Kharon1 (Kh1)*, que está envolvido no processo de divisão celular das formas amastigotas. *L. infantum* deficiente em Kh1 obtida nesse projeto poderá ser estudada como candidata vacinal para cães e humanos, podendo contribuir para resolução de um grave problema de saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Deletar o gene *Kharon1* (*Kh1*) para obter uma cepa atenuada de *L. infantum* e caracterizar fenotípica e molecularmente os mutantes selecionados.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter mutantes de *L. infantum* deficientes em KH1;
- Caracterizar genotipicamente os mutantes de *L. infantum* deficientes em KH1;
- Caracterizar fenotipicamente as formas promastigotas e amastigotas dos mutantes de *L. infantum* deficientes em KH1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção dos parasitos

Formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram cultivadas em meio α -MEM (GIBCO®) suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 5 μ g/mL de hemina e 5 μ M de biopterina, em pH 7 a 26 °C. As contagens do número de parasitos foram realizadas utilizando o contador de células *Z1 Coulter® Particle Counter* (Beckman Coulter™) e as culturas foram mantidas realizando-se dois repiques semanais, sendo inoculados 1×10^6 parasitos para cada 5 mL de meio. Para criopreservação, as culturas de parasitos em fase logarítmica de crescimento foram homogeneizadas com 20 % de soro fetal bovino e 10 % de DMSO, acondicionadas em criotubos e rapidamente transferidas para freezers à -70 °C, onde podem ficar armazenados por longos períodos.

4.2 Cultivo e manutenção das células THP-1

Macrófagos diferenciados derivados da linhagem monocítica humana THP-1 foram cultivados em frascos em meio RPMI 1640 completo (suplementado 10 % de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina). As células foram contadas em câmara de Neubauer (New Optics) espelhada, de 0,1 mm² de profundidade. As culturas foram mantidas realizando-se dois repiques semanais, sendo inoculadas 5×10^5 células para cada 25 mL de meio.

4.3 Extração de DNA genômico

Sedimentos contendo aproximadamente 1×10^8 promastigotas de *L. infantum* WT e dos mutantes em fase exponencial foram utilizados para extrair DNA genômico. Foram realizados dois métodos diferentes para esse fim; fazendo uso do fenol (Thermo Scientific) ou o DNAzol® (Invitrogen). Na extração utilizando o fenol, as culturas foram centrifugadas a 13.400 x g por 5 min, lavadas e os sedimentos foram incubados com Proteinase K (10 mg/mL) e RNase (20 mg/mL) a 37 °C por 2 h sob agitação. Em seguida, foi adicionado o fenol, e a amostra foi centrifugada a 2.100 x g por 10 min. A fase aquosa, onde se encontra o DNA, foi transferida para um tubo novo e em seguida foi adicionado etanol 99 %. O DNA foi retirado com auxílio de uma alça

bacteriológica descartável, lavado em álcool 70 % e ressuspenso em água livre de DNase e RNase. Para as extrações utilizando o DNAzol, as culturas foram centrifugadas a 13.400 x g por 5 min, lavadas e os sedimentos lisados com DNAzol. Em seguida foi adicionado etanol 99% para precipitação das proteínas e o DNA foi retirado com auxílio de uma alça bacteriológica descartável. Após lavagem em álcool 70 % o DNA foi ressuspenso em água livre de DNase e RNase. As dosagens dos DNAs extraídos foram realizadas no *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000* (Nanodrop®).

4.4 Produção das construções destinadas à deleção de KH1

A deleção completa de *Kh1* (*LinJ.36.6110*) em *L. infantum* foi realizada por meio do método convencional de substituição alélica por recombinação homóloga mediante duas transfecções com cassetes lineares contendo os marcadores de seleção para neomicina (NEO) e higromicina (HYG). Foram necessárias duas transfecções com marcadores de resistência diferentes, pois, em *L. infantum*, *Kh1* localiza-se no cromossomo 36, diplóide (Rogers *et al.* 2011). As regiões 5'UTR e 3'UTR que flanqueiam a região codificante (*open reading frame* - ORF) do gene *LinJ.36.6110* foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *L. infantum* mediante utilização de iniciadores específicos (iniciadores 3 a 11), conforme indicado na Tabela 1. Para amplificação dos marcadores de resistência foram utilizados como molde plasmídeos com as sequências de interesse. Cada iniciador reverso contém 20 pares de bases que geram uma região de homologia com o próximo fragmento que será incorporado no cassete pela técnica de PCR de fusão. O esquema das construções pode ser observado na Figura 7.

Após a amplificação inicial das sequências 5'UTR de KH1, marcadores de resistência (NEO E HYG) e 3'UTR de KH1, foi realizada uma segunda PCR, utilizando os três fragmentos obtidos e os iniciadores 3 e 7, para fusão total e obtenção das construções *5'Kh1::NEO::3'Kh1* e *5'Kh1::HYG::3'Kh1*. Tanto para obtenção dos fragmentos quanto para PCR de fusão, foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion*[®] (New England Biolabs) e um programa de temperaturas do tipo *touchdown*. As condições utilizadas nas reações estão especificadas na Tabela 2.

Tabela 1. Iniciadores e Sondas utilizados no estudo

ENSAIO	GENE		INICIADOR	SEQUENCIA (5'→3')	Temperatura De Pareamento (°C)	Tamanho Do Fragmento (pb)	
PCR	LinJ.36.6110 (<i>Kh1</i>)	1	XbaI.Kh1_Fw	<u>TCTAG</u> AATGACGCAGGAAACCTCCCC	61,8	1.600	
		2	Sall.LinJ.Kh1_Rev	GTCGACTTAAATTAAGCAATGCTCG	55		
PCR de Fusão	5'UTR de <i>Kh1</i>	3	XbaI.5'-Kh1_Fw	<u>TCTAG</u> AGTATCGTCCGAGTTCCCTTTC	58,8	554	
		4	degHYG_5'-Kh1_Rev	GTGAGTTCAGGCTTTTTTCATCGTGGAAAGTGCTCGAGACGG	72		
		5	degNEO_5'-Kh1_Rev	AATCCATCTTGTTCAATCATCGTGGAAAGTGCTCGAGACGG	72		
	3'UTR de <i>Kh1</i>	6	3'Kh1_Fw	GAAGCAGCACCACCCCTGGG	63,6	528	
		7	Sall.3'-Kh1_rev	<u>GTCGAC</u> CTGTTTGCTGCGCTGTTTAT	61,7		
	HYG	HYG	8	HYG_Fw	ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCG	60,2	1.025
			9	deg3'Kh1_HYG_Rev	CCCAGGGGTGGTGCTGCTTCTCATCGATGATGGGGATCT	71,9	
NEO	NEO	10	NEO_Fw	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC	58,4	794	
		11	deg3'Kh1_NEO_Rev	CCCAGGGGTGGTGCTGCTTCTCAGAAGAACTCGTCAAGAA	69,2		
PCR de Integração	5'UTR::NEO e 5'UTR:HYG	12	5'outKH1_Fw	TTTGGTGCTGGTGAGTGTAG	55,7	1.600 e 1.476	
		13	NEO_mid_Rev	GCCAACGCTATGTCCTGATA	57,2		
		14	HYG_mid_Rev	CTGACGGTGTGCTCCATAAC	57,4		
qPCR	LinJ.36.6110 (<i>Kh1</i>)	15	rt_Kh1_36.6110_Fw	CCTCCTCGCAACAACCTTCA	58,4	105	
		16	rt_Kh1_36.6110_Rev	GTCACGGTTACAGTTGGGATAG	57,1		
	LinJ.36.2480 (GAPDH)	17	rt_GAPDH	TGTGGAGAAGCGAGCAACGTACAA	67	74	
		18	rt_GAPDH	ATGAGACGAGCTTGACGAAGTGCT	65		
LinJ.16.1640 (DNA polimerase)	DNA polimerase	19	rt_DNApol	CGAGGGCAAGACATAC	48	69	
		20	rt_DNApol	GAGAGCGGGCACCAATCAC	62		
Southern blot	5'UTR-Kh1	21	5'UTR-Kh1-Fw	CCGTCTATCGCTTTTACTTCG	-	364	
		22	5'UTR-Kh1-Rev	CGTGGAAAGTGCTCGAGACGGC	-		
	Kh1	23	Kh1-Fw	ATGACGCAGGAAACCTCCCCT	-	859	
		24	Kh1-Ver	GCTTGAACGGCTGTGGCTTCT	-		

As sequências sublinhadas correspondem aos sítios de restrição inseridos nos produtos de amplificação. As sequências em cinza correspondem às sequências de homologia necessárias para realização da PCR de fusão. O desenho dos iniciadores utilizados no estudo foi feito usando a ferramenta Primer QuestSM (www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index).

Tabela 2. Condições das Reações de PCR

Enzima	Reação		Programa De Temperaturas	
	Componente	Volume (µL)		
Taq DNA Polimerase (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda.)	Tampão IV 5X	2	Desnaturação	95 °C – 5 min
	dNTPs (10mM)	1	inicial	95 °C - 30 s
	Iniciadores	1 (de cada)	35 ciclos	variável - 30 s
	DNA molde (100 ng/µL)	1		72 °C - variável*
	Taq DNA polimerase	0,15		72 °C - 5 min
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)	Água	3,85	Extensão final	
	Tampão GC 5x	10	Desnaturação	98 °C - 30 s
	dNTPs (10mM)	1	inicial	98 °C - 10 s
	Iniciadores	2,5 (de cada)	10 ciclos	71 °C - 30 s (-1°C por ciclo)
	DNA molde (100 ng/µL)	1**		
	DMSO	1,5		72 °C – 1 min
	Phusion DNA polimerase	0,5	25 ciclos	98 °C - 10 s
	Água	31		60 °C - 30 s
			72 °C - /1 min	
			Extensão final	72 °C - 5 min
SYBR Green	Mix (Sybr Green)	10	Desnaturação	95 °C – 5 min
	Iniciadores	1 (de cada)	inicial	95 °C - 15 s
	DNA molde (100 ng/µL)	1	40 ciclos	60 °C - 15 s
	Água	7		72 °C - 30 s

*1 minuto para cada 1 kb

**Para PCR de Fusão adicionar 1 µL de cada fragmento de DNA.

4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Todas as migrações por eletroforese em gel de agarose foram realizadas utilizando géis 1 % (p/v) corados com GelRed™ (Biotium, Inc) na proporção de 1:50.000. Para estimar o tamanho dos fragmentos foi utilizado o *marcador DNA Ladder 1 Kb plus* (Invitrogen™). As eletroforeses foram realizadas a 80 V em tampão de corrida TBE 1 X (89 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA, pH 8,0) e suporte de eletroforese *BRL Horizontal Gel Electrophoresis Horizon 11.14* (Gibco-Life Technologies). As imagens foram obtidas utilizando o equipamento *ImageQuant Las 4000* (GE).

4.6 Preparo de Células Cálcio competentes

Um pré-inóculo de colônia isolada da bactéria *E. coli* cepa TOP 10F' (Invitrogen) foi incubado em 5 mL de meio LB líquido sob agitação constante a 37 °C por 16 h. Após a incubação, foi transferido 1 mL do pré-inóculo para 100 mL de meio LB líquido, mantendo-se sob agitação a 37 °C. A densidade óptica da cultura foi monitorada a 600 nm até que a absorbância atingisse valores entre 0,4 e 0,6. A colônia foi então resfriada no gelo por 15 min. As culturas foram transferidas para tubos de 50 mL, centrifugadas a 3.300 x g por 7 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e os sedimentos de cada tubo foram ressuspensos em 25 mL de solução de cloreto de cálcio (100 mM CaCl₂; 10 mM HEPES; pH 7) gelado e estéril. Manteve-se no gelo por 20min, centrifugou-se novamente e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se os sedimentos em 1 mL de solução de cloreto de cálcio-glicerina (100mM CaCl₂; 10mM HEPES; 10% glicerol; pH 7) gelado e estéril. As células foram aliqüotadas em 100 uL e armazenadas a -70 °C.

4.7 Clonagem dos cassetes de deleção de *Kh1* em pGEM-T easy

Os *amplicons* resultantes da PCR de fusão foram clonados no vetor pGEM-T easy (Promega) (Figura 5). Após realização da poliadenilação dos produtos de PCR (construções 5'*Kh1*::*NEO*::3'*Kh1* e 5'*Kh1*::*HYG*::3'*Kh1*), foi preparada a reação de ligação: os *amplicons* foram incubados com o vetor a 4 °C por 16 h na presença de *DNA ligase T4* (Invitrogen). Os produtos da ligação foram então transformados em bactérias *E. coli* cálcio competentes TOP10F' (Invitrogen) por meio de choque térmico (as bactérias foram incubadas com os produtos da ligação por 30 min a 4 °C e em seguida são

rapidamente transferidas para banho-seco a 42 °C por 2 min). Após o choque térmico as bactérias foram incubadas por 1 h a 37 °C e posteriormente plaqueadas em meio LB sólido na presença de ampicilina (Sigma-Aldrich®), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (Promega) e IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (Sigma-Aldrich®). Após 16 h a 37 °C foram selecionadas as colônias brancas (positivas) para serem crescidas em meio líquido. Os plasmídeos foram purificados utilizando o kit QIAprep (Qiagen) conforme orientações do fabricante. Para a confirmação da presença de inserto esperado, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *SaI* e *XbaI*, cujos sítios foram previamente inseridos no desenho de iniciadores para a PCR de fusão (Tabela 1).

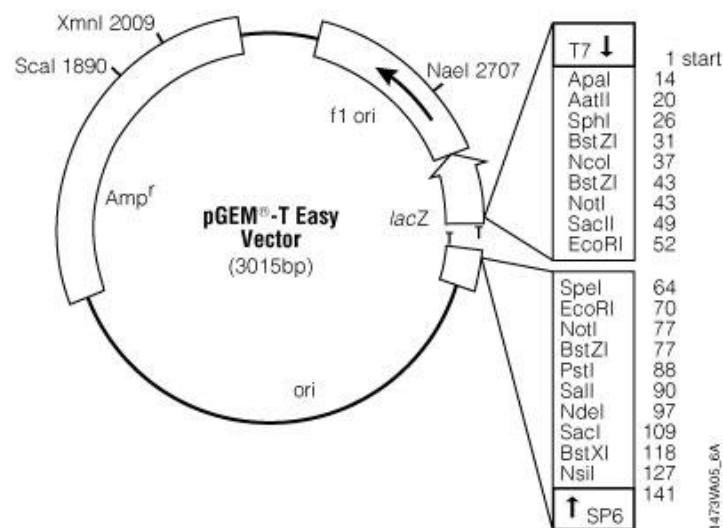


Figura 5. Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega) indicando a localização da origem de replicação do fago F1 (ori), do sítio múltiplo de clonagem flanqueado pelos promotores T7 e SP6, do operon LacZ e do gene de resistência à ampicilina.

4.8 Sequenciamento

Uma vez confirmada a presença dos insertos nos vetores, as construções foram sequenciadas pelo método Sanger pela Plataforma de Sequenciamento do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz Minas. As análises das sequências e montagem dos contigs foram realizadas com o auxílio de softwares como CloneManager, DNASTAR, BioEdit e MEGA.

4.9 Clonagem do gene *Kh1* em vetor pSP72αZEOα

Para amplificar a sequência codificante do gene *Kh1* por PCR, foram utilizados iniciadores 1 e 2 (Tabela 1), e a enzima Taq DNA polimerase *Phusion*[®] (New England Biolabs), nas condições indicadas na Tabela 2. O produto resultante da amplificação foi ligado em vetor pGEM e transformado em bactérias *E. coli* cálcio competentes TOP10F' (Invitrogen) conforme descrito no item 4.7. Após seleção de clones a partir do perfil de restrição enzimática, e confirmação da correta sequência do gene por sequenciamento, foi realizada a clivagem do vetor pSP72αZEOα e do inserto com as enzimas de restrição *Sall* e *Xbal*. A sequência do *Kh1* foi ligada em vetor pSP72αZEOα (Figura 6) utilizando enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e subclonado em bactérias *E. coli* TOP10F' (Item 4.7). Para a confirmação da presença de inserto esperado, foi realizada a PCR de colônia utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (Phoneutria), com iniciadores 1 e 2 (Tabela 1) e nas condições indicadas na Tabela 2. Ainda para confirmar a presença do inserto de interesse, os plasmídeos também foram digeridos com as enzimas de restrição *Sall* e *Xbal* e o perfil de restrição foi avaliado. Após confirmação da presença do inserto os plasmídeos foram purificados.

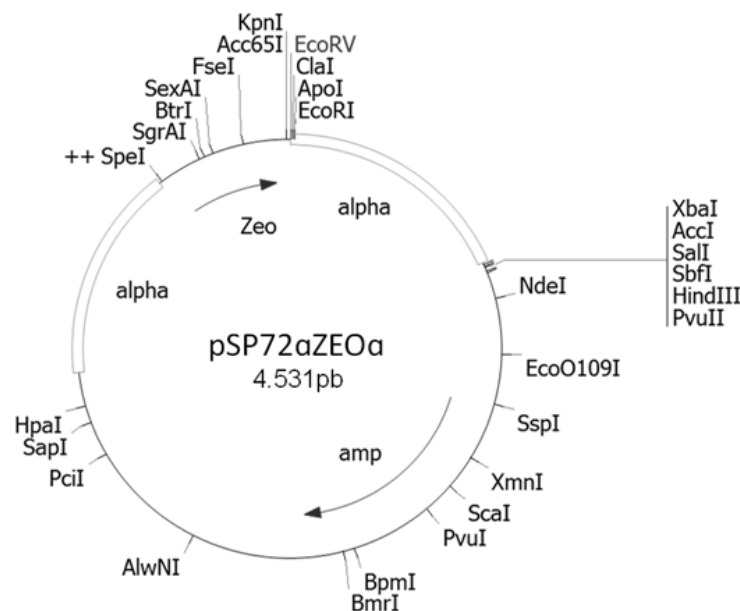


Figura 6. Mapa do vetor pSP72αZEOα. O vetor foi construído a partir do vetor pSP72 (Promega), por meio da adição de duas sequências intergênicas de alfa tubulina flanqueando o marcador de resistência. Inicialmente o vetor foi construído com a sequência de higromicina fosfotransferase, que foi substituída pelo gene da neomicina fosfotransferase (Papadopoulou, Roy, and Ouellette 1991) e mais tarde pelo gene da bleomicina que confere resistência à zeocina (Richard *et al.* 2004). No mapa estão indicados sítios de restrição; o gene de resistência à ampicilina e o gene de resistência à zeocina, flanqueado pelas sequências intergênicas de alfa tubulina.

4.10 Transfecções em formas promastigotas de *L. infantum*

Após confirmadas as sequências corretas das construções, as mesmas foram produzidas em larga escala em bactéria e purificadas. Culturas de promastigotas de *L. infantum* em fase log (com aproximadamente com 1×10^8 parasitos) foram lavadas, os sedimentos ressuspensos em 400 μL de HEPES-NaCl (20 mM de HEPES, 0.15 M de NaCl, 10 mM de glicose, pH 7.2) e incubadas com 5 μg de DNA linear ou 20 μg de DNA circular, no gelo, por 15 min. Após esse período foi realizada a eletroporação utilizando o equipamento Gene Pulser XCell™ (BioRad). Em todas as eletroporações foram aplicados dois pulsos de 1.500 V e 25 μF cada, como descrito previamente (Cruz, Coburn, and Beverley 1991; Robinson and Beverley 2003). Foram estabelecidos intervalos de 10 a 15 segundos entre os pulsos e as constantes de tempo ideais foram mantidas entre 3 e 6 ms. Após a eletroporação, as cubetas foram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida as culturas foram transferidas para garrafas de 25 cm^2 contendo 10 mL de meio α -MEN. A seleção das cepas foi realizada em meio líquido mediante adição do antibiótico marcador, com posterior seleção de clones em meio sólido na presença do antibiótico. Este processo foi repetido para cada uma das construções (5'*Kh1*::*NEO*::3'*Kh1* e 5'*Kh1*::*HYG*::3'*Kh1*) no intuito de deletar os dois alelos presentes em *L. infantum*. Uma terceira transfecção foi realizada para obtenção do *add-back* onde formas promastigotas de *Kh1*^{-/-} foram transfectadas com o plasmídeo pSP72 α ZEO α ::*Kh1*. Nesse último caso, a seleção das cepas foi realizada somente em meio líquido mediante adição do antibiótico marcador, e foram obtidos parasitos com o gene *Kh1* na forma episomal. Em paralelo, um controle, transfectado com o vetor vazio (mock) pSP72 α ZEO α Ø, foi estabelecido.

Os parasitos mutantes foram mantidos na presença das drogas específicas para os marcadores de resistência adquiridos na transfecção. As concentrações das drogas estão indicadas na Tabela 3.

Tabela 3. Marcadores de resistência usados no estudo

Gene	Droga	Concentração	Referências
Higromicina fosfotransferase B (HYG)	Hygromycin (HYG) (Invitrogen, Life Technologies)	600 µg/mL	Cruz <i>et al.</i> 1991
Neomicina fosfotransferase (NEO)	Geneticin [®] (G418) (Gibco, Life Technologies)	80 µg/mL	Asbroek <i>et al.</i> 1990; Cruz & Beverley 1990
Bleomicina (BLEO)	Zeocin [™] (ZEO) (Invitrogen, Life Technologies)	800 µg/mL	Freedman & Beverley 1993

4.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmar deleções

Para confirmação da deleção do gene *Kh1* foi realizada a PCR para verificar a presença das sequências codificantes de *Kh1* (iniciadores 1 e 2), *HYG* (iniciadores 8 e 9) e de *NEO* (iniciadores 10 e 11). Também foi verificada a integração dos cassetes por meio da reação de PCR usando iniciadores que anelam no interior da sequência de cada cassete (iniciadores 13 e 14) e outro que reconhece uma região cromossômica que flanqueia a sequência do cassete (iniciador 12), conforme indicado na Tabela 1. As reações foram realizadas utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (Phoentria) de acordo com as condições indicadas na Tabela 2.

4.12 Quantificação do número de cópias gênicas

Para quantificar o percentual de perda no número de cópias de *Kh1*, foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O DNA genômico dos parasitos foi extraído e amplificado com iniciadores de *Kh1* na presença do intercalante *Power SYBR[®] Green Master Mix* (Applied Biosystems[®]). A intensidade de fluorescência emitida pelo *SYBR Green* ao intercalar na fita dupla de DNA genômico é proporcional à quantidade de DNA produzido, aumentando a cada ciclo. A fluorescência emitida é convertida em uma curva de amplificação e quantidade de DNA é então calculada como base na análise do Ct (*cycle threshold*). Os valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade inicial de DNA. A quantificação absoluta e relativa foi obtida pela comparação com o *background* selvagem. Para quantificação relativa foram utilizados dois genes constitutivos como normalizadores:

GAPDH (LinJ.36.2480) e *DNA polimerase* (LinJ.16.1640). Em cada reação foi utilizado 1 µL de DNA genômico a 100 ng/µL. As sequências dos iniciadores utilizados (iniciadores 15 a 20) podem ser encontradas na Tabela 1. As condições das reações de PCR estão indicadas na Tabela 2. Os ensaios de qPCR foram realizados na plataforma de PCR em tempo real do CPqRR/Fiocruz Minas. Os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Applied Biosystems 2004).

4.13 Southern blot

O DNA genômico de cada um dos parasitos foi extraído e digerido com as enzimas de restrição *PvuII* e *NdeI*. As reações de digestão foram incubadas a 37 °C por 16 h e em seguida as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1 %. Os géis foram tratados com solução de HCl 0,25 M HCl por 15 min e em seguida desnaturado por solução alcalina (0,5 M NaOH e 1,5 M NaCl) por 45 min. A neutralização foi feita em solução de equilíbrio (Tris-HCl 0,5 M HCl e 3 M NaCl, pH 7) por 20 min. Posteriormente os fragmentos foram transferidos por capilaridade para membranas de náilon (Hybond-Amersham Biosciences) em tampão SSC 10 X (1,5 M NaCl; 150 mM citrato de sódio), por 16-20 h. Após secar, as membranas foram expostas à luz ultra-violeta utilizando o equipamento UV Stratalinker® 1800 para que ocorresse fixação dos fragmentos de DNA (*crosslink*). As membranas foram então hibridizadas com sondas marcadas com fósforo radioativo (dCTP³²), específicas para *Kh1* e para região 5'UTR de *Kh1* (Tabela 1). Após a hibridização, as membranas foram lavadas e expostas a filme fotográfico por 48 h para elucidação das bandas. Os experimentos de hibridização foram realizados com a colaboração do Dr. Marc Ouellette (Depto. de Microbiologia, Infectologia e Imunologia da Universidade Laval, Québec, Canadá). Após aquisição as imagens, as análises densitométricas foram realizadas em nosso laboratório utilizando o software ImageJ.

4.14 Curva de Crescimento das formas promastigotas

Os parasitos foram incubados em uma concentração de 1×10^6 parasitos por mL em meio α -MEN, à 26 °C. O número de parasitos foi determinado diariamente utilizando o contador de células Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter™). A análise estatística das curvas de crescimento

foi realizada usando o teste 2way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Para avaliar possível alteração na morfologia dos parasitos, foram confeccionadas lâminas ao longo da curva de crescimento. Os parasitos foram fixados na lâmina com metanol e posteriormente foi realizada coloração utilizando o Panótico Rápido (Laborclin) e as imagens obtidas por câmera Nikon® L810 em Microscópio *Olimpus BH2 System Microscope*.

4.15 Avaliação da suscetibilidade dos mutantes *Kh1*^{-/-} ao antimônio

Parasitos na forma promastigota foram lavados, contados e posteriormente incubados na concentração de 1×10^6 parasitos/mL na presença de diferentes concentrações de tartarato de antimônio (Sigma) como fonte de SbIII, a 26 °C por 72 h. O número de parasitos crescidos na presença e na ausência da droga foi determinado utilizando o contador de células *Z1 Coulter® Particle Counter* (Beckman Coulter™). A concentração que inibe 50 % do crescimento (IC_{50}) foi determinada por regressão não-linear utilizando o programa *GraphPad Prism, Inc*.

4.16 Modulação do transporte de glicose nos mutantes *Kh1*^{-/-}

Para avaliar se KH1 está envolvida com o transporte de glicose, os parasitos WT e *Kh1*^{-/-} (1×10^8 parasitos/mL) foram lavados, ressuspendidos em PBS 1 X (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) e incubados a 37 °C com 90 µM do análogo fluorescente da glicose 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) (Invitrogen™). Como controle, os parasitos também foram incubados com 2 mM de glicose antes da incubação com 2-NBDG. Após as incubações, os parasitos foram lavados três vezes com PBS 1 X a fim de retirar todo 2-NBDG que não foi incorporado. As amostras foram lisadas com Tween-20 e em seguida avaliadas em espectrofluorímetro SpectraMax M5 (Molecular Devices) quanto a intensidade de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 488/560 nm, respectivamente.

4.17 Infecção de células THP-1

Monócitos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 foram diferenciados em macrófagos pela adição de 20 ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA) em cultura. Após 72 h, macrófagos THP-1 foram infectados

com formas promastigotas estacionárias na proporção de 10 leishmanias para cada macrófago (10:1), por um período de 6 h. Os parasitos que não foram capazes de infectar os macrófagos foram retirados por meio de lavagens sucessivas e os macrófagos infectados foram incubados em meio RPMI-1640. O desenvolvimento das amastigotas intracelulares foi acompanhado durante 10 dias. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin) e fotografadas por câmera Nikon® L810 em Microscópio *Olimpus BH2 System Microscope*. A infecção foi quantificada por meio contagem de amastigotas intracelulares utilizando o programa gratuito *ImageJ*.

4.18 Infecção de Macrófagos peritoneais murinos

Os macrófagos peritoneais murinos elicitados por tioglicolato foram coletados de camundongos BALB/c e C57BL/6 por lavagem peritoneal com RPMI-1640 e semeados em placa de 24 poços na concentração de 3×10^5 células/poço. Após 18 h de aderência a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, os macrófagos foram incubados com parasitos na fase estacionária, numa concentração de 10 leishmanias para cada macrófago (10:1). Os parasitos que não foram capazes de infectar os macrófagos foram retirados por meio de lavagens sucessivas após 6 h de incubação e a infectividade dos mutantes foi acompanhada durante 16 dias. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin) e fotografadas por câmera Nikon® L810 em Microscópio *Olimpus BH2 System Microscope*. A infecção foi quantificada por meio contagem de amastigotas intracelulares utilizando o programa gratuito *ImageJ*.

4.19 Avaliação da produção de óxido nítrico pelo método de Griess

Para avaliação da produção de óxido nítrico (NO), os macrófagos peritoneais murinos, coletados conforme especificado no item 4.18, foram semeados em placa de 96 poços em uma concentração de 3×10^5 células/poço. Após 5 h de aderência 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, foi adicionado aos poços IFN- γ na concentração de 3 U/mL. Foram incubados por mais 18 h a 37 °C e 5 % de CO₂, e em seguida infectados com parasitos na fase estacionária em uma concentração de 10 leishmanias para cada macrófago (10:1). Os parasitos que não foram capazes de infectar os macrófagos foram retirados por meio de lavagens sucessivas após 6 h de

incubação. Como controle positivo do ensaio, macrófagos não infectados foram estimulados pela adição de lipofosfoglicanos (LPS) em uma concentração de 0,1 µg/mL. Após 48 h de incubação, foi realizada a dosagem de nitrito (NO₂⁻) no sobrenadante, já que é um dos produtos primários do NO. Para tal, foi utilizado o método de Griess. A placa foi centrifugada a 3.300 x g por 10 min e 50 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa nova. Na mesma placa foi montada uma curva de calibração, com concentrações de nitrito variando entre 100 e 1,56 µM. Sob proteção da luz, foi adicionado a cada poço 50 µL da solução de sulfanilamida e após 10 min de incubação, 50 µL da solução de cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED). Após nova incubação de 10 min, foi realizada a leitura da absorbância a 520 nm em espectômetro *SpectraMax 190 Microplate Reader* (Molecular Devices). Os resultados foram analisados utilizando o programa SoftMax[®] Pro.

4.20 Avaliação do ciclo celular dos mutantes *Kh1*^{-/-}

Para realizar a purificação das formas amastigotas, macrófagos THP-1 infectados (item 4.18) foram coletados no 4º dia de infecção usando *cell scrapper* (Nunc[™]), lavados com tampão Hepes-NaCl, ressuspendidos em 800 µL de Hepes-NaCl e passados 30 vezes em agulha 27G X 4 11/16" para que ocorresse rompimento dos macrófagos e liberação das amastigotas. As amastigotas foram separadas dos fragmentos celulares pelo emprego de centrifugações diferenciais. Foi realizada uma centrifugação a 134 x g por 5 min de forma que as amastigotas ficassem no sobrenadante e os fragmentos celulares no sedimento. O sobrenadante foi coletado e lavado 4 vezes com solução Hepes-NaCl em centrifugações de 1.200 x g por 5 min. Foi realizada contagem das amastigotas e ressusensão de 300.000 parasitos em 300 µL da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1 % (p/v) e triton X 100 0,1 % (p/v), 50 µg/mL de iodeto de propídeo (PI) e água milli-Q (volume final = 50 mL)]. As amostras foram incubadas por 4 h a 4 °C, protegidos da luz. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCalibur[®], BD, EUA), adquirindo-se 50.000 eventos/amostra. A leitura no citômetro foi realizada na plataforma de Citometria do CPqRR/Fiocruz Minas. A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo[®] (FlowJo, LLC).

4.21 Infecção de camundongos e recuperação dos parasitos

Para avaliar a infectividade dos mutantes, camundongos Balb/c e camundongos nocautes para IFN- γ (3 ou 4 por grupo) foram infectados com parasitos WT e *Kh1*^{-/-}. As vias utilizadas para infecção, concentração e forma dos parasitos estão indicados na Tabela 4. Para recuperar os parasitos foram coletados os baços e fígados dos animais infectados. Os órgãos foram processados usando *cell strainer* (Corning®) e as amostras incubadas em α -MEN. As culturas foram acompanhadas por até 2 meses. Os protocolos propostos para uso dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA nº LW-28/14 – “Identificação de novos candidatos para drogas e vacinas contra Leishmanioses” - ANEXO I).

4.22 Diluição limitante

Os ensaios de diluição limitante foram realizados conforme proposto por (Titus *et al.* 1985). Fígado e baço de camundongos infectados (item 4.21) foram processados usando *cell strainer* e as amostras centrifugadas a 134 x g por 10 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de meio α -MEN no caso do baço, ou 5 mL no caso do fígado. As amostras foram adicionadas nos primeiros poços de placas de 96 poços e dessa concentração inicial de células foram realizadas diluições sucessivas até o 12º poço, utilizando o fator de diluição de 10 x. As placas foram incubadas por 15 dias a 26 °C e então avaliadas quanto ao crescimento dos parasitos.

Tabela 4. Esquema de infecção dos Camundongos

Camundongos	Camundongos por grupo	Parasitos	Inólulo	Via de administração	Eutanásia (semanas)	
Balb/c	4	Promastigotas	WT	1 x 10 ⁶ parasitos	veia da cauda	2
			<i>Kh1</i> ^{-/-}			
	3	Amastigotas	WT	1 x 10 ⁶ parasitos	intraperitoneal	2
			<i>Kh1</i> ^{-/-}			
C57BL/6 nocaute para IFN γ	3	Promastigotas	WT	1 x 10 ⁷ parasitos	intraperitoneal	2
		<i>Kh1</i> ^{-/-}				

5 RESULTADOS

5.1 Produção das construções destinadas à deleção do gene *Kh1*

Com o objetivo de construir os cassetes $5'Kh1::NEO::3'Kh1$ e $5'Kh1::HYG::3'Kh1$ para deleção do gene *Kh1*, esquematizados na Figura 7A, as sequências de interesse foram amplificadas, separadas em gel de agarose e purificadas com utilização do *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen). Na Figura 7B podem ser observados os produtos de PCR com tamanho esperado. A partir dos fragmentos purificados foi realizada a PCR de fusão e cassetes de tamanho esperado foram obtidos com sucesso (Figura 7C).

Os cassetes obtidos na PCR de fusão foram purificados do gel, ligados em vetor pGEM-Teasy e transformados em bactérias *E. coli* TOP10F'. Foi realizada a triagem das colônias pela digestão dos plasmídeos purificados com as enzimas de restrição *Sall* e *Xbal* para verificar aquelas que possuíam o inserto de tamanho correto. Os resultados da triagem podem ser visualizados na Figura 8 e demonstram a alta eficiência das clonagens, sendo obtidos fragmentos de tamanho esperado em todas as colônias. Após a triagem foi realizado o sequenciamento dos produtos de miniprep das colônias positivas. Todas as colônias apresentaram a sequência correta para os cassetes $5'Kh1::NEO::3'Kh1$ e $5'Kh1::HYG::3'Kh1$ (ANEXOS II e III). Uma colônia de cada cassete foi crescida em grande quantidade em meio LB e os plasmídeos foram purificados com o *QIAprep® Spin Miniprep Kit* e digeridas com as enzimas de restrição *Sall* e *Xbal*. Os cassetes foram purificados do gel de agarose (Figura 9), dosados e usados para realizar as transfecções em promastigotas de *L. infantum*.

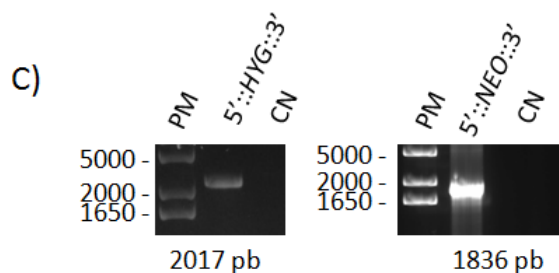
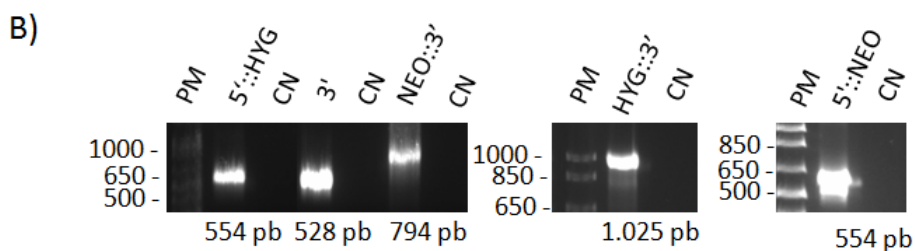
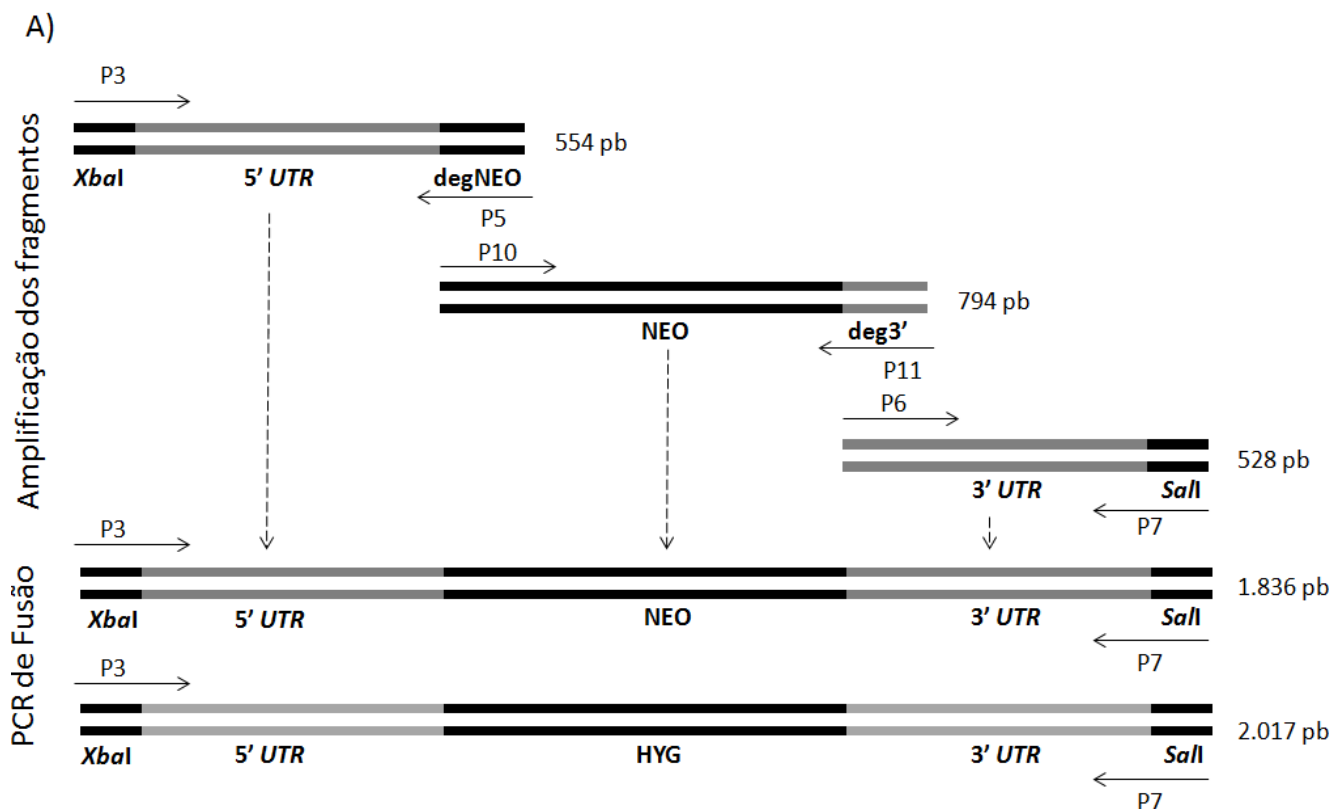


Figura 7. Construção dos cassetes por PCR de Fusão. A) Esquema para construção dos cassetes para deleção do gene *Kh1*, indicando o tamanho dos fragmentos a serem obtidos e o tamanho de cada cassete após PCR de Fusão. Cada fragmento possui região de homologia com a próxima sequência a ser inserida no cassete. B) Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR para amplificação dos fragmentos: 5'UTR de *Kh1* com sequência que sobrepõe a sequência codificante de HYG (5'::HYG); sequência codificante de HYG com sequência que sobrepõe 3'UTR de *Kh1* (HYG::3'); 5'UTR de *Kh1* com sequência que sobrepõe a sequência codificante de NEO (5'::NEO); sequência codificante de NEO com sequência que sobrepõe 3'UTR de *Kh1* (NEO::3'); e 3'UTR de *Kh1*. C) Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos das PCRs resultantes da fusão dos três fragmentos que culminaram com a construção dos cassetes NEO e HYG. PM: marcador de peso molecular; CN: controle negativo.

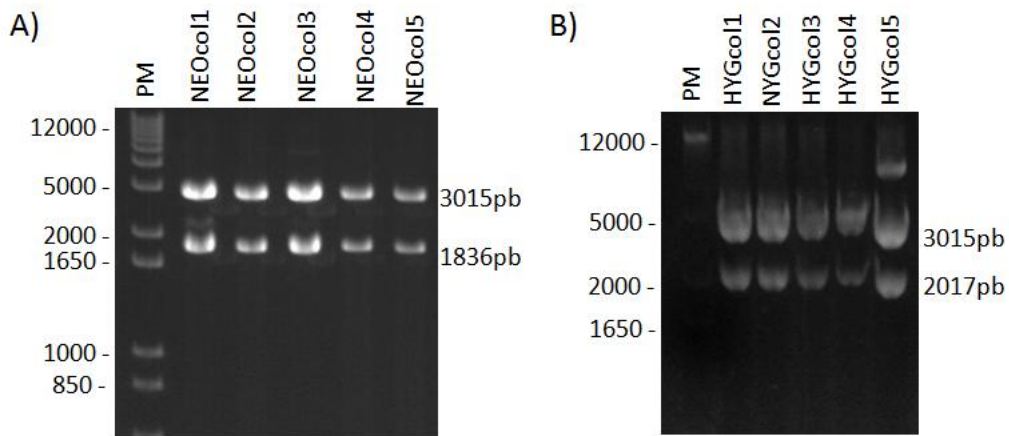


Figura 8. Triagem de colônias por perfil de restrição enzimática. Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos da reação de digestão de A) pGEM-NEO e B) pGEM-HYG com as enzimas de restrição *SalI* e *XbaI* para triagem das colônias obtidas após transformação. PM: marcador de peso molecular.

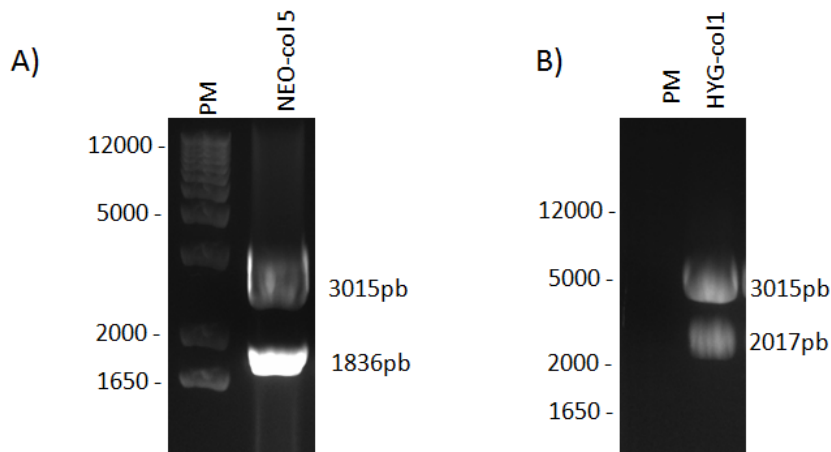


Figura 9. Purificação dos cassetes. Eletroforese em gel de agarose 1 % dos produtos da reação de digestão de A) pGEM-NEO e B) pGEM-HYG com as enzimas de restrição *SalI* e *XbaI* para purificação dos cassetes. PM: marcador de peso molecular.

5.2 Clonagem do gene *Kh1* em vetor pSP72 α ZEO α

Após deleção do gene *Kh1* foi realizada uma terceira transfecção com os plasmídeos pSP72 α ZEO α Ø (plasmídeo vazio, com zeocina como marcador de seleção) e pSP72 α ZEO α ::*Kh1* (plasmídeo contendo o gene *Kh1* e com zeocina como marcador de seleção).

Para construção do plasmídeo pSP72 α ZEO α ::*Kh1* inicialmente foi realizada a amplificação do gene *Kh1* de *L. infantum* e a clonagem da sequência no vetor pGEM®-T Easy (Figura 10A). A seleção das colônias positivas foi realizada a partir da digestão (Figura 10B) e do sequenciamento (ANEXO IV). A partir da seleção de uma colônia com a sequência correta do gene, foi realizada a subclonagem da mesma no vetor pSP72 α ZEO α . Para tal, o vetor e os insertos foram digeridos com as enzimas de restrição *SalI* e *XbaI*, e em seguida ligados usando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). Vale ressaltar que, como os sítios de restrição das enzimas *SalI* e *XbaI* estão muito próximos no vetor pSP72 α ZEO α (Figura 6), nenhum fragmento foi liberado após a digestão, como podemos observar na Figura 10C. Após ligação e transformação em *E. coli* TOP10F', a seleção da colônia para realizar a purificação do plasmídeo foi realizada com base na PCR de colônia e na digestão (Figura 10D-E).

Após seleção da colônia foi realizada a purificação do plasmídeo para realização da transfecção nos parasitos *Kh1*^{-/-} (clone1). Também foi realizada, simultaneamente, a purificação do plasmídeo vazio pSP72 α ZEO α Ø para ser utilizado como controle.

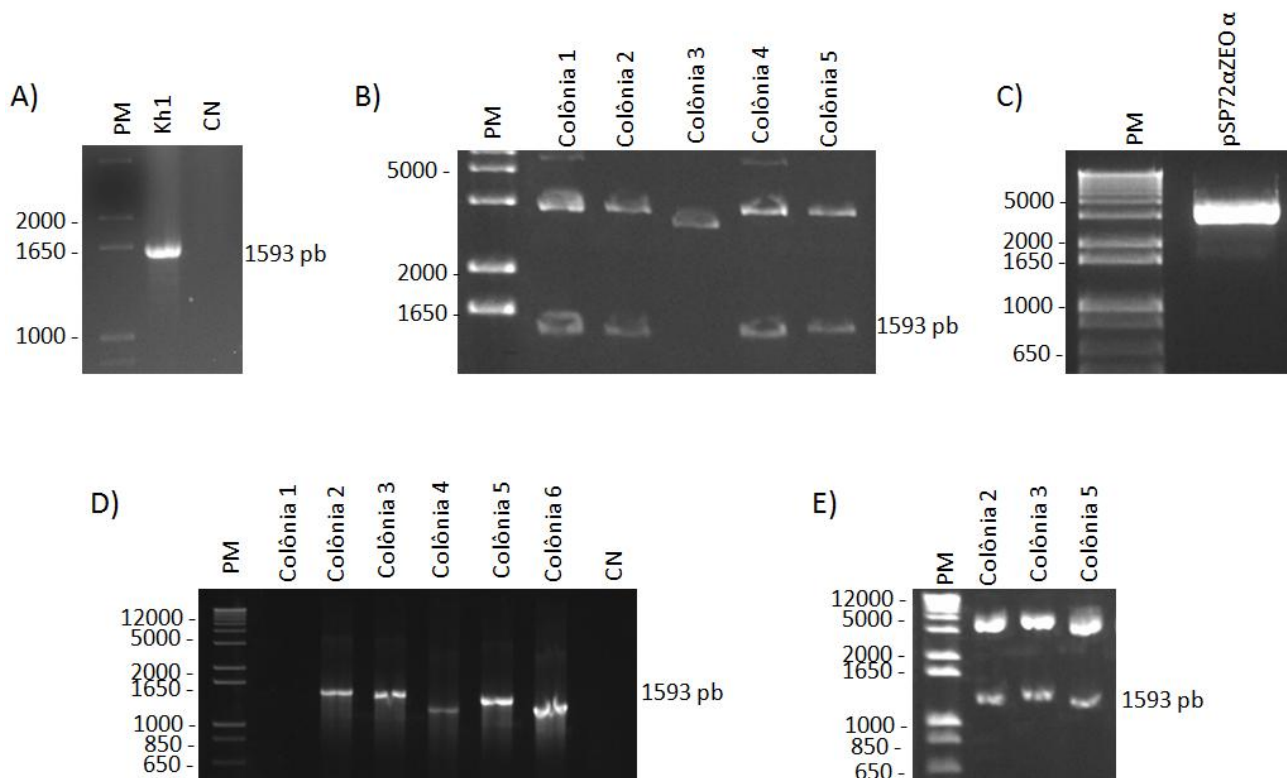


Figura 10. Construção do plasmídeo pSP72αZEOα::Kh1. A) PCR para amplificação do gene *Kh1*. B) Digestão com as enzimas de restrição *Sall* e *XbaI* para triagem das colônias positivas após clonagem no vetor pGEM-T easy. C) Digestão do vetor pSP72αZEOα com as enzimas de restrição *Sall* e *XbaI*. D) PCR de colônia e E) Digestão com as enzimas de restrição *Sall* e *XbaI* para triagem das colônias positivas após clonagem de *Kh1* no vetor pSP72αZEOα. PM: marcador de peso molecular; CN: Controle negativo.

5.3 Transfecções em *L. infantum*

Após a obtenção dos cassetes e dos plasmídeos, foram realizadas as transfecções em *L. infantum*. Inicialmente foram realizadas transfecções com ambos cassetes $5'Kh1::NEO::3'Kh1$ e $5'Kh1::HYG::3'Kh1$ de forma isolada, de forma a substituir a primeira cópia do gene *Kh1* por neomicina e por higromicina respectivamente. A seleção dos mutantes foi realizada em meio αMEN mediante adição dos antibióticos marcadores (G418 ou higromicina) de acordo com especificações da Tabela 3. Inicialmente a seleção foi realizada em líquido por cerca de uma semana e em seguida em semi-sólido por cerca de 12 dias. Após a seleção em meio semi-sólido foram obtidos 4 clones cuja

deleção da primeira cópia de *Kh1* foi realizada utilizando o cassete 5'*Kh1::NEO::3'Kh1* e outros quatro clones cuja deleção foi realizada utilizando o cassete 5'*Kh1::HYG::3'Kh1*, conforme demonstrado na Tabela 5.

Para deletar a segunda cópia do gene *Kh1*, um dos clones de parasitos cuja deleção da primeira cópia havia sido realizada com cassete 5'*Kh1::NEO::3'Kh1* (clone *LiKh1^{-/+}::NEO*) foi transfectado com o cassete 5'*Kh1::HYG::3'Kh1*. De forma semelhante à primeira deleção, a seleção dos mutantes foi realizada em meio α MEN líquido e em seguida em meio α MEN semi-sólido, sendo que foi realizada a adição de ambos antibióticos marcadores G418 e higromicina de acordo com especificações da Tabela 3. Após cerca de 3 semanas foram selecionados 6 clones de parasitos com deleção nas duas cópias do gene *Kh1* (parasitos *LiKh1^{-/-}*) (Tabela 5).

Para reinserir o gene *Kh1* nos parasitos nocaute *LiKh1^{-/-}*, um dos clones obtidos foi transfectado com o plasmídeo pSP72 α ZEO α ::*Kh1* na forma circular. A seleção dos parasitos foi feita somente em meio α MEN líquido mediante adição de zeocina (Tabela 3) e após 1 semana foi obtida uma população de parasitos *Kh1^{-/-}[pSP72 α ZEO α ::*Kh1*]* (*add back*). Também foi realizada, como controle, a transfecção do plasmídeo vazio pSP72 α ZEO α \emptyset em parasitos nocaute *LiKh1^{-/-}* (Tabela 5).

Tabela 5. Mutantes gerados no estudo

Mutante	Descrição	Forma de Seleção	Clones Isolados
LiKh1^{-/+}::NEO	Deleção da primeira cópia do gene <i>Kh1</i> em <i>L. infantum</i> usando o cassete de resistência a NEO.	clonal	4
LiKh1^{-/+}::HYG	Deleção da primeira cópia do gene <i>Kh1</i> em <i>L. infantum</i> usando o cassete de resistência a NEO.	clonal	4
LiKh1^{-/-}	Deleção da segunda cópia do gene <i>Kh1</i> nos parasitos <i>LiKh1^{-/+}::NEO</i> usando o cassete de resistência a HYG.	clonal	6
<i>Kh1^{-/-}[pSP72αZEOα::\emptyset]</i> (controle)	Parasitos <i>LiKh1^{-/-}</i> transfectados com plasmídeo pSP72 α ZEO α vazio na forma circular.	população	-
<i>Kh1^{-/-}[pSP72αZEOα::<i>Kh1</i>]</i> (add back)	Reinserção do gene <i>Kh1</i> nos parasitos <i>LiKh1^{-/-}</i> por meio da transfecção plasmídeo pSP72 α ZEO α :: <i>Kh1</i> na forma circular.	população	-

5.4 *Kh1* não é um gene essencial para *L. infantum*

Após a realização das transfecções, para confirmar a deleção do gene *Kh1* nos diferentes clones, foram realizados PCRs convencionais, qPCR e *Southern blot*. Os resultados das PCRs podem ser observados na Figura 11. Todos os clones obtidos apresentaram fragmentos de tamanho esperado para as sequências de higromicina e de neomicina (Figura 11A-B), assim como fragmentos de tamanho esperado nas PCRs de integração de ambos os cassetes (Figura 11C-D).

Na PCR realizada para amplificar o gene *Kh1* (Figura 11E) observamos fragmentos de tamanho esperado para o gene nas amostras WT, *Kh1*^{-/+}, *add-back* (*Kh1*^{-/-}[*pSP72αZEOα::Kh1*]) e também no controle positivo (plasmídeo *pSP72αZEOα::Kh1* livre). Por outro lado, as amostras *Kh1*^{-/-} e *Kh1*^{-/-} [*pSP72αZEOα∅*] não apresentaram o fragmento de tamanho esperado do gene *Kh1* de 1593 pb. Essas amostras apresentaram amplificações inespecíficas, menos intensas e de tamanho maior que o esperado para o gene *Kh1*. Apesar de inúmeras tentativas para padronizar a reação de PCR, as bandas inespecíficas não desapareceram. Diante desse resultado, para confirmar a deleção do gene *Kh1* foram também realizados a qPCR e o *Southern blot*.

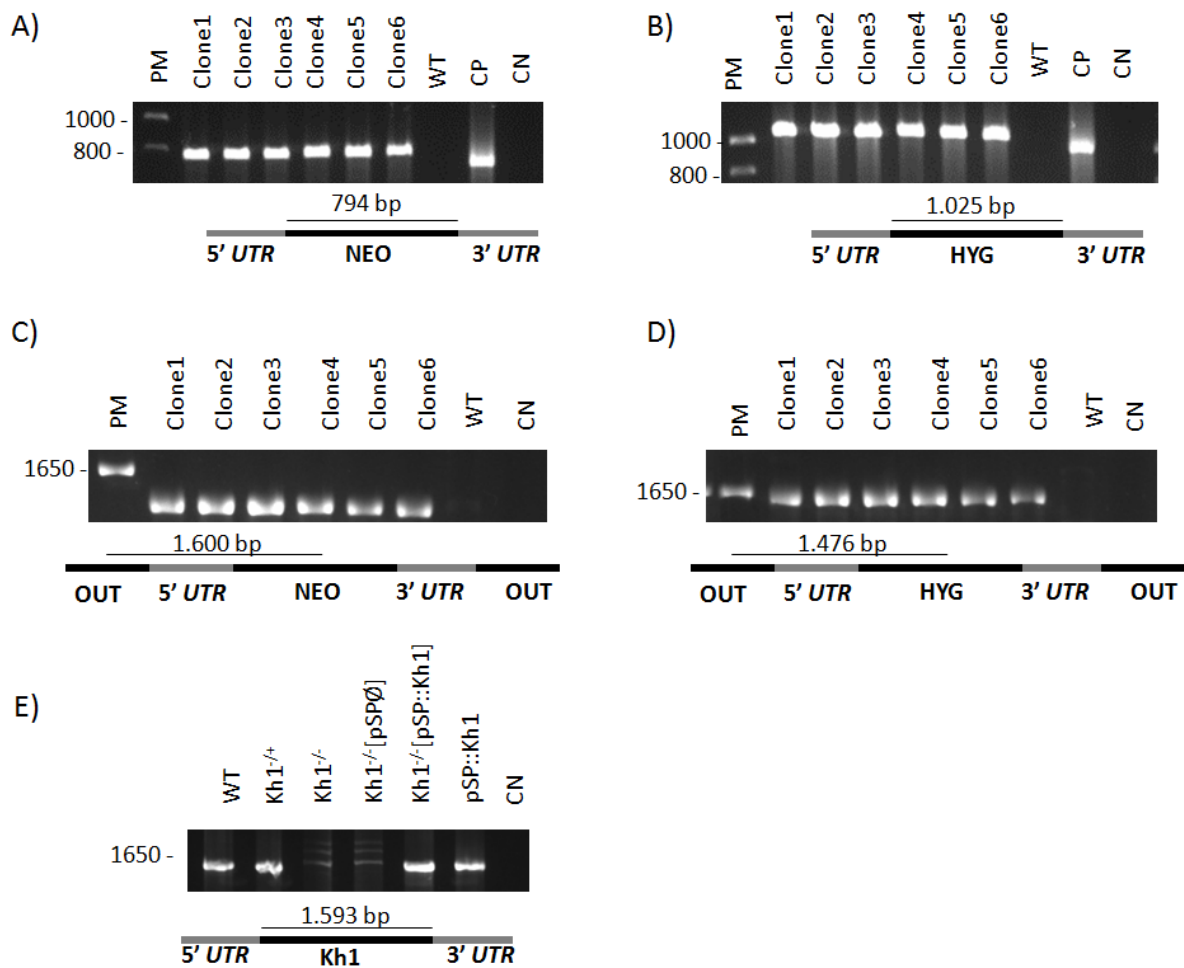
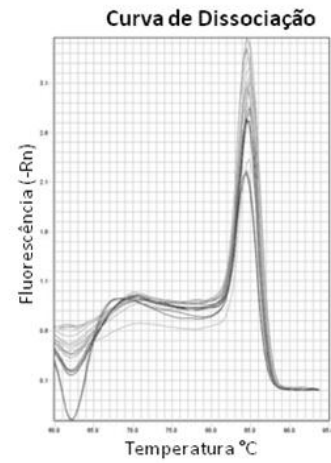
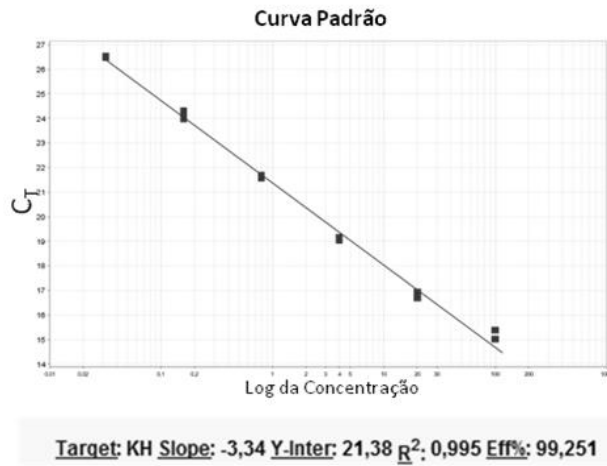


Figura 11. Deleção do gene *Kh1* por recombinação homóloga usando os cassetes NEO e HYG. Amplificação dos genes NEO (A) e HYG (B) nos parasitos selvagens e mutantes. C) A deleção da primeira cópia de *Kh1* pelo cassete NEO foi confirmada pela utilização de um iniciador que anela em uma região 5'UTR fora do cassete e por outro iniciador que anela no interior do cassete de NEO. D) A deleção da segunda cópia de *Kh1* pelo cassete HYG foi confirmada pela utilização de um iniciador que anela em uma região 5'UTR fora do cassete e por outro iniciador que anela no interior do cassete de HYG. Após a segunda transfecção os clones apresentam ambos os fragmentos NEO e HYG com tamanho esperado. E) PCR realizada para verificar a presença do gene *Kh1*. Os tamanhos dos fragmentos obtidos estão esquematizados abaixo de cada gel. PM: Padrão de peso molecular; CP: controle positivo; CN: controle negativo.

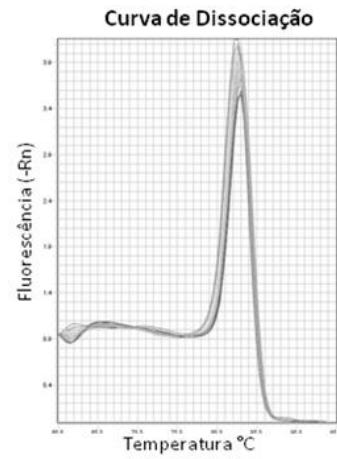
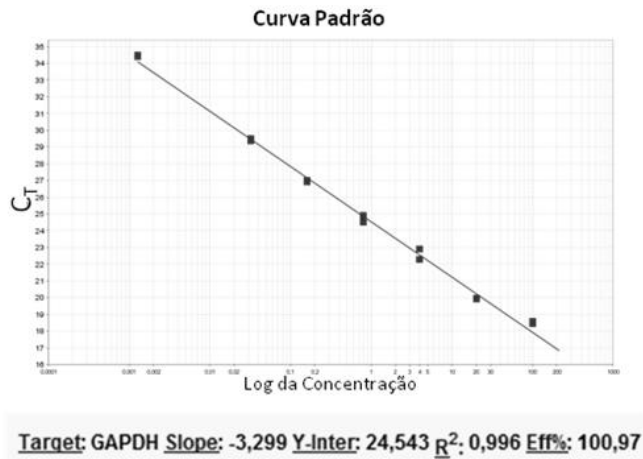
A qPCR foi realizada para avaliar o número de cópias do gene *Kh1*. Nesse ensaio foi utilizado o *SYBR Green* para detecção do DNA genômico amplificado. Inicialmente foi realizada uma padronização da reação de qPCR, cujos resultados podem ser observados na Figura 12. Foram avaliados os iniciadores para amplificação dos genes *Kh1*, *GAPDH* e *DNA polimerase*, e como amostra foi utilizada uma mistura composta de DNA genômico de *L. infantum* WT dos diferentes mutantes. Por meio da análise da curva de calibração foi obtida a eficiência de cada par de iniciadores; enquanto que curvas de dissociação evidenciam suas especificidades (Figura 12). Todos os iniciadores foram específicos, o que foi demonstrado pelos picos únicos nas curvas de dissociação, e apresentaram eficiência semelhante, muito próximas a 100 %. Esses resultados demonstram que o número de cópias do gene *Kh1* pode ser comparado entre as amostras utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizado com os valores obtidos para os genes constitutivos *GAPDH* e *DNA polimerase*.

Após a padronização foi realizada amplificação das amostras. Não foi observada amplificação do gene em nenhum dos clones *Kh1*^{-/-}, resultado que pode ser observado na Figura 13. A amostra *Kh1*^{+/-} apresenta cerca da metade do número de cópias de *Kh1* quando comparada com a amostra WT. Já a amostra *Kh1*^{-/-}[pSP72αZEOα::Kh1] apresenta 1,5 a 1,8 vezes o número de cópias de *Kh1* em relação à WT.

A)



B)



C)

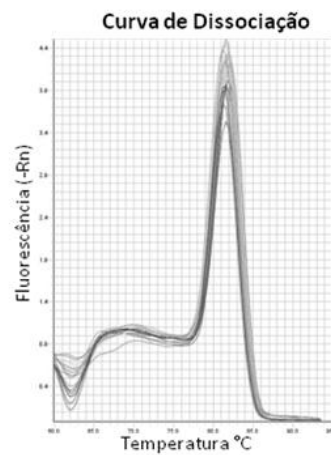
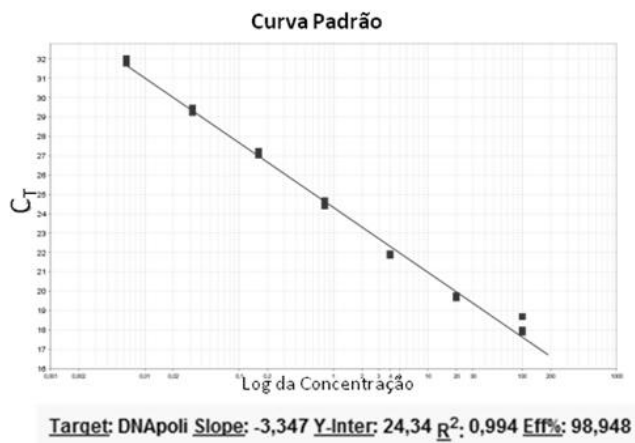


Figura 12. Padronização da qPCR. Amplificação dos genes *Kh1*, *GAPDH* e *DNA polimerase* por qPCR. Curvas padrão e curvas de dissociação dos gene *Kh1* (A), *GAPDH* (B) e *DNA polimerase* (C).

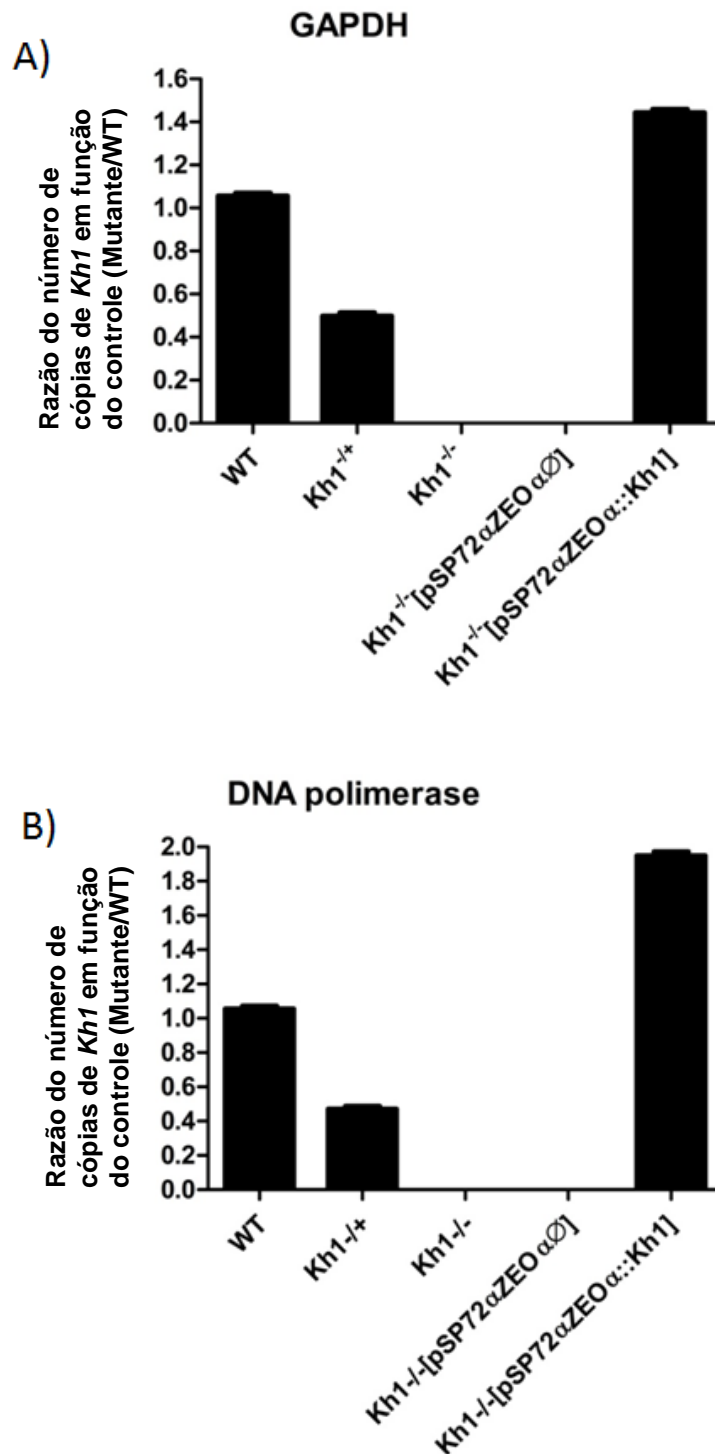


Figura 13. Comparação do número de cópias do gene *Kh1* nos mutantes. O número de cópias foi determinado quantitativamente em relação ao número de cópias dos genes constitutivos *GAPDH* e *DNA polimerase* por PCR quantitativo em tempo-real usando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os iniciadores utilizados apresentaram eficiência semelhante, permitindo a comparação: *Kh* 99,25 % de eficiência, *GAPDH* 100,97 % de eficiência e *DNApol* 98,95 % de eficiência.

Para confirmar a ocorrência das deleções, foi realizado também o *Southern blot*. A enzima de restrição *NdeI* é capaz de clivar a região 5'UTR e a sequência de *HYG* em apenas um ponto. Já a enzima de restrição *PvuII* é capaz de clivar as sequências de *Kh1* e de *NEO*, cada uma em apenas um ponto, como podemos observar no esquema apresentado na Figura 14A.

Para ambas as sondas foi obtido o perfil de bandas esperado. A sonda que reconhece a região 5'UTR (Figura 14B) revelou uma banda de cerca de 1.228 pb, correspondente ao fragmento do gene *Kh1* somente nas amostras WT e *Kh1*^{+/+}. A amostra *Kh1*^{-/-} também apresentou uma banda menor que corresponde ao fragmento de NEO. Ambos os clones *Kh1*^{-/-} apresentaram bandas de tamanho esperado para os fragmentos de NEO e HYG. A diferença de tamanho observada entre os fragmentos dos clones 1 e 2 pode ser devido a distorção da corrida no gel de agarose. De forma a confirmar a deleção, esses clones não apresentaram a banda correspondente ao gene *Kh1*, confirmando o caráter não essencial do mesmo. Como podemos observar na Figura 14C, a sonda que reconhece o gene *Kh1* revelou uma banda de tamanho esperado nas amostras WT e *Kh1*^{+/+}, indicando a presença do gene nessas amostras, sendo que, de acordo com a análise densitométrica, *Kh1*^{-/-} apresenta cerca da metade do número de cópias de *Kh1* quando comparada com a amostra WT. Não existe reconhecimento de nenhuma banda nas amostras dos duplos nocautes, confirmando o sucesso da deleção. Na amostra do *add-back*, a sonda *Kh1* reconhece grande quantidade de DNA possivelmente extracromossomal dos plasmídios circulares, que corresponde a construção pSP72αZEOα::Kh1, que está presente nos parasitos (Figura 14C).

Em conjunto, os resultados das PCRs, da qPCR e do *Southern blot* confirmam a completa deleção do gene *Kh1* nos mutantes.

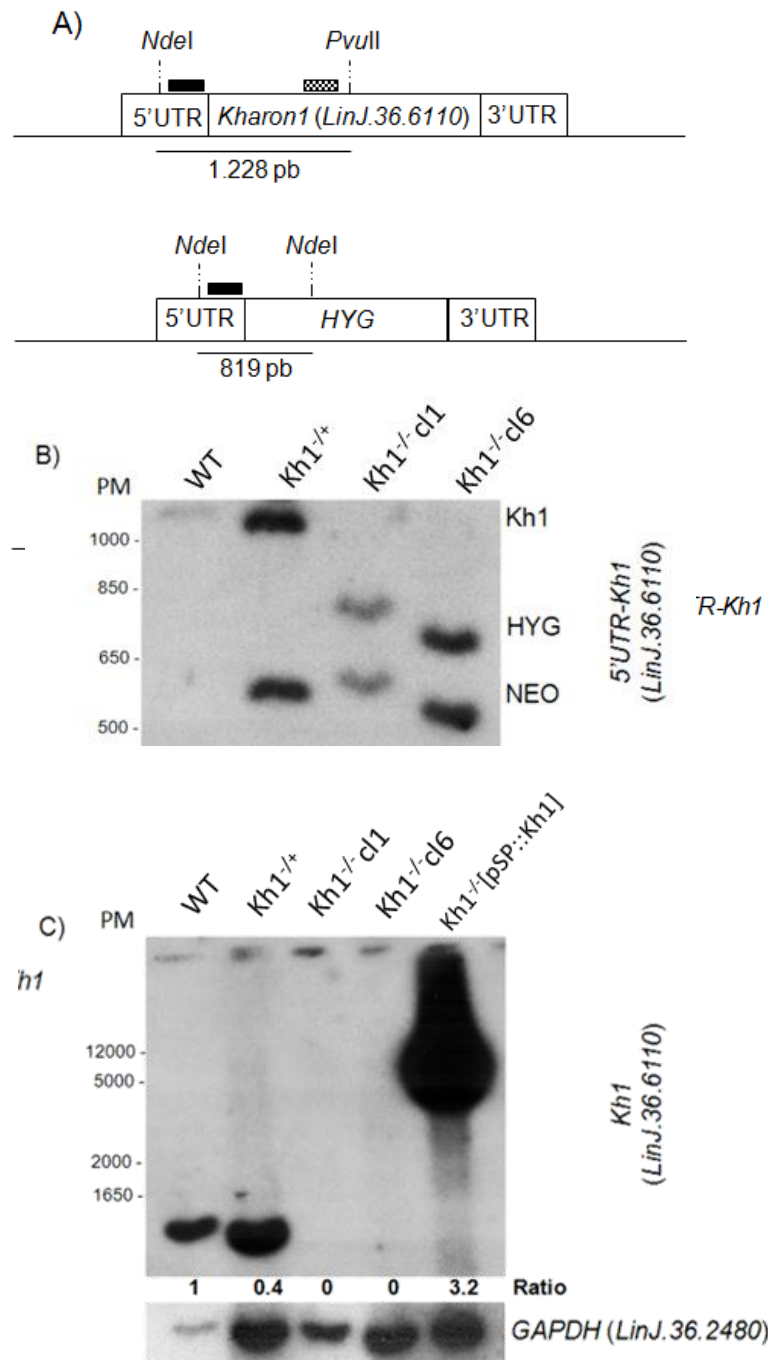


Figura 14. *Southern blot* para confirmar a deleção de *Kh1* em *L. infantum*. A) Representação esquemática da localização gênica de *Kh1* (*LinJ.36.6110*) antes e depois das integrações dos cassetes de NEO e HYG. Estão representados os sítios de clivagem das enzimas de restrição *NdeI* e *PvuII* e o tamanho dos fragmentos gerados. B) e C) Análise de *Southern blot* realizado com 10 µg de DNA genômico de *L. infantum* WT e dos mutantes digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *PvuII*. As membranas foram hibridizadas com sondas marcadas com fósforo radioativo (dCTP32), específicas para região 5'UTR de *Kh1* (B) e para *Kh1* (C). As quantidades de DNA aplicadas foram normalizadas em função do número de cópias de GAPDH. PM: Peso molecular.

5.5 A deleção de *Kh1* não altera o crescimento das formas promastigotas, mas modifica sua morfologia

Após a obtenção dos mutantes *Kh1*^{-/-} foram realizados ensaios para avaliação do *fitness* dos parasitos mediante deleção do gene *Kh1*. Como podemos observar na Figura 15, não houve diferença do crescimento da cepa selvagem quando comparado ao dos mutantes. O mesmo perfil de crescimento foi observado em dois clones diferentes de parasitos *LiKh1*^{-/-} (dados não mostrados). Podemos observar que apenas no quarto dia da curva houve diferença entre o crescimento dos parasitos WT e os *LiKh1*^{-/-} [pSP72αZEOα∅] e *LiKh1*^{-/-} [pSP72αZEOα::Kh1].

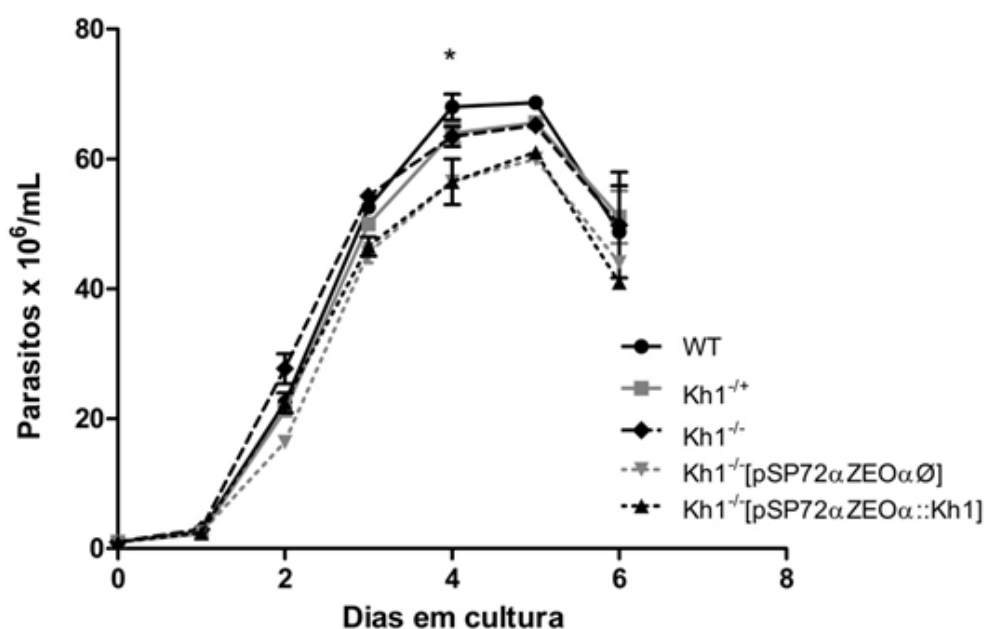


Figura 15. Crescimento das formas promastigotas mediante perda do gene *Kh1*. Foi realizado o cultivo de parasitos WT, *Kh1*^{+/+} e *Kh1*^{-/-} a partir de uma concentração inicial de 1 x 10⁶ parasitos por mL. A concentração de parasitos foi determinada a cada 24 h através da contagem do número dos parasitos. Os dados apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. A análise estatística das curvas foi realizada usando o teste 2way ANOVA, com pós teste de Bonferroni. Foram considerados resultados com diferença estatística aqueles que apresentaram p<0,05. * indica ponto da curva no qual houve diferença entre o crescimento de *L. infantum* WT e as populações *Kh1*^{-/-} [pSP72αZEOα∅] e *Kh1*^{-/-} [pSP72αZEOα::Kh1].

Apesar de não alterar o padrão de crescimento dos parasitos, a deleção do gene *Kh1* parece gerar uma alteração morfológica das formas promastigotas, que na ausência do gene se mostram mais arredondadas. Com a reinserção do gene as promastigotas recuperam sua forma alongada nas fases logarítmica e estacionária de crescimento (Figura 16). Outra característica que podemos observar na morfologia das formas promastigotas selvagens é um possível aumento na quantidade de formas nectomonadas (>12 μm) e uma diminuição de metacíclicas (<11,5 μm) na fase estacionária. Na Figura 16 pode ser observada a morfologia das formas promastigotas selvagens e mutantes ao longo da curva de crescimento.

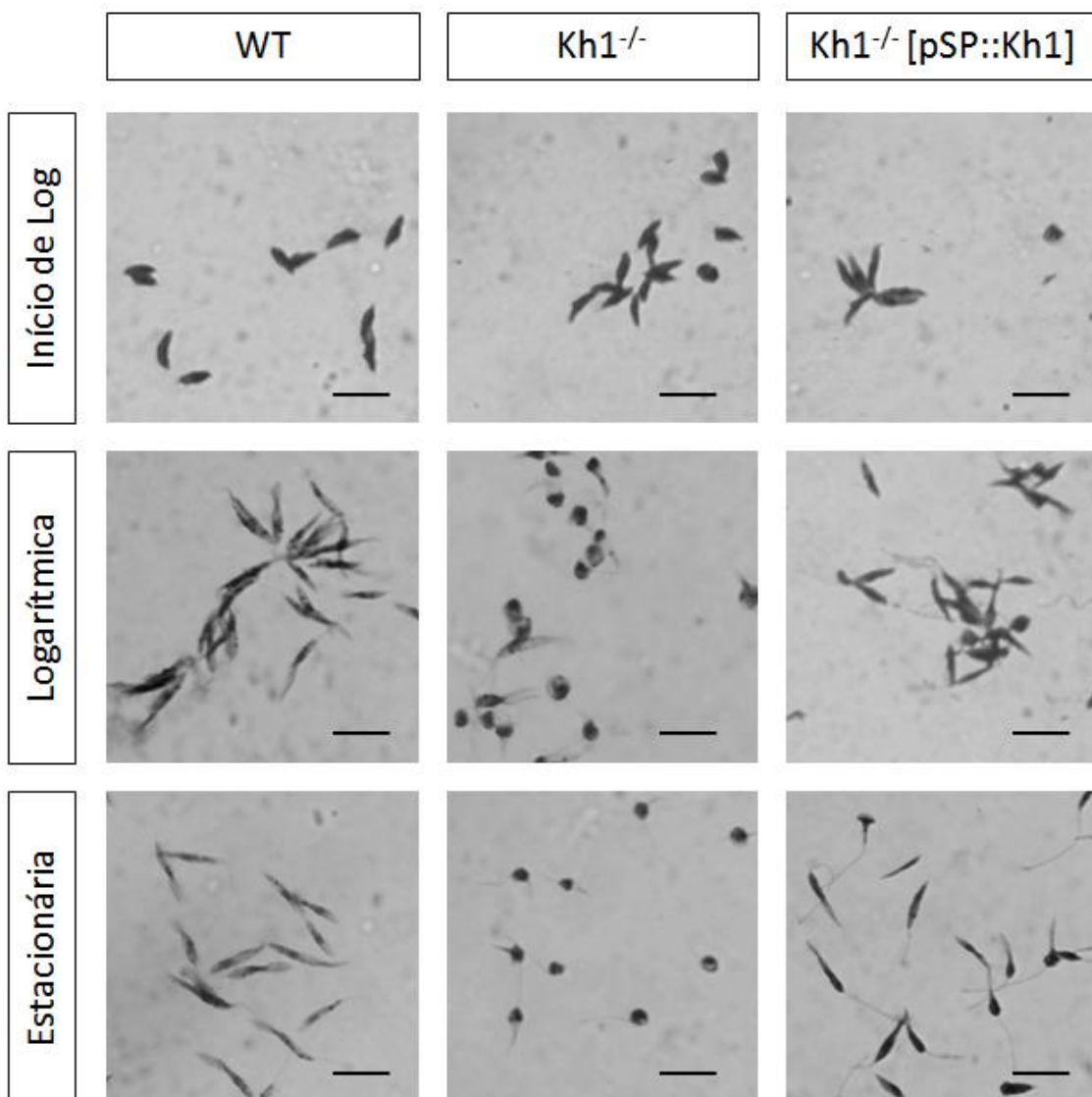


Figura 16. Morfologia das formas promastigotas ao longo da curva de crescimento. Imagens adquiridas com câmera *Nikon*[®] L810 em Microscópio *Olympus BH2 System Microscope*. Barra: 10 μM .

5.6 A deleção de *Kh1* não altera a sensibilidade das formas promastigotas ao antimônio

Dentre os mecanismos de ação do SbIII podemos citar o desbalanço das vias energéticas, como beta-oxidação de ácidos graxos e glicólise. Dessa forma, foi avaliada a sensibilidade dos parasitos mutantes ao tartarato de antimônio. Apesar de o gene *Kh1* estar indiretamente relacionado com o transporte de glicose para o interior dos parasitos, os mutantes *Kh1*^{-/-} foram igualmente sensíveis ao antimônio quando comparados com a WT, resultado que pode ser observado na Figura 17.

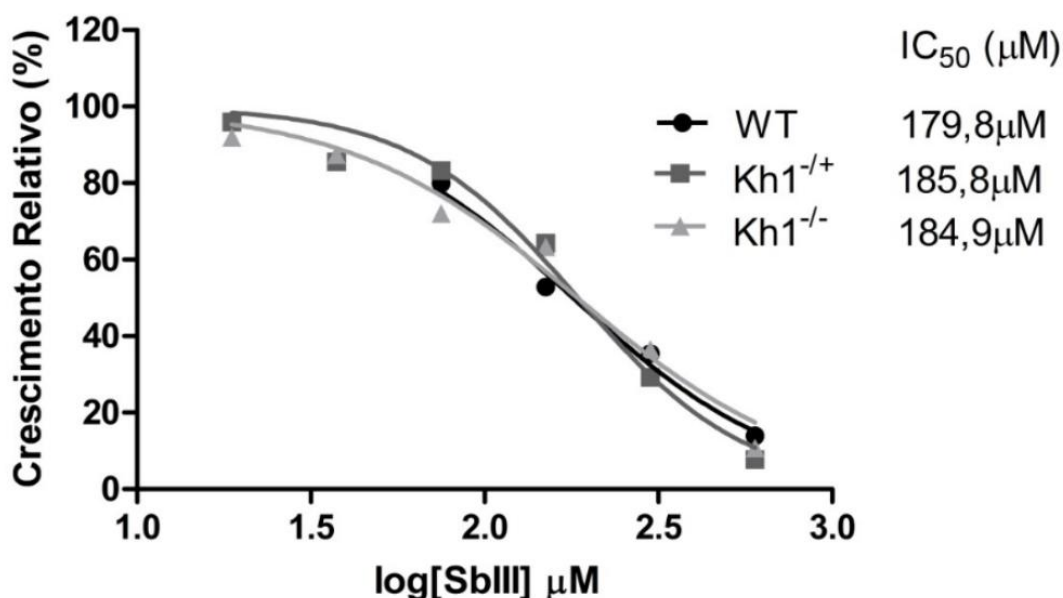


Figura 17. Sensibilidade dos parasitos WT, *Kh1*^{-/+} e *Kh1*^{-/-} ao antimônio. Teste de susceptibilidade *in vitro* de WT e *Kh1*^{-/-}. Parasitos foram cultivados na presença de concentrações crescentes de tartarato de antimônio e potássio (18,75 a 600 μM). Após 72 h de incubação, a concentração dos parasitos foi determinada usando o contador Coulter (Beckman, Life Sciences). Os dados apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. O IC₅₀ foi determinado pelo método de regressão não linear. Valores de IC₅₀ estão apresentados no canto superior direito. Os dados apresentados correspondem à média de três experimentos independentes.

5.7 A deleção de *Kh1* não altera a captação de glicose por formas promastigotas

Como *Kh1* está indiretamente relacionado ao transporte de glicose em *L. mexicana* por ser responsável pelo endereçamento do transportador de glicose (LmxGT), foi realizado um ensaio para medir a capacidade dos parasitos *LiKh1*^{-/-} de captar glicose utilizando um análogo fluorescente da glicose, o 2-NBDG (Invitrogen™). Como podemos observar na Figura 18, que representa a concentração em μM de 2-NBDG captada pelos parasitos, não existe diferença na captação de glicose realizada pelos parasitos *Kh1*^{-/-} quando comparados ao seu par selvagem em nenhum dos intervalos de tempo avaliados (1 h e 3 h). No ensaio de competição, no qual foi adicionada glicose além do 2-NBDG, tanto os parasitos selvagens quanto mutantes incorporam menos 2-NBDG do que na ausência da glicose.

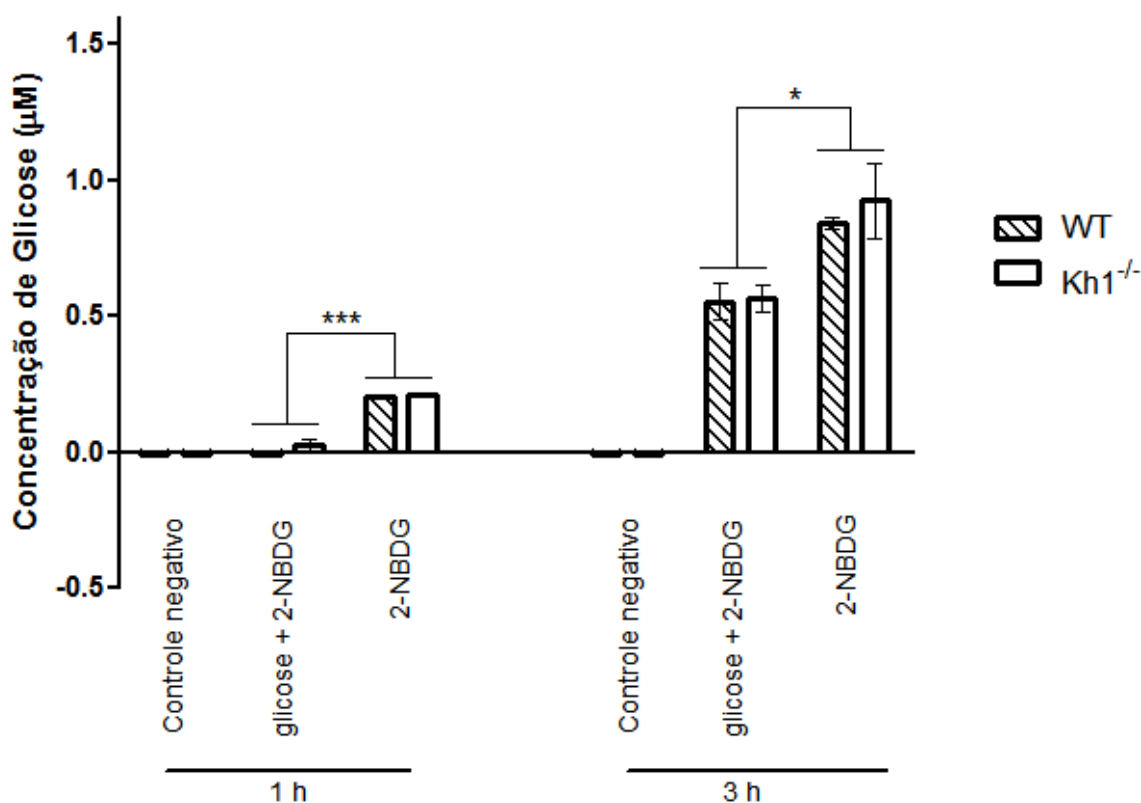


Figura 18. Captação de glicose por formas promastigotas de WT e *Kh1*^{-/-}. O gráfico representa a concentração em μM de 2-NBDG captada pelos parasitos em cada tempo de exposição (1h ou 3h). Os dados apresentados correspondem à média de dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste 1way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Foram considerados resultados com diferença estatística aqueles que apresentaram $p < 0,05$.

5.8 Parasitos *LiKh1*^{-/-} não são capazes de manter a infecção em macrófagos

Para avaliar se a deleção do gene *Kh1*^{-/-} altera o *fitness* das formas amastigotas intracelulares foi realizada infecção experimental de macrófagos humanos THP-1 e macrófagos peritoneais murinos com os parasitos WT, *LiKh1*^{-/+}, *LiKh1*^{-/-}, e *LiKh1*^{-/-}[pSP72αZEOα::Kh1].

Os parasitos *LiKh1*^{-/+} apresentaram a mesma infectividade e a mesma capacidade de multiplicar no interior dos macrófagos quando comparados aos parasitos selvagens (dados não mostrados).

Conforme resultados apresentados nas Figuras 19 a 20, podemos observar que as amastigotas *LiKh1*^{-/-} são capazes de infectar os macrófagos e de diferenciar em amastigotas, não sendo observada diferença com relação aos parasitos selvagens. No entanto, os mutantes *LiKh1*^{-/-} são incapazes de manter a infecção, tanto nos macrófagos THP-1 quanto nos macrófagos peritoneais murinos.

Após oito dias de infecção dos macrófagos THP-1 (Figura 19), observamos uma redução de 96 % no número de macrófagos infectados por *Kh1*^{-/-} quando comparado a WT e uma redução de 94 % na razão amastigotas/100 macrófagos. Os macrófagos THP-1 só foram acompanhados por 10 dias devido à significativa perda de viabilidade das células após esse período. Assim, não foi possível avaliar nesse experimento se ocorre o desaparecimento completo das amastigotas *LiKh1*^{-/-}. Na infecção de macrófagos THP-1 observamos também que os parasitos *add-back* apresentaram uma infecção semelhante aos parasitos selvagens (Figura 19A), entretanto o número de parasitos por macrófago foi menor que o controle, WT (Figura 19B).

Com o objetivo de investigar se existe um momento no qual não são mais encontradas amastigotas *LiKh1*^{-/-} nos macrófagos, foi realizada a infecção dos macrófagos obtidos de lavado peritoneal de camundongos BALB/c, os quais se mantêm viáveis em cultura por mais de 20 dias. Apesar dos parasitos selvagens e nocautes apresentarem a mesma capacidade de infectar os macrófagos (o que foi observado no segundo dia de infecção), os parasitos mutantes apresentam replicação diminuída, não ultrapassando a proporção de 300 parasitos para cada 100 macrófagos (Figura 20). Os

parasitos selvagens infectam todas as células rapidamente e se multiplicam de forma intensa no interior dos macrófagos. Por outro lado, após 16 dias de infecção, nenhuma amastigota *LiKh1*^{-/-} pôde ser observada (Figura 20).

A avaliação quantitativa dos núcleos das amastigotas revelou a presença de células multinucleadas nos parasitos mutantes *LiKh1*^{-/-}, sendo que no 12° dia de infecção, mais de 90 % dos parasitos apresentaram mais de dois núcleos (Figuras 21 e 22).

Podemos observar em ambos os experimentos que os parasitos *Kh1*^{-/-} [pSP72αZEOα::Kh1] recuperaram apenas parcialmente a capacidade de replicar no interior dos macrófagos (Figuras 19B e 20B). Apesar de não ser esperado, os parasitos *Kh1*^{-/-} [pSP72αZEOα::Kh1] apresentaram células multinucleadas (Figura 21C), assim como parasitos *Kh1*^{-/-}, embora em menores proporções. No 12° dia de infecção, enquanto que 25 % dos parasitos WT apresentaram 2 núcleos e 75 % apresentaram 1 núcleo, somente 30 % dos parasitos *add-back* apresentaram 1 núcleo, 30 % 2 núcleos e 40 % mais de dois núcleos.

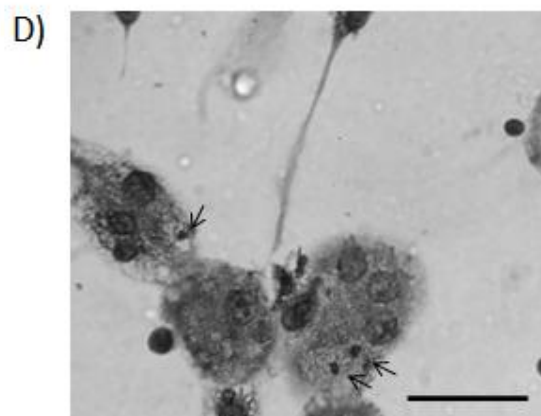
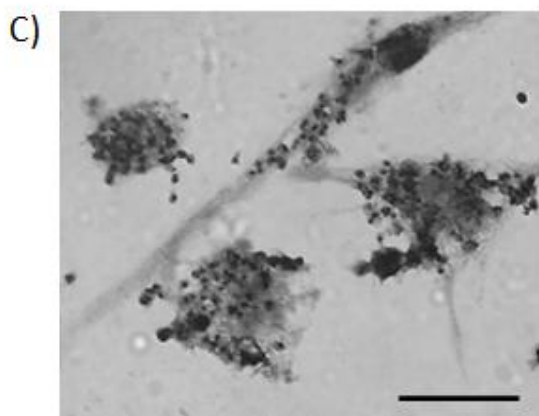
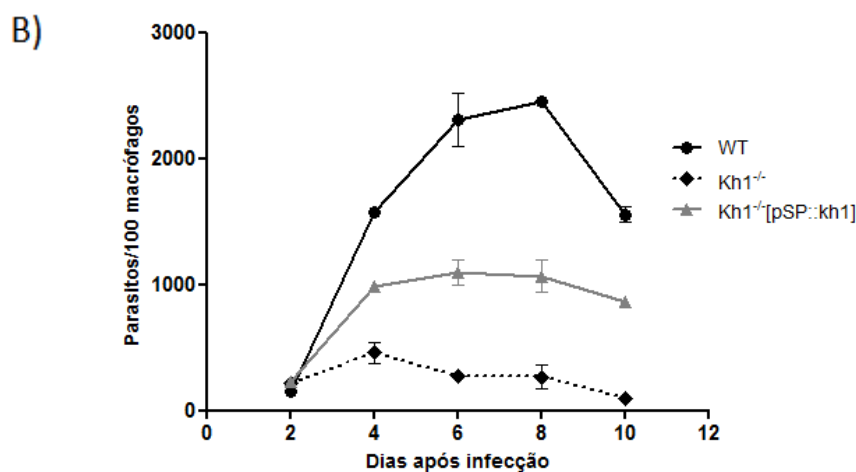
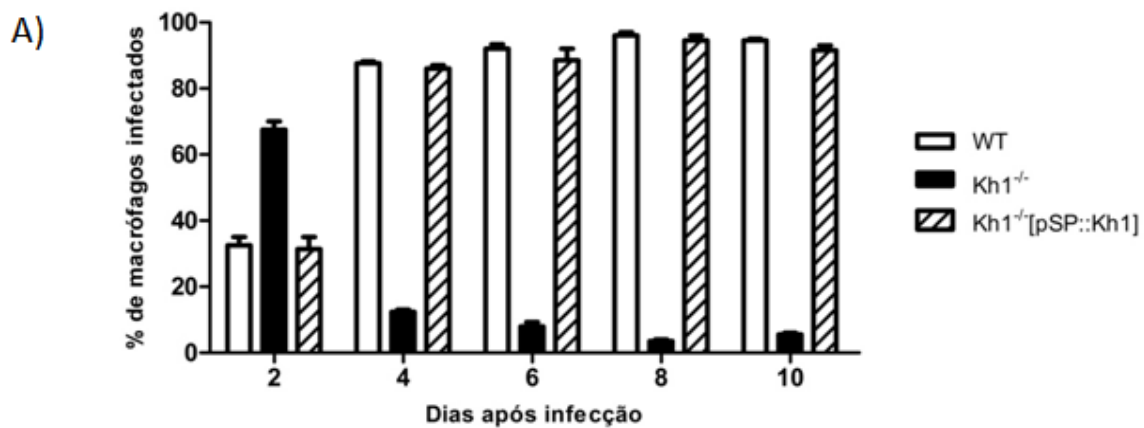


Figura 19. Análise da infectividade dos parasitos $Kh1^{-/-}$ em macrófagos THP-1. Para avaliar o *fitness* dos parasitos mutantes, macrófagos THP-1 foram infectados com *L. infantum* WT, $Kh1^{-/-}$ e $Kh1^{-/-}[pSP7\alpha ZEO\alpha::Kh1]$ em uma proporção de 1:10 (10 leishmanias para cada macrófago). A) Porcentagem de macrófagos infectados em diferentes tempos de incubação. B) Número de amastigotas intracelulares por 100 macrófagos em diferentes tempos após a infecção. Os dados apresentados correspondem à média de dois experimentos independentes. Imagens representativas do 8º dia de infecção de *L. infantum* WT (C) e $Kh1^{-/-}$ (D) demonstrando a diminuição no número de parasitos $Kh1^{-/-}$. As amastigotas mutantes remanescentes estão indicados pelas setas. As barras correspondem a 50 μ m.

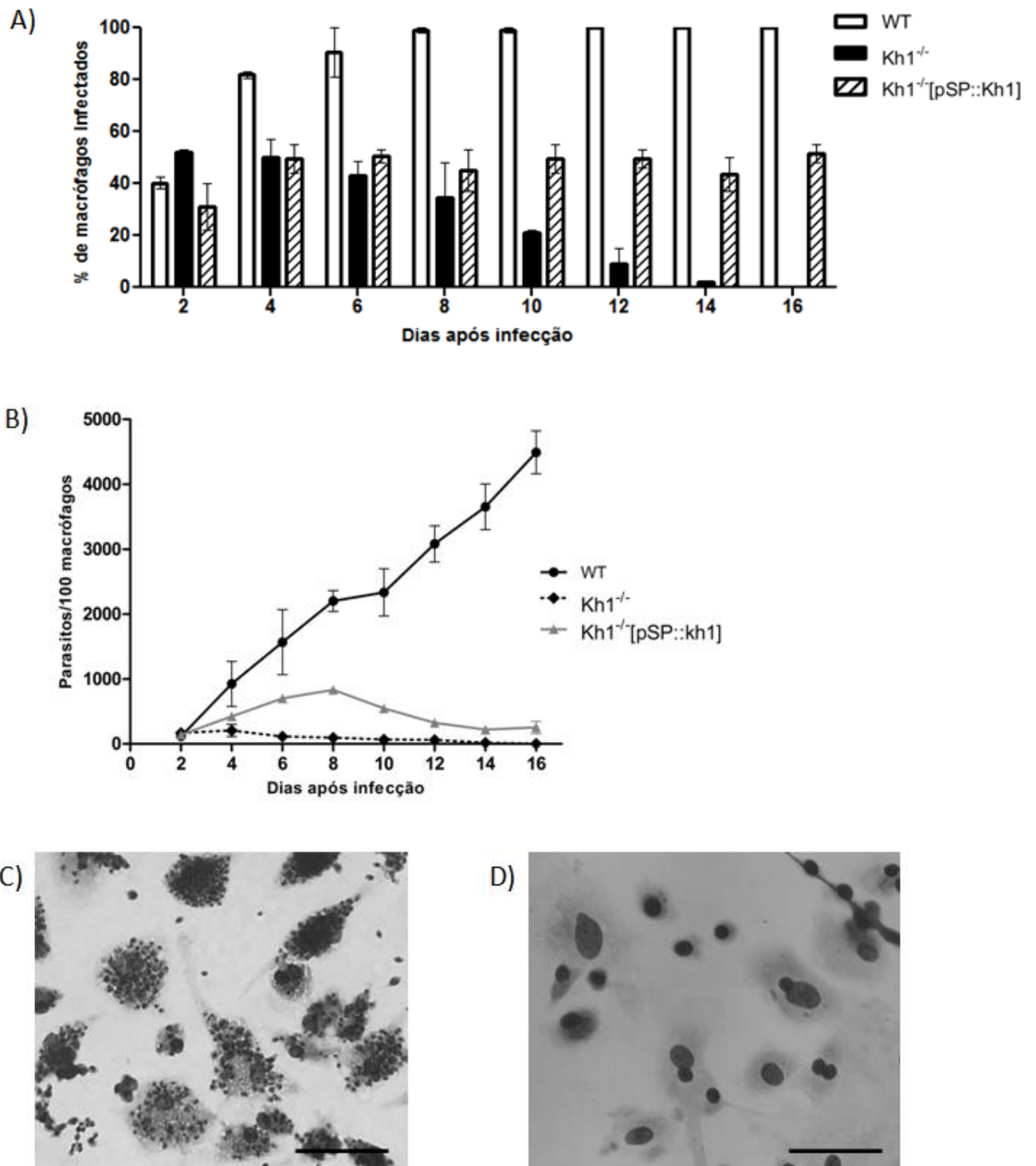
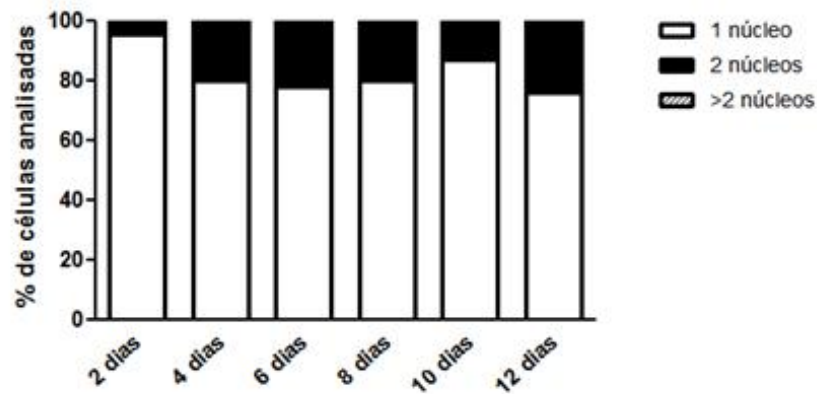
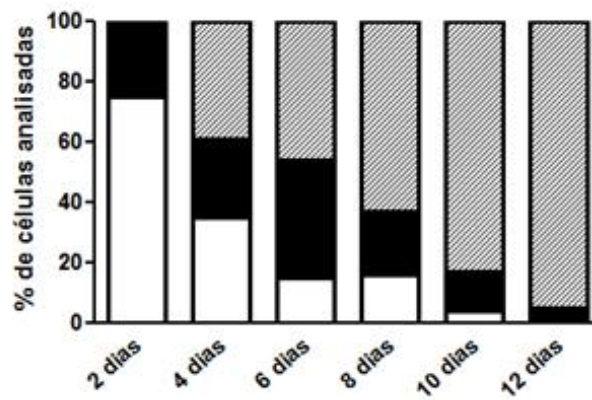


Figura 20. Análise da infectividade dos parasitos *LiKh1^{-/-}* em macrófagos peritoneais murinos. Avaliação do *fitness* dos parasitos *L. infantum* WT, *Kh1^{-/-}* e *Kh1^{-/-}* [pSP72αZEOα::Kh1] em macrófagos peritoneais murinos. A) Porcentagem de macrófagos infectados em diferentes tempos de incubação. B) Número de amastigotas intracelulares por 100 macrófagos em diferentes tempos após a infecção. Os dados apresentados correspondem à média de dois experimentos independentes. Imagens representativas do 16º dia de infecção de *L. infantum* WT (C) e *Kh1^{-/-}* (D) demonstrando a ausência de parasitos *Kh1^{-/-}*. As barras correspondem a 50 µm.

A) *LiWT*



B) *LiKh1^{-/-}*



C) *LiKh1^{-/-}[pSP72αZEOα::Kh1]*

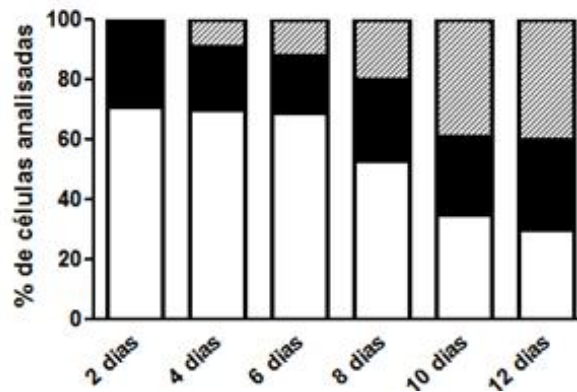


Figura 21. Análise quantitativa do número de núcleos dos parasitos. Parasitos *L. infantum* WT (A), *LiKh1^{-/-}* (B) e *LiKh1^{-/-}[pSP72αZEOα::Kh1]* (C) foram avaliados em relação a presença de um, dois ou mais núcleos. Pelo menos 150 parasitos foram contados e a porcentagem de cada tipo de células foi plotada. O número de núcleos foi determinado a partir do experimento de infecção de macrófagos peritoneais murinos e os resultados apresentados correspondem à média de dois experimentos independentes.

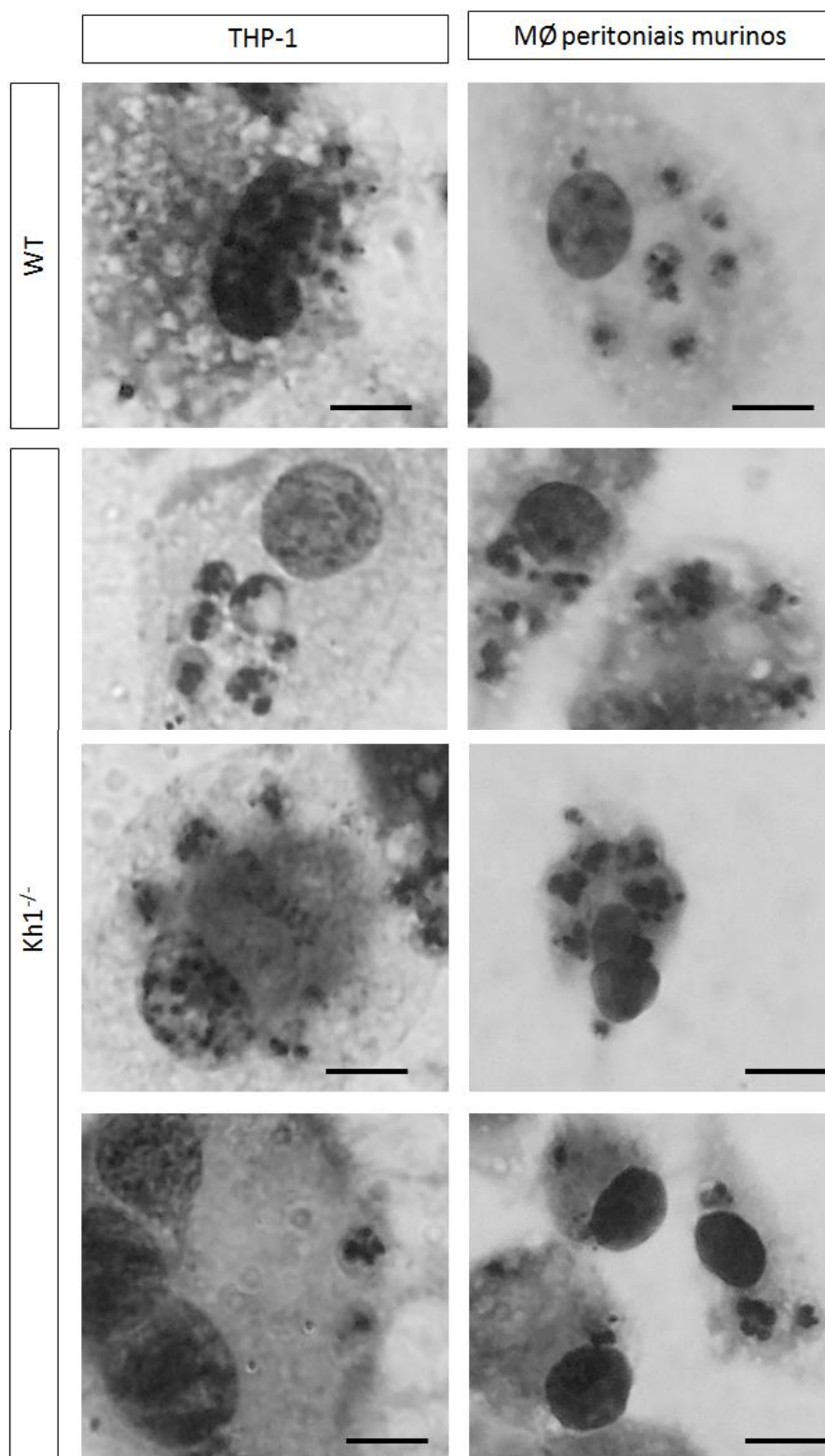


Figura 22. Comparação da morfologia das amastigotas WT e *Kh1^{-/-}* por microscopia ótica. Macrófagos THP-1 e macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. infantum* WT e *Kh1^{-/-}* após 4 dias de infecção, mostrando amastigotas *Kh1^{-/-}* multinucleadas. Todas escalas representam 10 µm. Imagens adquiridas com câmera Nikon® L810 em Microscópio Olympus BH2 System Microscope.

5.9 Mutantes *Kh1*^{-/-} apresentam alteração no ciclo celular

Para melhor analisar a causa do defeito no crescimento das formas amastigotas *Kh1*^{-/-}, foi realizada a análise do ciclo celular desses parasitos por citometria de fluxo. Nesse ensaio foram avaliadas amastigotas purificadas de macrófagos THP-1 após 4 dias de infecção e marcadas com iodeto de propídeo (PI). Como podemos observar na Figura 23, os parasitos *LiKh1*^{-/-} apresentaram diminuição na fase G₀/G₁ e retenção nas fases G₂/M quando comparados aos parasitos selvagens, indicando uma diminuição na ciclagem celular.

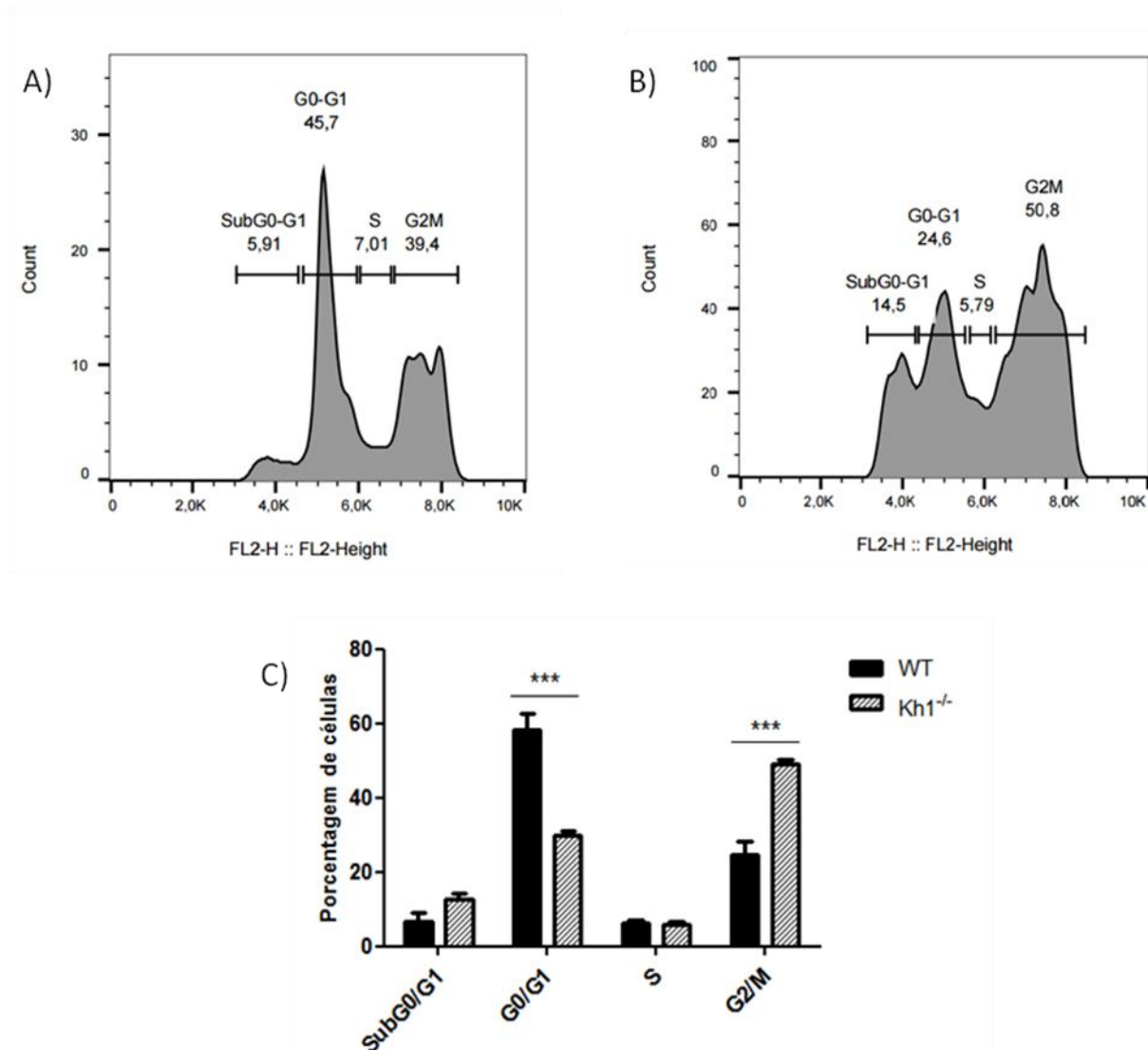


Figura 23. Avaliação do ciclo celular dos mutantes de *L. infantum Kh1*^{-/-}. Histogramas representativos do ciclo celular mostram o conteúdo de DNA por amastigotas *LiWT* (A) e *LiKh1*^{-/-} (B) após marcação com PI e leitura em FACS Calibur. C) Porcentagem de amastigotas *LiWT* e *LiKh1*^{-/-} em diferentes fases do ciclo celular. Os dados apresentados correspondem à média de dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o teste 1way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Foram considerados resultados com diferença estatística aqueles que apresentaram $p < 0,05$.

5.10 Infecção por parasitos *LiKh1*^{-/-} não interfere na produção de óxido nítrico

Para investigar se os parasitos *LiKh1*^{-/-} podem induzir uma resposta diferente dos parasitos WT durante a infecção, foi realizado o estímulo de macrófagos peritoneais murinos com IFN- γ , a infecção com os parasitos e em seguida a determinação de nitrito presente no sobrenadante das culturas pelo método de Griess. Os resultados obtidos, representados na Figura 24, demonstram que os parasitos WT, *LiKh1*^{-/-}, *LiKh1*^{-/-}[pSP72 α ZEO α Ø] e *LiKh1*^{-/-}[pSP72 α ZEO α ::Kh1] não estimularam a produção de NO, nem em macrófagos de camundongos BALB/c e nem em macrófagos de C57BL/6. Como controle positivo do ensaio foi usado o lipopolissacarídeo (LPS), que é muito eficiente para induzir a produção de óxido nítrico sintase pelos macrófagos em poucas horas. Como podemos observar, o LPS foi capaz de induzir a produção de NO pelos macrófagos em quantidade satisfatória, validando o experimento. Podemos perceber que mesmo para o LPS, os macrófagos só são capazes de produzir elevadas quantidades de NO se previamente estimulados com IFN- γ .

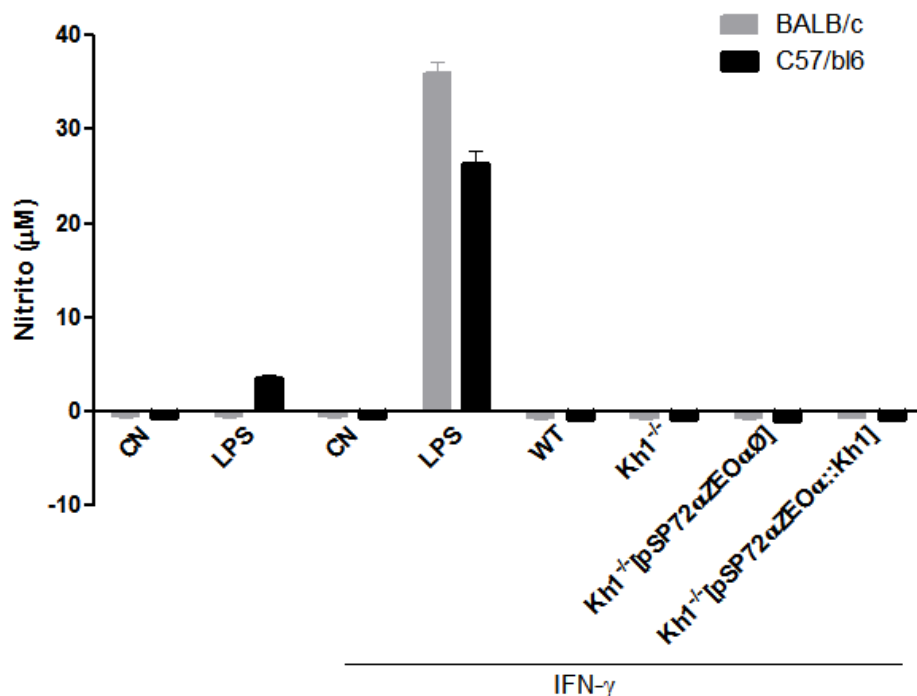


Figura 24. Infecção por parasitos *Kh1*^{-/-} não interfere na produção de óxido nítrico. Produção de NO por macrófagos peritoneais murinos de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com parasitos WT, *Kh1*^{-/-}, *Kh1*^{-/-}[pSP72 α ZEO α Ø] e *Kh1*^{-/-}[pSP72 α ZEO α ::Kh1]. Os resultados apresentados correspondem à média de dois experimentos independentes, realizados cada um com três camundongos. CN: controle negativo; LPS: lipopolissacarídeo.

5.11 Infecção de camundongos e recuperação dos parasitos

Foi avaliada a capacidade dos parasitos WT e *LiKh1*^{-/-} de infectarem camundongos BALB/c e camundongos C57BL/6 nocautes para IFN- γ ^{-/-}. Foram realizados diferentes esquemas de infecção a fim de se avaliar qual seria a melhor estratégia para recuperação dos parasitos. Na Tabela 6 podemos observar os resultados obtidos em cada esquema de infecção.

Foram obtidas baixas taxas de infecção quando realizado inóculo de formas promastigotas de *L. infantum* em camundongos BALB/c, seja por via intraperitoneal ou na veia da cauda. Nesses esquemas, nem mesmo os parasitos selvagens foram capazes de infectar os camundongos de forma satisfatória (Tabela 6).

A infecção dos camundongos BALB/c realizada com formas amastigotas resultou num maior sucesso quando comparada com a infecção realizada com formas promastigotas, sendo recuperados parasitos WT tanto no baço quanto no fígado de todos os camundongos. Por outro lado, as formas amastigotas dos parasitos *LiKh1*^{-/-} não foram capazes de infectar os camundongos BALB/c (Tabela 6 e Figura 25).

Sendo assim, também foi avaliada a infectividade das formas promastigotas dos parasitos WT e *LiKh1*^{-/-} em camundongos imunossuprimidos deficientes em IFN- γ . As formas promastigotas, inclusive dos parasitos *LiKh1*^{-/-} foram capazes de infectar todos os camundongos. No entanto, de acordo com resultado da diluição limitante (Figura 25), podemos observar que os parasitos *LiKh1*^{-/-} tiveram menor capacidade de infectar ou de manter a infecção mesmo nos camundongos nocaute para IFN- γ , sendo obtido um número bem menor de parasitos quando comparados aos parasitos WT. Não foi observada diferença estatística entre o número de parasitos recuperados do baço e do fígado dos animais (Figura 25).

Tabela 6. Infecção de camundongos e recuperação dos parasitos

Camundongos	Camundongos por grupo	Parasitos	Inóculo (parasitos)	Via de infecção	Eutanásia (semanas)	Porcentagem de infecção	Órgãos dos quais foram recuperados	Tempo para crescimento em cultura axênica (dias)
Balb/c	4	Promastigotas	WT	1×10^6	veia da cauda	25	Fígado	15
			<i>Kh1^{-/-}</i>			0	-	-
	3	Amastigotas	WT	1×10^6	intraperitoneal	100	Baço e fígado	8
			<i>Kh1^{-/-}</i>			0	-	-
	3	Promastigotas	WT	1×10^7	intraperitoneal	100	Baço e fígado	4
			<i>Kh1^{-/-}</i>			100	Baço e fígado	8

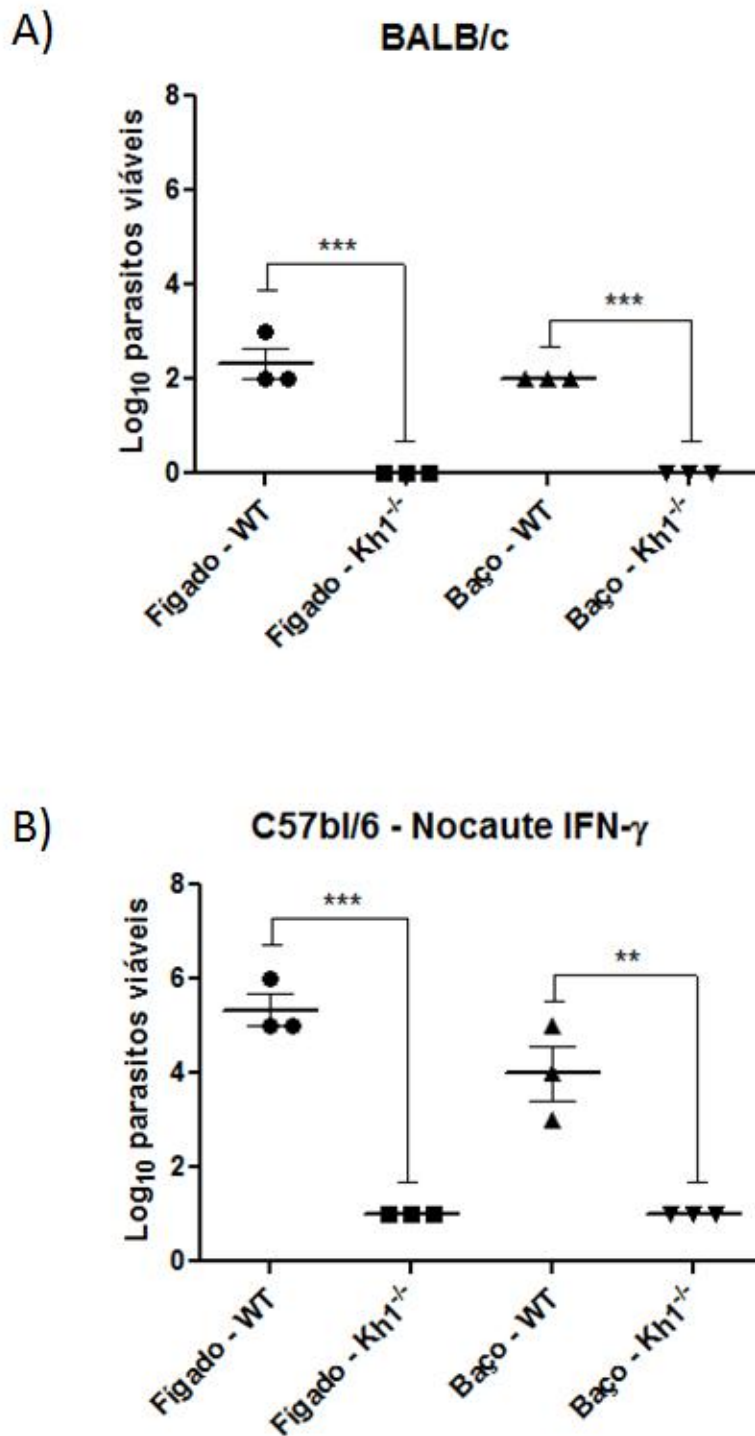


Figura 25 - Carga parasitária de camundongos infectados com *L. infantum* WT e *Kh1*^{-/-}. Carga parasitária de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 nocaute para IFN- γ (B), infectados com formas amastigotas e formas promastigotas, respectivamente. A carga foi avaliada por diluição limitante de macerados de fígado e baço, obtidos após 15 dias de infecção. A leitura foi realizada 15 dias após a eutanásia dos animais. A análise estatística foi realizada usando o teste 1way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. Foram considerados resultados com diferença estatística aqueles que apresentaram $p < 0,05$.

5.12 Resumo dos resultados

Os dados obtidos nesse trabalho demonstram que o gene *Kh1* não é um gene essencial em *L. infantum*, e que sua deleção não altera o perfil de crescimento das formas promastigotas, e nem a capacidade dos parasitos de captar glicose. Por outro lado, nossos resultados sugerem que a deleção do gene *Kh1* gera uma alteração morfológica das promastigotas de *L. infantum*. Diferente das formas promastigotas, as formas amastigotas mutantes apresentam defeito no ciclo celular, apresentando retenção em G₂/M. Esse defeito culminou com a formação de amastigotas multinucleadas que não são capazes de manter a infecção em macrófagos *in vitro* e que apresentam menor capacidade de manter a infecção *in vivo* quando comparada aos parasitos selvagens. Em conjunto, os resultados do trabalho indicam que os parasitos mutantes *Likh1*^{-/-} são potenciais candidatos vacinais contra as leishmanioses.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo realizamos com sucesso a deleção do gene *Kharon1* (*Kh1*) em *L. infantum* utilizando a metodologia de recombinação homóloga descrita por Cruz *et. al* em 1991. A deleção foi confirmada por PCR, qPCR e *Southern blot*. Os parasitos mutantes obtidos foram caracterizados em relação a vários parâmetros: crescimento em cultura, morfologia, infectividade *in vitro* e *in vivo*, proliferação intracelular, ciclo celular, transporte de glicose, susceptibilidade ao antimônio e produção de óxido nítrico.

A construção dos cassetes para deleção, feita por meio da PCR de fusão, se mostrou uma metodologia altamente eficiente e rápida. Há alguns anos atrás, a obtenção de construções para manipulação genética era realizada por meio de sucessivas clonagens em bactérias, com a necessidade de se realizar várias transformações, várias digestões com enzimas de restrição e várias eletroforeses, de forma que muito tempo era gasto nesse processo (Roberts 2011). Com o tempo foram desenvolvidas metodologias para simplificar e otimizar esse processo, como por exemplo o Sistema Gateway baseado na recombinação do fago λ (Batista *et al.* 2010; Alonso *et al.* 2014; Esposito *et al.* 2009), a clonagem independente de ligação (LIC) (Aslanidis and Jong 1990; Dortay *et al.* 2011) e a PCR de fusão (Berrow, Alderton, and Owens 2009; A. Mukherjee *et al.* 2009). Embora o Sistema Gateway e a LIC sejam eficientes, a fusão não é muito precisa, sendo adicionados alguns pares de bases nas extremidades 5' e 3' do fragmento. A PCR de fusão, por outro lado, se baseia na utilização de uma DNA polimerase com atividade de exonuclease para correção, capaz de unir fragmentos de DNA que possuam sequências complementares. As construções podem então ser obtidas de forma eficiente sem a adição de pares de base extras (Roberts 2011).

Como o cromossomo 36, onde se encontra o gene *Kh1*, é diplóide em *L. infantum* (Rogers *et al.* 2011), foram realizadas duas transfecções sequenciais, de modo a obter inicialmente parasitos nocautes em uma das cópias do gene (*LiKh1^{-/+}*) e em seguida parasitos duplo nocaute (*LiKh1^{-/-}*). Para confirmar as deleções foram realizadas PCRs convencionais, qPCRs e o *Southern blot*.

A caracterização das formas promastigotas de *L. infantum* demonstrou que os parasitos mutantes apresentam o mesmo padrão crescimento que os parasitos selvagens, o que era esperado, tendo em vista que, em *L. mexicana*, a deleção do gene *Kh1* também não resultou em alteração no crescimento das formas promastigotas (Tran *et al.* 2015). A diferença observada no quarto dia da curva entre o crescimento dos parasitos WT e os *Kh1*⁻[pSP72αZEOαØ] e *Kh1*⁻[pSP72αZEOα::Kh1] pode ser devido a presença da droga Zeocina, usada para selecionar os parasitos transfectados com o plasmídeo pSP72αZEOα, ou devido ao fato de não ter sido realizada seleção clonal desses parasitos. No entanto, essa diferença no crescimento provavelmente não tem um impacto biológico significativo para os parasitos.

Apesar da deleção não alterar o crescimento dos parasitos, as formas promastigotas de *L. infantum* se apresentam menos alongadas na ausência do gene *Kh1*, mas recuperam o formato alongado quando o gene é reinserido nos parasitos nocautes. Essa alteração morfológica não foi observada em *L. mexicana* (Tran *et al.* 2013; Tran *et al.* 2015) e pode ser um indício de uma nova função do gene *Kh1* em *L. infantum*. A morfologia dos mutantes deve ser melhor investigada com outras técnicas, como microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão, para que se possa inferir sobre as variáveis que levaram a tal alteração.

Como a proteína Kh1 está indiretamente relacionada com o transporte de glicose em *L. mexicana*, por ser responsável pelo endereçamento do transportador de glicose LmxGT1 (Tran *et al.* 2013), foi investigado o impacto da deleção de *LiKH1* na incorporação de glicose. Foi verificado que a deleção de *Kh1* em *L. infantum* não interferiu no transporte de glicose e essa ausência de fenótipo parece se dever ao fato de existir mais do que um transportador em *Leishmania* capaz de importar as hexoses glicose, manose, frutose e galactose (Cazzulo 1992; Langford *et al.* 1994; Burchmore and Landfear 1998; Burchmore *et al.* 2003). Em *L. mexicana*, por exemplo, ao ser realizado o nocaute do *locus* onde estão presentes os genes que codificam as três isoformas de transportadores de glicose (LmxGT1, LmxGT2 e LmxGT3) os parasitos mutantes apresentaram alterações metabólicas, como por exemplo, a alteração da produção de glicoconjugados (Contrera-Rodriguez and Landfear 2006). A fim de recuperar o fenótipo dos parasitos, foi realizada a transfecção de cada uma das três isoformas de LmxGT e cada uma das

isoformas sozinha foi capaz de restaurar o transporte das quatro hexoses nos parasitos (Rodriguez-Contreras *et al.* 2007). Dessa forma, em nosso trabalho, provavelmente outros transportadores, não endereçados por Kh1, foram capazes de manter a captação normal de glicose nos parasitos *Kh1^{-/-}* via *bypass*. Apesar desse perfil ter sido observado somente nas formas promastigotas, não é esperado que exista diferença na captação de glicose pelas amastigotas *LiKh1^{-/-}*: as amastigotas transportam menos glicose do que as promastigotas, pois utilizam ácidos graxos como fonte primária de energia (Hart and Coombs 1982; Burchmore and Hart 1995).

Considerando ainda o metabolismo de glicose, sabe-se que um dos mecanismos de ação do antimônio consiste em perturbar o metabolismo energético por meio da inibição da glicólise (Berman, Gallalee, and Best 1987; Sundar and Goyal 2007). Outros trabalhos mostraram ainda que parasitos resistentes a drogas apresentam alterações no *fitness* que resultam em uma menor captação e em um menor metabolismo de glicose (Uzcategui *et al.* 2005; Machuca *et al.* 2006; do Monte-Neto *et al.* 2011). Dessa forma, foi investigado se os parasitos *LiKh1^{-/-}* apresentam alteração na sensibilidade ao antimonial. No entanto, como *L. infantum Kh1^{-/-}* não apresentou alteração na captação de glicose do meio, também não foi observada alteração na sensibilidade aos antimoniais.

Para avaliar o *fitness* das formas amastigotas foram realizados experimentos de infecção *in vitro* de macrófagos THP-1 e de macrófagos peritoneais murinos. Semelhante ao que foi observado em *L. mexicana*, as amastigotas mutantes de *L. infantum* apresentaram um defeito na citocinese, o que gerou formas multinucleadas que morreram com o tempo, sendo incapazes de manter a infecção nos macrófagos (Figura 20).

Durante a infecção dos macrófagos THP-1, enquanto os parasitos WT se multiplicam com sucesso, a taxa de infecção por parasitos *LiKh1^{-/-}* cai ao longo dos dias. No entanto, após 9 a 10 dias de infecção os macrófagos THP-1 começam a morrer e perdem a aderência às lâminas, impossibilitando a continuidade dos experimentos e a investigação do tempo de duração das amastigotas nocaute nessas células. Além disso, devido à intensa multiplicação da *L. infantum* WT, os macrófagos são destruídos com o passar do tempo, impossibilitando a continuidade da análise devido à falta de um controle positivo. Em contrapartida, os experimentos realizados com

macrófagos peritoneais murinos permitiram analisar a infecção por mais de 20 dias. Esses experimentos demonstraram que *in vitro* a infecção por *L. infantum* *Kh1*^{-/-} não persiste por mais de 16 dias. Nos últimos dias da infecção praticamente todos parasitos se apresentam multinucleados, fenótipo que culmina com a morte das células.

Em todos os experimentos de infecção *in vitro* observamos que os parasitos complementados *LiKh1*^{-/-}[pSP72αZEOα::Kh1] (*add-back*) não recuperam completamente o fenótipo quando comparado aos parasitos selvagens (Figuras 19 e 20), mesmo tendo apresentado um maior número de cópias de *Kh1* no qPCR e no *Southern blot* (Figuras 11 a 14). Além disso, os parasitos *add-back* apresentaram células multinucleadas ao longo da infecção dos macrófagos (Figura 21), indicando a persistência de células com o mesmo fenótipo de *LiKh1*^{-/-}. Esses resultados provavelmente se devem ou a seleção dos parasitos *add-back*, que não foi clonal, ou ao uso um vetor na forma episomal para realizar a reintrodução do gene. Primeiro, os vetores, quando não integrados, não estão sujeitos aos mecanismos de segregação de DNA de forma que as células filhas não recebem quantidades iguais do vetor, podendo confundir as análises fenotípicas. Em segundo lugar, os níveis de expressão dos genes presentes em vetores podem variar de célula para célula. Uma terceira possível causa é o fato dos vetores episomais não se manterem nos parasitos na ausência da pressão seletiva da droga (Roberts 2011). Apesar dos experimentos de infecção *in vitro* serem relativamente curtos, a falta da adição da Zeocina pode ter sido um fator que contribuiu para os resultados observados. Dessa forma, futuramente, ao planejar experimentos *in vivo*, que duram vários meses, esse fator deverá ser levado em consideração, podendo-se optar, por exemplo, por usar um vetor que permita a integração do gene no genoma do parasito.

Com os ensaios de infecção e com as imagens de microscopia óptica, demonstramos que, assim como em *L. mexicana* (Tran *et al.* 2015), a deleção do gene *Kh1* em *L. infantum*, apesar de não alterar o padrão de crescimento das formas promastigotas, inviabiliza a divisão celular das formas amastigotas. A presença de amastigotas multinucleadas entre os parasitos mutantes sugere que os parasitos são capazes de realizar a divisão nuclear, mas que não finalizam a citocinese. A geração de parasitos com alteração no crescimento mediante a deleção do gene *Kh1* parece estar relacionada com a

presença da proteína Kh1 na base do flagelo, nos microtúbulos subpeliculares (microtúbulos que formam um arcabouço fortemente associado à membrana plasmática dos parasitos) e no fuso mitótico. Apesar da associação com o fuso mitótico ainda não ter sido comprovada em *Leishmania*, o silenciamento do gene *Kh* em *T. brucei* fez com que o fuso mitótico não se formasse nesses parasitos, o que se mostrou letal para todas as formas presentes no seu ciclo de vida (Sanchez *et al.* 2016).

O fenótipo apresentado pelos parasitos *Kh1^{-/-}* se assemelha aos apresentados por *L. donovani* nocaute para centrina1 (*LdCEN^{-/-}*), nos quais também ocorre formação de amastigotas multinucleadas com defeito no crescimento que culmina com a morte dos parasitos, sem no entanto apresentar nenhuma alteração nas formas promastigotas (Selvapandiyan *et al.* 2004). Mais tarde foi demonstrado que centrina1 também é essencial para duplicação celular de *T. brucei* (Selvapandiyan *et al.* 2007) e de *Plasmodium faciparum* (Mahajan *et al.* 2008).

O trabalho de Selvapandiyan *et al.* 2004 demonstrou que centrina1 é essencial para duplicação do corpo basal, para formação do fuso mitótico e para citocinese; e que a cariocinese com ausência de citocinese leva à morte celular programada dos parasitos devido à uma perda do controle do ciclo celular. De forma similar ao que foi observado no ciclo celular dos mutantes *LdCEN1^{-/-}*, *L. infantum Kh1^{-/-}* também apresentou uma diminuição da ciclagem das células, com retenção do ciclo nas fases G₂/M. Esse resultado corrobora o caráter essencial da proteína Kh1 para que ocorra divisão celular nas formas amastigotas de *L. infantum* e constitui um forte indício da presença dessa proteína no fuso mitótico dos parasitos, assim como a centrina.

A proteína Kh1, presente apenas em Kinetoplastídeos, não possui nenhum motivo conservado conhecido (Sanchez *et al.* 2016). Com o objetivo de melhor compreender as funções da proteína Kh1, foram realizadas buscas preliminares em bancos de dados por possíveis domínios proteicos presentes em Kh1. De acordo com modelagem obtida por meio do SWISS-MODEL, a sequência proteica de Kh1 apresenta uma região de homologia com Villin-1 (ANEXO V). Villin-1 é uma proteína sensível ao cálcio responsável por reorganizar os filamentos de actina (Northrops *et al.* 1986; Zhai *et al.* 2001; N. Kumar *et al.* 2004). Sabe-se que essa proteína é inibida por Latrunculin A, uma toxina produzida por esponjas do mar *Latrunculia magnifica* que impede

a polimerização dos filamentos de actina (Spector et al. 1983; Yarmola, Somasundaram, and Boring 2000), e inibe a formação do fuso mitótico, impedindo a divisão celular (Forer and Pickett-Heaps 1998; Gachet et al. 2004; Tournier et al. 2004; Meadows and Millar 2008). Embora preliminar, esse achado constitui mais um indício da atuação de Kh1 nos filamentos de actina e de sua presença no fuso mitótico de *Leishmania*.

Além disso, por estar presente apenas em Kinetoplastídeos (Sanchez et al. 2016), e por ser essencial para divisão celular desses parasitos (Tran et al. 2015; Sanchez et al. 2016) Kh1 se mostra também como um alvo interessante para quimioterapia das leishmanioses, da doença do sono e provavelmente da doença de Chagas.

Para avaliar se o fenótipo de atenuação dos mutantes *Likh1^{-/-}* observado *in vitro* seria também observado *in vivo*, foram realizadas infecções de camundongos BALB/c e C57BL/6 nocautes para IFN- γ . Dados da literatura demonstram que em camundongos BALB/c, a espécie *L. infantum* é capaz de se multiplicar rapidamente no fígado nas primeiras semanas, mas após um mês a infecção é controlada nesse órgão por meio da formação de granulomas, pois o órgão apresenta uma resposta inflamatória, do tipo T_H1 (Murray et al. 1987; Goto and Lindoso 2004; Hoffmann 2009; R. Kumar and Nylén 2012). No baço os parasitos também são controlados, apesar de não serem completamente eliminados, pois esse órgão apresenta uma resposta de caráter anti-inflamatório, que permite a sobrevivência dos parasitos (Melby et al. 2001; Mukherjee et al. 2003; Stanley & Engwerda 2007; Kumar & Nylén 2012).

Apesar de vários trabalhos demonstrarem que a cepa ITMAP-263 de *L. infantum* é capaz de infectar camundongos (Mullen and Baillie 1998; Silvestre et al. 2007; Moreira et al. 2012; Cunha et al. 2013; Marques et al. 2015; Faria et al. 2016; Cunha-ju et al. 2017), no presente estudo as formas promastigotas dessa cepa de *L. infantum* não foram capazes de infectar camundongos BALB/c de forma satisfatória. A dificuldade de infecção provavelmente é devido ao tempo que a cepa permaneceu sob condições de cultivo axênico sem ser realizada nenhuma passagem *in vivo*. Moreira et al. 2012 demonstraram que a manutenção da cepa ITMAP-263 de *L. infantum* por longos períodos em cultura resulta em uma perda de virulência tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sabe-se que passagens seriais *in vitro*, levam ao

desenvolvimento de perturbações no desenvolvimento, alterações nos níveis de expressão de macromoléculas de superfície e perda de fatores de virulência (Brittingham et al. 2001; Beetham, Donelson, and Dahlin 2003). Além disso, após passagens sucessivas, uma cultura estacionária de *L. infantum* apresenta uma diminuição da proporção de formas metacíclicas e um aumento da proporção de nectomonadas (Lei, Romine, and Beetham 2010). De fato, imagens das culturas em fase estacionária adquiridas nesse estudo parecem indicar uma quantidade maior de nectomonadas do que de metacíclicas (Figura 16), sendo essa uma possível explicação para os resultados obtidos *in vivo*. Uma opção para solucionar a questão da dificuldade de infecção poderia ser então a separação das formas metacíclicas por gradiente de centrifugação conforme descrito por Späth & Beverley em 2001; ou com base na aglutinação induzida por lectinas conforme descrito por Pinto-da-Silva *et al.* em 2002; ou ainda por meio do tratamento prévio das promastigotas com sangue fresco, o qual apresenta proteínas da cascata do complemento funcionais, de forma que promastigotas não metacíclicas sejam eliminadas por lise (Franke *et al.* 1985).

Outra explicação para a menor virulência dos parasitos é uma possível diminuição da capacidade dos parasitos de se diferenciarem em amastigotas. Foi demonstrado que após passagens sucessivas em cultura, a perda de virulência de *L. infantum* ITMAP-263 ocorre não devido a uma diminuição no número de promastigotas metacíclicas, mas devido uma diferenciação inadequada das formas promastigotas para amastigotas, provavelmente devido à ausência do ciclo de vida completo durante longos períodos (Moreira *et al.* 2012). Foi constatado ainda que as cepas atenuadas de *L. infantum* recuperam completamente a virulência após diferenciação em formas amastigotas. Os autores consideram que a diferenciação em amastigotas seleciona os parasitos mais virulentos em uma cultura e que essa diferenciação teria um efeito similar ao da passagem dos parasitos em camundongos. Outros estudos ainda, apontam para a necessidade de se realizar inóculos com formas amastigotas de *L. donovani* para se obter um padrão reprodutível de infecção no baço e no fígado de camundongos (Garg and Dube 2006; Prianti et al. 2007). De forma semelhante, em nosso trabalho a infecção dos camundongos BALB/c com formas amastigotas de *L. infantum* resultou em sucesso na recuperação dos parasitos selvagens. Por outro lado,

é importante ressaltar que formas amastigotas dos parasitos mutantes *Kh1^{-/-}* não foram capazes de infectar os camundongos BALB/c, evidenciando que esses parasitos nocautes não apresentam boa manutenção da infecção *in vivo*, devido ao defeito na citocinese das amastigotas.

A fim de solucionar a dificuldade na infecção *in vivo* e para garantir a recuperação dos parasitos *LiKh1^{-/-}*, também foi realizada a infecção de camundongos nocaute para IFN- γ (imunossuprimidos e extremamente susceptíveis à infecção), com *L. infantum* WT e *Kh1^{-/-}*, e ambos foram recuperados com sucesso nesse modelo. No entanto, os parasitos nocautes apresentaram maior dificuldade em manter a infecção mesmo em camundongos nocaute para IFN- γ , o que pode ser observado nos resultados da diluição limitante, na qual foi obtido menor número de parasitos *LiKh1^{-/-}* do que WT (Figura 24). Esse resultado é condizente com o fato das amastigotas nocautes apresentarem defeito na divisão celular, o que leva a morte dos parasitos.

Os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* indicam que os parasitos nocautes para o gene *Kh1* obtidos nesse trabalho são potenciais candidatos para o desenvolvimento de uma vacina atenuada. As vacinas baseadas em parasitos atenuados são consideradas uma das estratégias mais promissoras para proteção contra as Leishmanioses, pois esses parasitos simulam o curso natural da infecção por *Leishmania* e fazem com que o sistema imune do hospedeiro entre em contato com um vasto repertório antigênico (Spörri and Reis 2005; Saljoughian, Taheri, and Rafati 2014), ativando células apresentadoras de antígenos e gerando células de memória (Foulds, Wu, and Seder 2006). Essas características são cruciais para desenvolvimento de uma resposta duradoura (Selvapandiyan et al. 2012; Saljoughian, Taheri, and Rafati 2014).

Uma das principais preocupações no desenvolvimento de vacinas atenuadas é garantir sua segurança, demonstrando que não existe risco dos parasitos recuperarem o fenótipo virulento e que os parasitos são completamente eliminados com o tempo (Gannavaram et al. 2014).

Dessa forma, conhecer o tempo de persistência dos parasitos mutantes *Likh1^{-/-}* nos camundongos será importante para avaliar a viabilidade de se estudar os mutantes como candidatos vacinais. Para avaliar se o perfil de multiplicação *in vivo* apresentado pelos mutantes *Likh1^{-/-}* condiz com o perfil

observado *in vitro* no presente estudo, será necessário acompanhar a infecção, a fim de determinar o momento no qual os parasitos nocautes não serão mais detectados nos camundongos. Conforme padronização realizada neste trabalho, essa avaliação poderá ser realizada por meio do inóculo de formas promastigotas por via intraperitoneal, em camundongos C57BL/6 nocaute para IFN- γ , que se mostrou a melhor estratégia para esse tipo de análise. Sabe-se, por exemplo, que *L. mexicana* *Kh1*^{-/-} não é capaz de causar lesão em BALB/c e que após cerca de oito semanas os parasitos nocautes não são mais encontrados nos camundongos (Tran *et al.* 2015). No caso de *L. donovani* nocaute para centrina (*LdCEN1*^{-/-}), apesar desses parasitos serem capazes de infectar camundongos BALB/c, nenhum parasito é encontrado após 12 semanas de infecção nem no baço nem no fígado desses animais (Selvapandiyar *et al.* 2009). Já para deleção do gene que codifica a proteína p27, expressa somente em amastigotas, os parasitos *Ldp27*^{-/-} são capazes de sobreviver cerca de 20 semanas em camundongos BALB/c (Dey *et al.* 2013).

Embora alguns autores defendam que a capacidade dos parasitos em gerar uma infecção subclínica é fundamental para que a imunização resulte em uma proteção duradoura, como no caso da leishmanização (Nadim *et al.* 1988; Nadim, Javadian, and Mohebbali 1997; Streit *et al.* 2001; Dunning 2009; Selvapandiyar *et al.* 2012; Saljoughian, Taheri, and Rafati 2014), parasitos podem gerar uma resposta imune protetora sem, no entanto, gerar infecção do hospedeiro, o que foi demonstrado nas imunizações com *L. tarentolae*. Apesar desses parasitos serem incapazes de causar patologia (até mesmo em camundongos severamente imunossuprimidos), foram capazes de elicitar uma resposta protetora em camundongos BALB/c, com ativação de células dendríticas e produção de IFN- γ por linfócitos T (Breton *et al.* 2005). Assim, o fato dos nocautes *LiKh1*^{-/-} não terem infectado os camundongos com eficiência, nem mesmo os imunossuprimidos, não afasta a possibilidade desses parasitos serem capazes de gerar uma resposta imune protetora.

Camundongos são os modelos largamente utilizados em pesquisa biomédica. O principal motivo desse uso é a existência de várias raças diferentes, com características genéticas muito bem definidas que são mantidas por meio de cruzamentos consanguíneos, de forma que os indivíduos da população se mantêm geneticamente muito parecidos (Loría-Cervera & Andrade-Narváez 2014). Além disso, existem reagentes disponíveis

para todo tipo de análise imunológica em camundongos (Garg and Dube 2006). No entanto, sabe-se que os camundongos não são o modelo ideal para estudo da LV, pois mesmo as espécies de susceptíveis à *L. donovani* e *L. infantum* são capazes de resolver a infecção com o tempo; evolução muito distinta daquela observada em humanos (Melby *et al.* 2000; P. C. Melby *et al.* 2001; Mukherjee *et al.* 2003; Loría-Cervera & Andrade-Narváez 2014). Em contrapartida, o hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) se apresenta como o melhor modelo para estudo da LV, pois, semelhante aos humanos, desenvolve doença severa e progressiva, com imunossupressão, hepatoesplenomegalia e pancitopenia (Gifawesen & Farrell 1989; P. Melby *et al.* 2001; Mookerjee *et al.* 2003; Fazzani *et al.* 2011; Loría-Cervera & Andrade-Narváez 2014). Dessa forma, o melhor modelo para se avaliar a infecção pelos mutantes *LiKh1^{-/-}* e a resposta imune induzida por esses parasitos é o hamster, estratégia que também poderá ser utilizada futuramente.

Uma etapa fundamental na eliminação das formas amastigotas intracelulares é a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos ativados. A importância da produção de NO para contenção da infecção é bem documentada, tanto *in vitro* (Liew *et al.* 1991) quanto *in vivo* (Wei *et al.* 1995), em modelos murinos (Mauël 1996) e em humanos (Kroncke *et al.* 1998). Durante a infecção por *Leishmania*, várias células produzem IFN- γ , como as células NK, os LT CD8⁺ e principalmente os LT CD4⁺ (Mary *et al.* 1999). O IFN- γ induz a expressão de óxido nítrico sintase pelos macrófagos, de forma que grandes quantidades de NO são produzidas a partir de L-arginina para eliminação dos parasitos (Wakil *et al.* 1998). Dentre os principais efeitos do NO sobre a *Leishmania* estão a inibição de enzimas mitocondriais essenciais para respiração, e também a inibição de tióis e fatores de transcrição. Além disso, o peroxinitrito, formado a partir de reação do NO com superóxidos, tem como alvo lipídios e DNA (Liew *et al.* 1991; Nathan and Hibbs 1991; Stamler 1994). Por outro lado, a *Leishmania* também possui mecanismos de escape para evitar a ação microbicida do óxido nítrico, entre eles a inibição de vias de sinalização críticas para o macrófago (Gregory and Olivier 2005), como a supressão da ativação das MAP kinases (Martiny *et al.* 1999; S. Ghosh *et al.* 2002).

Para avaliar se os nocautes *LiKh1^{-/-}* induziriam uma resposta diferente dos parasitos selvagens ao interagir com os macrófagos, avaliamos a

produção de NO pelos macrófagos peritoneais murinos. No entanto, macrófagos peritoneais infectados com *L. infantum* WT ou com parasitos mutantes *Kh1^{-/-}* não produziram NO (Figura 25). De fato, foi demonstrado que diferentes cepas de *L. infantum* induzem diferentes perfis de expressão de óxido nítrico sintase, sendo que a cepa utilizada nesse trabalho (ITMAP-263) foi uma das que menos induziu a expressão do gene (Marques *et al.* 2015). Além disso, a quantidade de NO produzida varia de acordo com a célula (monócitos, macrófagos, esplenócitos) e com a espécie investigada (camundongo, cão, primata) (Assche *et al.* 2011).

Apesar da deleção do gene *Kh1^{-/-}* não ter interferido na produção de NO pelos macrófagos infectados, esse é um resultado preliminar, e a possibilidade dos parasitos *LiKh1^{-/-}* serem testados como vacina não deve ser descartada. Uma resposta robusta para essa pergunta será obtida testando a produção, além de NO, de interleucinas, IFN- γ e TNF- α não só em infecções *in vitro*, mas também de camundongos imunizados com parasitos mutantes *Likh1^{-/-}* e desafiados com *L. infantum* (Frederick P Heinzl *et al.* 1991; F P Heinzl *et al.* 1993; Sypek *et al.* 1993; Darrah *et al.* 2007), estratégia que deve ser empregada futuramente a fim de avaliar se as imunizações com os mutantes são capazes de gerar proteção contra infecção por *Leishmania*.

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse trabalho demonstram que o gene *Kh1* não é um gene essencial em *L. infantum*, e que os parasitos nocautes para o gene *Kh1* apresentam fenótipo atenuado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tal fenótipo é resultante do defeito na divisão celular dos parasitos na fase intracelular amastigota. Por outro lado, apesar de não haver alteração do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum Kh1^{-/-}*, variações em sua morfologia apontam para funções ainda não descritas nesses mutantes. Em vista do potencial que cepas atenuadas apresentam para o desenvolvimento de vacinas, é pertinente afirmar que o material aqui apresentado justifica o investimento em investigações para a aplicação de *L. infantum Kh1^{-/-}*, como candidato vacinal contras as leishmanioses.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar a capacidade dos parasitos mutantes *Likh1*^{-/-} em manter a infecção em camundongos por diluição limitante;
- Investigar a capacidade dos parasitos mutantes *Likh1*^{-/-} em manter a infecção em hamsters por diluição limitante;
- Avaliar perfil de citocinas elicitado em camundongos e/ou hamsters após imunização com parasitos mutantes *Likh1*^{-/-} e após desafio com *L. infantum* e *L. braziliensis*;
- Avaliar o perfil de citocinas elicitado em células mononucleares do sangue periférico após estímulo com parasitos mutantes *Likh1*^{-/-};
- Investigar a localização celular da proteína Kharon1 em *L. infantum* por microscopia confocal;
- Investigar quais as proteínas que interagem com Kharon1 em *L. infantum* por co-imunoprecipitação.

REFERÊNCIAS

- Adler, S. 1964. "Leishmania S." *Advances in Parasitology* 2: 35–96.
- Agallou, Maria, Despina Smirlis, Ketty P Soteriadou, and Evdokia Karagouni. 2012. "Vaccination with Leishmania Histone H1-Pulsed Dendritic Cells Confers Protection in Murine Visceral Leishmaniasis." *Vaccine* 30 (34). Elsevier Ltd: 5086–93.
- Ahuja, Seema S, Robert L Reddick, Naoko Sato, Vanessa KostECKi, Weiguo Zhao, J Matthew, Peter C Melby, and Sunil K Ahuja. 1999. "Dendritic Cell (DC)-Based Anti-Infective Strategies: DCs Engineered to Secrete IL-12 Are a Potent Vaccine in a Murine Model of an Intracellular Infection." *The Journal of Immunology* 163 (Dc): 3890–97.
- Akhoundi, Mohammad, Katrin Kuhls, Arnaud Cannet, Jan Votýpka, Pierre Marty, Pascal Delaunay, and Denis Sereno. 2016. "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies A Historical Overview of the Classification , Evolution , and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies." *PLoS Negl Trop Dis* 10 (3): 1–40.
- Akopyants, Natalia S, Nicola Kimblin, Nagila Secundino, Rachel Patrick, Phillip Lawyer, Deborah E Dobson, Stephen M Beverley, and L David. 2009. "Demonstration of Genetic Exchange during Cyclical Development of *Leishmania* in the Sand Fly Vector." *Science* 324 (5924): 265–68.
- Alexander, James, Graham H Coombs, and C Jeremy. 1998. "*Leishmania mexicana* Cysteine Proteinase-Deficient Mutants Have Attenuated Virulence for Mice and Potentiate a Th1 Response." *The Journal of Immunology* 161: 6794–6801.
- Alonso, Victoria L, Carla Ritagliati, Pamela Cribb, and Esteban C Serra. 2014. "Construction of Three New Gateway ® Expression Plasmids for *Trypanosoma cruzi*." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (December): 1081–85.
- Alvar, Jorge, Iván D. Vélez, Caryn Bern, Mercé Herrero, Philippe Desjeux, Jorge Cano, Jean Jannin, and Margrietn de Boer. 2012. "Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence." *PLoS ONE* 7 (5): e35671.

Ambit, Audrey, Kerry L Woods, Benjamin Cull, Graham H Coombs, and Jeremy C Mottram. 2011. "Morphological Events during the Cell Cycle of *Leishmania major*." *Eukaryotic Cell* 10 (11): 1429–38.

Ameen, M. 2010. "Cutaneous Leishmaniasis: Advances in Disease Pathogenesis, Diagnostics and Therapeutics." *Clinical Dermatology*, no. 35: 699–705.

Amini, H. 1991. "Cutaneous Lesions with Very Long Duration as a Complication of Leishmanization." *Iranian J. Publ. Health* 20 (Nos): 1–4.

Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N, 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol*;6(10):392-401.

Applied Biosystems. 2004. "Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR." *Applied Biosystems*. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042380.pdf.

Asbroek, A L M, Marc Ouellette, and Piet Borst. 1990. "Target Insertion of the Neomycin Phosphotransferase Gene into the Tubulogene Cluster of *Trypanosoma brucei*." *Nature* 348: 174–75.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, Badaro R., 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 59(1):53-7.

Aslanidis, Charalampos, and Pieter J De Jong. 1990. "Ligation-Independent Cloning of PCR Products (LIC-POR)." *Nucleic Acids Research* 18 (20): 6069–74.

Assche, Tim Van, Maartje Deschacht, Raquel A Inocêncio, Louis Maes, and Paul Cos. 2011. *Leishmania – Macrophage Interactions: Insights into the Redox Biology.* *Free Radical Biology and Medicine* 51 (2). Elsevier Inc.: 337–51.

Bacellar, Olivia, Helio Lessa, Albert Schriefer, Paulo Machado, Ribeiro De Jesus, Walderez O Dutra, Kenneth J Gollob, and Edgar M Carvalho. 2002. "Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients." *Infection and Immunity* 70 (12): 6734–40.

Baharia, Rajendra K, Rati Tandon, Tanuj Sharma, Manish K Suthar, Sanchita Das, Mohammad Imran Siddiqi, Jitendra Kumar Saxena, Shyam Sunder, and Anuradha Dube. 2015. "Recombinant NAD-Dependent SIR-2 Protein of *Leishmania donovani*: Immunobiochemical Characterization as a Potential Vaccine against Visceral Leishmaniasis." *PLoS Negl Trop Dis* 9 (3): 1–26.

Barata, R.A., da Silva, J. C. F., da Silva, J. C., Almeida, S. N., Teixeira, L. A. S., Dias, E. S.; 2011. Control of visceral leishmaniasis in the town of Porteirinha, state of Minas Gerais, Brazil, from 1998 to 2003. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.44 no.3

Barrangou, Rodolphe. 2012. "CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes." *Science* 1709 (2007): 1709–12.

Barreto, Consuelo, Jairo Torres, Magalhães Junior, Clauceane De Jesus, Bárbara Maria, Silva Souza, Daniela Farias, et al. 2014. "Comparison of Two Commercial Vaccines against Visceral Leishmaniasis in Dogs from Endemic Areas: IgG , and Subclasses , Parasitism , and Parasite Transmission by Xenodiagnosis." *Vaccine* 32 (11). Elsevier Ltd: 1287–95.

Basu, Rajatava, Suniti Bhaumik, Jayati Mookerjee Basu, Kshudiram Naskar, Tripti De, and Syamal Roy. 2005. "Kinetoplastid Membrane Protein-11 DNA Vaccination Induces Complete Protection against Both Pentavalent Antimonial-Sensitive and -Resistant Strains of *Leishmania donovani* That Correlates with Inducible Nitric Oxide Synthase Activity and IL-4 Generation: Ev." *The Journal of Immunology* 174: 7160–71.

Batista, Michel, Fabricio K Marchini, Paola A F Celedon, Stenio P Fragoso, Christian M Probst, Henrique Preti, Luiz S Ozaki, Gregory A Buck, Samuel Goldenberg, and Marco A Krieger. 2010. "A High-Throughput Cloning System for Reverse Genetics in *Trypanosoma cruzi*." *BMC Microbiology* 10 (259): 1–12.

Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C, Isibasi A., 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 65–74.

Beetham, Jeffrey K, John E Donelson, and Rebecca R Dahlin. 2003. "Surface Glycoprotein PSA (GP46) Expression during Short- and Long-Term Culture of *Leishmania chagasi*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 131: 109–17.

Berman, Jonathan D, James V Gallalee, and James M Best. 1987. "Sodium Stibogluconate (Pentostam) Inhibition Of Glucose Catabolism Via The Glycolytic Pathway, And Fatty Acid Beta-Oxidation In *Leishmania mexicana* Amastigotes." *Biochemical Pharmacology* 36 (2): 197–201.

Berrow, Nick S, David Alderton, and Raymond J Owens. 2009. "The Precise Engineering of Expression Vectors Using High-Throughput In-Fusion PCR Cloning." In *Methods in Molecular Biology: High Throughput Protein Expression and Purification*, 75–90.

Bhattacharya, Parna, Ranadhir Dey, Pradeep K Dagur, and Amritanshu B Joshi. 2016. "Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin Knock Out Parasites Generate Non- Inferior Protective Immune Response in Aged Mice against Visceral Leishmaniasis." *PLoS Negl Trop Dis* 10 (8): 1–28.

Boité, Mariana C., Isabel L. Mauricio, Michael A. Miles, and Elisa Cupolillo. 2012. "New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (*Viannia*) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (11): e1888.

Boitz, Jan M, Phillip A Yates, Chelsey Kline, Upasna Gaur, Mary E Wilson, Buddy Ullman, and Sigrid C Roberts. 2009. "*Leishmania donovani* Ornithine Decarboxylase Is Indispensable for Parasite Survival in the Mammalian Host." *Infection and Immunity* 77 (2): 756–63.

Bolotin, Alexander, Benoit Quinquis, Alexei Sorokin, and S Dusko Ehrlich. 2005. "Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin." *Microbiology* 151 (2005): 2551–61.

Borges, V, M Ruiz, P Gomes, A Colombo, L Silva, H Romero, and A Prata. 2003. "Intradermorreação de Montenegro Após Sucessivas Repetições Do Teste Em Porteirinha, MG. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36 (2): 249–51.

Borghi, Sergio M, Victor Fattori, Ivete Conchon-costa, Phileno Pinge-filho, Wander R Pavanelli, and Waldiceu A Verri Jr. 2017. "Leishmania Infection: Painful or Painless?" *Parasitology Research* 116 (2). Parasitology Research: 465–75.

Borst, Piet. 1986. "Discontinuous Transcription and Antigenic Variation In Trypanosomes." *Ann. Rev. Biochem.* 55: 701–32.

Borst, Piet, and JAN Hoeijmakers. 1979. "Kinetoplast DNA." *Plasmid* 2: 20–40.

Breton, Marie, Michel J Tremblay, Marc Ouellette, and Barbara Papadopoulou. 2005. "Live Nonpathogenic Parasitic Vector as a Candidate Vaccine against Visceral Leishmaniasis." *Infection and Immunity* 73 (10): 6372–82.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM., 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 15;155(6):3102-11.

Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM., 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun.* 67(9):4477-84.

Brittingham, Andrew, Melissa A Miller, John E Donelson, and Mary E Wilson. 2001. "Regulation of GP63 mRNA Stability in Promastigotes of Virulent and Attenuated *Leishmania chagasi*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 112: 51–59.

Britto, Constança, Christophe Ravel, Patrick Bastien, Christine Blaineau, Michel Page, Jean-pierre Dedet, and Patrick Wincker. 1998. "Conserved Linkage Groups Associated with Large-Scale Chromosomal Rearrangements between Old World and New World *Leishmania* Genomes." *Gene* 222: 107–17.

Burchmore, Richard J S, and David T Hart. 1995. "Glucose Transport in Amastigotes and Promastigotes of *Leishmania mexicana*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 74 (1995): 77–86.

Burchmore, Richard J S, and Scott M Landfear. 1998. "Differential Regulation of Multiple Glucose Transporter Genes in *Leishmania mexicana*." *The Journal Of Biological Chemistry* 273 (44): 29118–26.

Burchmore, Richard J S, Dayana Rodriguez-contreras, Kathleen Mcbride, Michael P Barrett, Govind Modi, David Sacks, and Scott M Landfear. 2003. "Genetic Characterization of Glucose Transporter Function in *Leishmania mexicana*." *PNAS* 100 (7): 3901–3906.

Calvo-Álvarez, Estefania, Raquel Álvarez-velilla, Maribel Jimenez, Ricardo Molina, Yolanda Perez-Pertejo, Rafael Balana-Fouce, and Rosa Reguera. 2014. "First Evidence of Intraclonal Genetic Exchange in Trypanosomatids Using Two *Leishmania Infantum* Fluorescent Transgenic Clones." *Plos Genetics* 8 (9): e3075.

Cazzulo, JJ. 1992. "Aerobic Fermentation of Glucose by Trypanosomatids." *FASEB Journal* 6 (13): 3153–61.

CDC. 2016. "CDC Practical Guide to Laboratory Diagnosis of Leishmaniasis." *CDC's Division of Parasitic Diseases and Malaria*, 1–14. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/diagnosis.html>.

Chakravarty, Jaya, Subodh Kumar, Sonali Trivedi, Vijay K Rai, Anup Singh, Jill A Ashman, Elsa M Laughlin, et al. 2011. "A Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of the LEISH-F1 + MPL-SE Vaccine for Use in the Prevention of Visceral Leishmaniasis." *Vaccine* 29 (19). Elsevier Ltd: 3531–37.

Chappuis, F, S Sundar, A Hailu, H Ghalib, S Rijal, R Peeling, J Alvar, and M Boelaert. 2007. "Visceral Leishmaniasis: What Are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control?" *Nature Reviews* 5 (November): 873–82.

Charlab, Rosane, Jesus G Valenzuela, and Edgar D Rowton. 1999. "Toward an Understanding of the Biochemical and Pharmacological Complexity of the Saliva of a Hematophagous Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*." *PNAS* 96 (26): 15155–60.

Chatelain, Rene, Kari Varkila, and Robert L Coffman. 1992. "IL-4 Induces a Th2 Response in *Leishmania major*-Infected Mice." *The Journal of Immunology* 148: 1182–87.

Chhajer, Rudra, and Nahid Ali. 2014. "Genetically Modified Organisms and Visceral Leishmaniasis." *Frontiers in Immunology* 5 (May): 1–10.

Clayton, C E. 1999. "Genetic Manipulation of Kinetoplastida." *Parasitology Today* 15 (9): 372–78.

Coelho, E, C Tavares, F Carvalho, K Chaves, K Teixeira, R Rodrigues, H Charest, G Matlashewski, R Gazzinelli, and AP Fernandes. 2003. "Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen , but Not by the LACK Antigen , Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection." *Infection and Immunity* 71 (7): 3988–94.

Coler, Rhea N, and Steven G Reed. 2005. "Second-Generation Vaccines against Leishmaniasis." *Immunoparasitology Series* 21 (5): 244–49.

Collin, Nicolas, Regis Gomes, Clarissa Teixeira, Lily Cheng, Andre Laughinghouse, Jerrold M Ward, Dia-eldin Elnaïem, Laurent Fischer, Jesus G Valenzuela, and Shaden Kamhawi. 2009. "Sand Fly Salivary Proteins Induce Strong Cellular Immunity in a Natural Reservoir of Visceral Leishmaniasis with Adverse Consequences for *Leishmania*." *PLoS Pathogens* 5 (5): e1000441.

Contrera-Rodriguez, and Scott M Landfear. 2006. "Metabolic Changes in Glucose Transporter-Deficient *Leishmania mexicana* and Parasite Virulence." *The Journal Of Biological Chemistry* 281 (29): 20068–76.

Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine JC, 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci*;115(Pt 11):2303-16.

Croft, Simon L, Shyam Sundar, and Alan H Fairlamb. 2006. "Drug Resistance in Leishmaniasis." *Clinical Microbiology Reviews* 19 (1): 111–26.

Cruz, Angela, Cara M Coburn, and Stephen M Beverley. 1991. "Double Targeted Gene Replacement for Creating Null Mutants." *Proc. Natl. Acad. Sci.*

88 (August): 7170–74.

Cruz & Beverley. 1990. "Gene Replacement in Parasitic Protozoa." *Nature* 348 (6297): 171–73.

Cunha-ju, Ferreira, Valter Viana Andrade-neto, Marta Lopes Lima, Coral Barbas, Alves Costa-silva, Andres J Galisteo Junior, Maria A Abengo, et al. 2017. "Cyclobenzaprime Raises ROS Levels in *Leishmania infantum* and Reduces Parasite Burden in Infected Mice." *PLoS Negl Trop Dis* 11 (1): 1–11.

Cunha, Joana, Eugenia Carrillo, Carmen Sánchez, Israel Cruz, Javier Moreno, and Anabela Cordeiro-da-silva. 2013. "Characterization of the Biology and Infectivity of *Leishmania infantum* Viscerotropic and Dermotropic Strains Isolated from HIV + and HIV- Patients in the Murine Model of Visceral Leishmaniasis." *Parasites & Vectors* 6 (122): 1–14.

Daneshvar H, Coombs GH, Hagan P, Phillips RS., 2003. *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines. *J Infect Dis*, 187:1662–8.

Darrah, Patricia A, Dipti T Patel, Paula M De Luca, Ross W B Lindsay, Dylan F Davey, Barbara J Flynn, Søren T Hoff, et al. 2007. "Multifunctional T H 1 Cells Define a Correlate of Vaccine- Mediated Protection against *Leishmania major*." *Nature* 447 (7): 843–50.

Davoudi, Noushin, Celia A Tate, Corinna Warburton, Angus Murray, Fereidoun Mahboudi, and W Robert McMaster. 2005. "Development of a Recombinant *Leishmania major* Strain Sensitive to Ganciclovir and 5-Fluorocytosine for Use as a Live Vaccine Challenge in Clinical Trials." *Vaccine* 23: 1170–77.

Dawit, G, Z Girma, and K Simenew. 2013. Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis." *Bacteriology & Parasitology* 4 (2): 166.

Desjeux, Philippe. 1996. "Leishmaniasis: Public Health Aspects and Control." *Clinics in Dermatology* 14: 417–23.

Dey, Ranadhir, Pradeep K. Dagur, Angamuthu Selvapandiyam, J. Philip McCoy, Poonam Salotra, Robert Duncan, and Hira L. Nakhasi. 2013. "Live Attenuated

Leishmania donovani p27 Gene Knockout Parasites Are Non-Pathogenic and Elicit Long Term Protective Immunity in BALB/c Mice.” *J Immunol* 190 (5): 2138–49.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R, 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*;25(5):1240-2.

do Monte-Neto, Rubens, Adriano C. Coelho, Frédéric Raymond, Danielle Légaré, Jacques Corbeil, Maria N Melo, Frédéric Frézard, and Marc Ouellette. 2011. “Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*.” *PLoS Negl Trop Dis* 5 (5): e1167.

Dortay, Hakan, Usha Madhuri Akula, Christin Westphal, Marie Sittig, and Bernd Mueller-roeber. 2011. “High-Throughput Protein Expression Using a Combination of Ligation-Independent Cloning (LIC) and Infrared Fluorescent Protein (IFP) Detection.” *PLoS ONE* 6 (4): e18900.

Downing, Tim, Hideo Imamura, Saskia Decuypere, Taane G Clark, Graham H Coombs, James A Cotton, James D Hilley, et al. 2011. “Whole Genome Sequencing of Multiple *Leishmania donovani* Clinical Isolates Provides Insights into Population Structure and Mechanisms of Drug Resistance.” *Genome Research* 21: 2143–56.

Duarte, Mariana Costa, Daniela Pagliara Lage, Vívian Tamiatti Martins, Miguel Angel Chávez-fumagalli, Bruno Mendes Roatt, Daniel Menezes-souza, Luiz Ricardo Goulart, et al. 2016. “Review Article Recent Updates and Perspectives on Approaches for the Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis” 49 (June): 398–407.

Dumas, Carole, Marc Ouellette, Jorge Tovar, Mark L Cunningham, Alan H Fairlamb, Samira Tamar, Martin Olivier, and Barbara Papadopoulou. 1997. “Disruption of the Trypanothione Reductase Gene of *Leishmania* Decreases Its Ability to Survive Oxidative Stress in Macrophages.” *The EMBO Journal* 16 (10): 2590–98.

Duncan, Samuel M, Elmarie Myburgh, Cintia Philipon, Elaine Brown, Markus Meissner, James Brewer, and Jeremy C Mottram. 2016. “Conditional Gene

Deletion with DiCre Demonstrates an Essential Role for CRK3 in *Leishmania mexicana* Cell Cycle Regulation.” *Molecular Microbiology* 100 (April): 931–44.

Dunning, Naomi. 2009. “Leishmania Vaccines: From Leishmanization to the Era of DNA Technology.” *Bioscience Horizons* 2 (1): 73–82.

Duque, Guillermo Arango, and Albert Descoteaux. 2015. “ScienceDirect Leishmania Survival in the Macrophage: Where the Ends Justify the Means.” *Current Opinion in Microbiology* 26. Elsevier Ltd: 32–40.

Elmahallawy, Ehab Kotb, Antonio Sampedro Martínez, Javier Rodriguez-granger, Yannick Hoyos-, Ahmad Agil, José Marí, Navarro Mari, and José Gutierrez Fernández. 2014. “Diagnosis of Leishmaniasis.” *J Infect Dev Ctries* 8 (8): 961–72.

Esposito, Dominic, Dominic Esposito, Leslie A Garvey, and Chacko S Chakiath. 2009. “Gateway Cloning for Protein Expression.” In *Methods in Molecular Biology: High Throughput Protein Expression and Purification*, 31–54.

Evans, Krystal J., and Lukasz Kedzierski. 2012. “Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis.” *Journal of Tropical Medicine* 2012.

Faria, Joana, Inês Loureiro, Nuno Santarém, Pedro Cecílio, and Sandra Mace. 2016. “Disclosing the Essentiality of Ribose-5-Phosphate Isomerase B in Trypanosomatids.” *Nature* 6 (26937): 1–16.

Fazzani, C, P A Guedes, A Sena, E B Souza, H Goto, J A L Lindoso, C Fazzani, et al. 2011. “Dynamics of Immunosuppression in Hamsters with Experimental Visceral Leishmaniasis Dynamics of Immunosuppression in Hamsters with Experimental Visceral Leishmaniasis.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44 (7): 666–70.

Fernandes, Ana Paula, Míriam Maria, Silva Costa, Eduardo Antônio, Ferraz Coelho, Marilene Suzan, Marques Michalick, et al. 2008. “Protective Immunity against Challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Beagle Dogs Vaccinated with Recombinant A2 Protein.” *Vaccine* 26 (2008): 5888–95.

Fiuza, Jacqueline Araújo, Ranadhir Dey, Dwann Davenport, Maha Abdeladhim, Claudio Meneses, Fabiano Oliveira, Shaden Kamhawi, Jesus G Valenzuela,

Sreenivas Gannavaram, and Hira L Nakhasi. 2016. "Intradermal Immunization of *Leishmania donovani* Centrin Knock-Out Parasites in Combination with Salivary Protein LJM19 from Sand Fly Vector Induces a Durable Protective Immune Response in Hamsters." *PLoS Negl Trop Dis* 10 (1): 1–17.

Fiuza, Jacqueline, Sreenivas Gannavaram, Costa Santiago, Angamuthu Selvapandiyan, Daniel Menezes, Lívia Silva, Araújo Passos, et al. 2015. "Vaccination Using Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin Deleted Parasites Induces Protection in Dogs against *Leishmania infantum*." *Vaccine* 33: 280–88.

Fiuza, Jacqueline, Costa Santiago, Angamuthu Selvapandiyan, Sreenivas Gannavaram, Natasha Delaqua, Lilian Lacerda, Daniella Castanheira, Rodrigo Correa-oliveira, Hira Nakhasi, and Ricardo Fujiwara. 2013. "Induction of Immunogenicity by Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin Deleted Parasites in Dogs." *Vaccine* 31 (14). Elsevier Ltd: 1785–92.

Forer, Arthur, and Jeremy D Pickett-Heaps. 1998. "Cytochalasin D and Latrunculin Affect Chromosome Behaviour during Meiosis in Crane-Y Spermatocytes." *Chromosome Research* 6 (July): 533–49.

Foulds, Kathryn E, Chang-you Wu, and Robert A Seder. 2006. "Th1 Memory : Implications for Vaccine Development." *Immunological Reviews* 211: 58–66.

Fragaki, Konstantina, Isabelle Suffia, Bernard Ferrua, Yves Le Fichoux, and Joanna Kubar. 2001. "Immunisation with DNA Encoding *Leishmania infantum* Protein papLe22 Decreases the Frequency of Parasitemic Episodes in Infected Hamsters." *Vaccine* 19: 1701–9.

Franke, Eileen D, B Mcgreevy, P Stephen, and David L Sacks. 1985. "Growth Cycle-Dependent Generation Of Complement-Resistant *Leishmania* Promastigotes." *The Journal of Immunology* 134 (4): 2713–18.

Freedman, Daniel J, and Stephen M Beverley. 1993. "Two More Independent Selectable Markers for Stable Transfection of *Leishmania*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 62 (1993): 37–44.

Gachet, Yannick, Sylvie Tournier, Jonathan B A Millar, and S Jeremy. 2004. "Mechanism Controlling Perpendicular Alignment of the Spindle to the Axis of

Cell Division in Fission Yeast.” *The EMBO Journal* 23 (6): 1289–1300.

Galati, E.A.B. 2003. Classificação de Phlebotominae. In *Flebotomíneos do Brasil* (E.F. Rangel & R. Lainson, eds.). Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p.23–52.

Gannavaram, Sreenivas, Ranadhir Dey, Kumar Avishek, Angamuthu Selvapandiyan, Poonam Salotra, and Stephen M Beverley. 2014. “Biomarkers of Safety and Immune Protection for Genetically Modified Live Attenuated *Leishmania* Vaccines against Visceral Leishmaniasis – Discovery and Implications.” *Frontiers in Immunology* 5 (May): 1–9.

Garg, Ravendra, and Anuradha Dube. 2006. “Animal Models for Vaccine Studies for Visceral Leishmaniasis.” *Indian J Med Res*, no. March: 439–54.

Gasiunas, Giedrius, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. 2012. “Cas9 – crRNA Ribonucleoprotein Complex Mediates Specific DNA Cleavage for Adaptive Immunity in Bacteria.” *PNAS plus* 109 (39): 2579–86.

Ghosh, Anirban, Wen Wei Zhang, and Greg Matlashewski. 2002. “Immunization with A2 Protein Results in a Mixed Th1 / Th2 and a Humoral Response Which Protects Mice against *Leishmania donovani* Infections.” *Vaccine* 20: 59–66.

Ghosh, Sanjukta, Sandip Bhattacharyya, Madhumita Sirkar, Gouri Shankar Sa, Tanya Das, Debashis Majumdar, Syamal Roy, and Subrata Majumdar. 2002. “*Leishmania donovani* Suppresses Activated Protein 1 and NF-KappaB Activation in Host Macrophages via Ceramide Generation: Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase.” *Infection and Immunity* 70 (12): 6828–38.

Gifawesen, Chaltu, and Farrell. 1989. “Comparison of T-Cell Responses in Self-Limiting versus Progressive Visceral *Leishmania donovani* Infections in Golden Hamsters.” *Infection and Immunity* 57 (10): 3091–96.

Gilroy, Caslin, Tamara Olenyik, Sigrid C Roberts, and Buddy Ullman. 2011. “Spermidine Synthase Is Required for Virulence of *Leishmania donovani*.” *Infection and Immunity* 79 (7): 2764–69.

Giunchetti, Rodolfo, Rodrigo Corrêa, Olindo Assis Martins-filho, Bruno Mendes, Rodrigo Dian, De Oliveira Aguiar-soares, Wendel Coura-vital, et al. 2008. "A Killed *Leishmania* Vaccine with Sand Fly Saliva Extract and Saponin Adjuvant Displays Immunogenicity in Dogs." *Vaccine* 26: 623–38.

Gómez Pérez, V; García-Hernandez, R; Corpas-López, V; Tomás, A M; Martín-Sanchez, J; Castanys, S; Gamarro, F. 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.* 2016 Aug; 6(2): 133–139.

Gomes, Regis, Fabiano Oliveira, Clarissa Teixeira, Claudio Meneses, Dana C Gilmore, Dia-eldin Elnaiem, Shaden Kamhawi, and Jesus G Valenzuela. 2012. "Immunity to Sand Fly Salivary Protein LJM11 Modulates Host Response to Vector-Transmitted *Leishmania* Conferring Ulcer-Free Protection." *Journal of Investigative Dermatology* 132 (12). Nature Publishing Group: 2735–43.

Gontijo, Célia Maria, and Maria Norma Melo. 2004. "Leishmaniose Visceral No Brasil : Quadro Atual, Desafios e Perspectivas." *Rev. Bras. Epidemiol.* 7: 338–49.

Gossage, Sharon M., Matthew E. Rogers, and Paul A. Bates. 2003. "Two Separate Growth Phases during the Development of *Leishmania* in Sand Flies: Implications for Understanding the Life Cycle." *International Journal for Parasitology* 33 (10): 1027–34.

Gorczyński RM, 1985. Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. II. Use of temperature-sensitive avirulent clones of parasite for vaccination purposes. *Cell Immunol.*, 94:11–20.

Goto, H, and J A L Lindoso. 2004. "Immunity and Immunosuppression in Experimental Visceral Leishmaniasis." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 615–23.

Gregory, D J, and M Olivier. 2005. "Subversion of Host Cell Signalling by the Protozoan Parasite *Leishmania*." *Parasitology* 130: s27–35.

Griensven, J Van, E Carrillo, R Lopez-Velez, L Lynen, and J Moreno. 2014. "Leishmaniasis in Immunosuppressed Individuals." *Clinical Microbiology and*

Infection 2014 20 (4): 286–99.

Gueirard, Pascale, Annie Laplante, Christiane Rondeau, Geneviève Milon, and Michel Desjardins. 2008. "Trafficking of *Leishmania donovani* Promastigotes in Non-Lytic Compartments in Neutrophils Enables the Subsequent Transfer of Parasites to Macrophages." *Cellular Microbiology* 10 (1): 100–111.

Guimarães-Costa, Anderson B, Michelle Nascimento, Giselle Froment, Rodrigo Soares, Fernanda Morgado, Fátima Conceição-Silva, and Elvira Saraiva. 2009. "*Leishmania amazonensis* Promastigotes Induce and Are Killed by Neutrophil Extracellular Traps." *PNAS* 106 (16): 6748–6753.

Gupta, Gaurav, Steve Oghumu, and Abhay R. Satoskar. 2013. "Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis." *Adv Appl Microbiol*, no. 82: 155–84.

Gurunathan, By Sanjay, David L Sacks, Daniel R Brown, Steven L Reiner, Hughes Charest, Nicolas Glaichenhaus, and Robert A Seder. 1997. "Vaccination with DNA Encoding the Immunodominant Antigen of *Leishmania major*." *The Journal of Experimental Medicine* 186 (7): 1137–47.

Hall, Laurie R, and Richard G Titus. 1995. "Sand Fly Vector Saliva Selectively Modulates Macrophage Functions That Inhibit Killing of *Leishmania major* and Nitric Oxide Production." *The Journal of Immunology* 155: 3501–6.

Hart, D T, and G H Coombs. 1982. "Leishmania Mexicana : Energy Metabolism of Amastigotes and Promastigotes The Energy Metabolism of *Leishmania* Species Promastigotes Has Been Studied Extensively , Whereas There Have Been Few Reports on the Catabolic Ability of Amastigotes." *Experimental Parasitology* 409 (54): 397–409.

Havens, Courtney G, Nelva Bryant, Ludmila Asher, Laurie Lamoreaux, Steve Perfetto, James J Brendle, and Karl A Werbovetz. 2000. "Cellular Effects of Leishmanial Tubulin Inhibitors on *L . donovani*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 110 (2000): 223–36.

Heinzel, F P, D S Schoenhaut, R M Rerko, L E Rosser, and M K Gately. 1993. "Recombinant Interleukin 12 Cures Mice Infected with *Leishmania major*." *The Journal of Experimental Medicine* 177 (May): 1505–9.

Heinzel, Frederick P, Michael D Sadick, Sandesh S Mutha, and Richard M Locksley. 1991. "Production of Interferon, Interleukin 2, Interleukin 4 and Interleukin 10 by CD4 + Lymphocytes in Vivo during Healing and Progressive Murine Leishmaniasis" 88 (August): 7011–15.

Herwaldt, Barbara L. 1999. "Leishmaniasis." *The Lancet* 354: 1191–99.

Hoare, Cecil a., and Franklin G. Wallace. 1966. "Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: A New Terminology." *Nature* 212 (5068): 1385–86. doi:10.1038/2121385a0.

Hoffmann, Juliano. 2009. "Parasite Burden In *Leishmania chagasi*-Infected, Immunosuppressed Balb/C Mice." *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 15 (3): 391–410.

Housseini, S, G Hatam, and S Ardehali. 2005. "Characterization of *Leishmania* Isolated from Unhealed Lesions Caused by Leishmanization." *240 La Revue de Santé de La Méditerranée Orientale* 11 (1/2): 240–43.

Huang, Cancan, and Salvatore Turco. 1993. "Defective Galactofuranose Addition in Lipophosphoglycan Biosynthesis in a Mutant of *Leishmania donovani*." *The Journal Of Biological Chemistry* 268 (November 15): 24060–66.

Inbar, Ehud, Natalia S Akopyants, Melanie Charmoy, Audrey Romano, Phillip Lawyer, Eldin A Elnaiem, Florence Kauffmann, et al. 2013. "The Mating Competence of Geographically Diverse *Leishmania major* Strains in Their Natural and Unnatural Sand Fly Vectors." *Plos Genetics* 9 (7): e1003672.

Ishino, Yoshizumi, Hideo Shinagawa, Kozo Makino, Mitsuko Amemura, and Atsuo Nakata. 1987. "Nucleotide Sequence of the lap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product." *Journal Of Bacteriology* 169 (2): 5429–33.

Ivens, A.C. et al., 2005. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(July), pp.436–442.

Jansen, Ruud, Jan D A Van Embden, Wim Gaastra, and Leo M Schouls. 2002. "Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes." *Molecular Microbiology* 43: 1565–75.

Jinek, Martin. 2012. "A Programmable Dual-RNA – Guided Bacterial Immunity." *Science* 337: 816–21.

Kamhawi, Shaden. 2006. "Phlebotomine Sand Flies and *Leishmania* Parasites : Friends or Foes ?" *TRENDS in Parasitology* 22 (9): 439–45.

Kapler, Geoffrey M, Cara M Coburn, and Stephen M Beverley. 1990. "Stable Transfection of the Human Parasite *Leishmania major* Delineates a 30-Kilobase Region Sufficient for Extrachromosomal Replication and Expression." *Molecular and Cellular Biology* 10 (3): 1084–94.

Karagiannis-Voules, Dimitrios Alexios, Ronaldo G C Scholte, Luiz H. Guimarães, Jürg Utzinger, and Penelope Vounatsou. 2013. "Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (5): e2213.

Katebi, A, E Gholami, T Taheri, F Zahedifard, S Habibzadeh, Y Taslimi, F Shokri, et al. 2015. "*Leishmania tarentolae* Secreting the Sand Fly Salivary Antigen PpSP15 Confers Protection against *Leishmania Major* Infection in a Susceptible BALB/c Mice Model." *Molecular Immunology* 67 (2). Elsevier Ltd: 501–11.

Kaye, P M, and T Aebischer. 2011. "Visceral Leishmaniasis : Immunology and Prospects for a Vaccine." *Clinical Microbiology and Infection* 17 (10): 1462–70.

Kazemi, B. 2011. "Genomic Organization of *Leishmania* Species." *Iranian J Parasitol* 6 (3): 1–18.

Kelly, John M, Helena M Ward, Michael A Miles, and Giles Kendall. 1992. "A Shuttle Vector Which Facilitates the Expression of Transfected Genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*." *Nucleic Acids Research* 20 (15): 3963–69.

Kevric, Ines, Mark A Cappel, and James H Keeling. 2015. "New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review." *Dermatologic Clinics* 33 (3). Elsevier Inc: 579–93.

Khamesipour, A, A Abbasi, A Firroz, A Mohammadi, S Eskandari, and M Jaafari. 2012. "Treatment of Cutaneous Lesions of 20 Years' Duration Caused

by Leishmanization.” *Indian J Dermatol* 57 (2): 123–25.

Khoshgoo, Naghmeh, Farnaz Zahedifard, Hiva Azizi, Yasaman Taslimi, Maribel Jiménez, and Sima Rafati. 2008. “Cysteine Proteinase Type III Is Protective against *Leishmania infantum* Infection in BALB / c Mice and Highly Antigenic in Visceral Leishmaniasis Individuals.” *Vaccine* 26: 5822–29.

Kimsey PB, Theodos CM, Mitchen TK, Turco SJ, Titus RG., 1993. An avirulent lipophosphoglycan-deficient *Leishmania major* clone induces CD4+ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent L. major. *Infect Immun.*, 61:5205–13.

Kolev, Nikolay G, Christian Tschudi, and Elisabetta Ullu. 2011. “RNA Interference in Protozoan Parasites: Achievements and Challenges.” *Eukaryotic Cell* 10 (9): 1156–63.

Kraeva, Natalya, Aygul Ishemgulova, Julius Lukeš, and Vyacheslav Yurchenko. 2014. “Tetracycline-Inducible Gene Expression System in *Leishmania mexicana*.” *Molecular & Biochemical Parasitology* 198: 11–13.

Krauth-siegel, R Luise, and Marcelo A Comini. 2008. “Biochimica et Biophysica Acta Redox Control in Trypanosomatids, Parasitic Protozoa with Trypanothione-Based Thiol Metabolism” 1780: 1236–48.

Kroncke, K., K. Fehsel, And V. Kolb-Bachofen. 1998. “Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Diseases.” *Clin Exp Immunol* 113: 147–56.

Kumar, Narendra, Peilin Zhao, Alok Tomar, Charles A Galea, and Seema Khurana. 2004. “Association of Villin with Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate Regulates the Actin Cytoskeleton.” *The Journal Of Biological Chemistry* 279 (4): 3096–3110.

Kumar, Rajiv, and Susanne Nylén. 2012. “Immunobiology of Visceral Leishmaniasis.” *Frontiers in Immunology* 3 (August): 1–10.

Kushnir, Susanna, Klaus Gase, Reinhard Breitling, and Kirill Alexandrov. 2005. “Development of an Inducible Protein Expression System Based on the Protozoan Host *Leishmania tarentolae*.” *Protein Expression & Purification* 42: 37–46.

Laban, Avraham, James Finbarr Tobin, Maria A. Curotto De Lafaille, and Dyann F. Wirth. 1990. "Stable Expression of the Bacterial Neor Gene in *Leishmania enriettii*." *Nature* 343: 572–74.

Lachaud, Laurence, Nathalie Bourgeois, Nada Kuk, Christelle Morelle, Lucien Crobu, Gilles Merlin, Patrick Bastien, and Michel Page. 2013. "Constitutive Mosaic Aneuploidy Is a Unique Genetic Feature Widespread in the *Leishmania* Genus." *Microbes and Infection* 16 (1): 61–66.

Lainson & Shaw. 1972. "Leishmaniasis Of The New World: Taxonomic Problems." *Br Med Bull* 28 (1): 44–48.

Lainson & Shaw. 1973. "*Leishmania* And Leishmaniasis Of The New World, With Particular Reference To Brazil." *Pan American Health Organization*, no. June: 1–26.

Lainson, Ward, and Shaw. 1987. "Leishmania in Phlebotomid Sandflies: VI. Importance of Hindgut Development in Distinguishing between Parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* Complexes." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)* 199 (1135): 309–20.

Lander, Noelia, Miguel A Chiurillo, and Roberto Docampo. 2016. "Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists." *Eukariotic Microbiology* 63: 679–90.

Langford, C K, R J S Blrchmore, D T Hart, and W Wagner. 1994. "Biochemistry and Molecular Genetics of *Leishmania* Glucose Transporters." *Parasitology* 108 (1994): S73–78.

Lebowitz, Jonathan H, Hong Q Smith, Laura Rusche, and Stephen M Beverley. 1993. "Coupling of Poly (A) Site Selection and Trans-Splicing In *Leishmania*." *Genes and Development* 7: 996–1007.

Lei, Soi Meng, Amanda E. Ramer-Tait, Rebecca R. Dahlin-Laborde, Kathleen Mullin, and Jeffrey K. Beetham. 2010. "Reduced Hamster Usage And Stress In Propagating *Leishmania chagasi* Promastigotes Using Cryopreservation And Saphenous Vein Inoculation." *J. Parasitol* 96 (1): 103–8.

Lei, Soi Meng, Nathan M. Romine, and Jeffrey K. Beetham. 2010. "Population Changes In *Leishmania chagasi* Promastigote Developmental Stages Due To Serial Passage." *J. Parasitol* 96 (6): 1134–38.

Liew, F, Yun Li, David Moss, Clive Parkinson, and Mark V Rogers. 1991. "Resistance to *Leishmania major* Infection Correlates with the Induction of Nitric Oxide Synthase in Murine Macrophages." *Eur.J. Immunol* 21: 3009–14.

Lima-junior, Djalma S, Diego L Costa, Vanessa Carregaro, Larissa D Cunha, Alexandre L N Silva, Tiago W P Mineo, Fredy R S Gutierrez, et al. 2013. "Inflammasome-Derived IL-1 β Production Induces Nitric Oxide – Mediated Resistance to *Leishmania*." *Nature Medicine* 19 (June): 109–15.

Lipoldová, Marie, and Peter Demant. 2006. "Genetic Susceptibility to Infectious Disease : Lessons from Mouse Models of Leishmaniasis." *Nature* 7 (April): 294–305.

Liu, Beiyu, Yanan Liu, Shawn A Motyka, Eddy E C Agbo, and Paul T Englund. 2005. "Fellowship of the Rings : The Replication of Kinetoplast DNA." *TRENDS in Parasitology* 21 (8): 363–69.

Liu, Dong, Jude E Uzonna, and Jose A Bengoechea. 2012. "The Early Interaction of *Leishmania* with Macrophages and Dendritic Cells and Its Influence on the Host Immune Response." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2 (June): 1–8.

Loría-Cervera, Elsy Nalleli, and Fernando José ANDRADE-NARVÁEZ. 2014. "Animal Models For The Study Of Leishmaniasis Immunology." *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 56 (490): 1–11.

Lukes, Julius, D Lys Guilbride, Jan Votýpka, Alena Zíková, Rob Benne, Paul T Englund, Jan Voty, and Alena Zíkova. 2002. "Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure." *Eukaryotic Cell* 1 (4): 495–502.

Lye, Lon-fye, Katherine Owens, Huafang Shi, Silvano M F Murta, Ana Carolina Vieira, Salvatore J Turco, Christian Tschudi, Elisabetta Ullu, and Stephen M Beverley. 2010. "Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans." *PLoS Path.*

Machuca, Claudia, Adriana Rodríguez, Marymar Herrera, Sonia Silva, and Alicia Ponte-sucre. 2006. "Leishmania amazonensis: Metabolic Adaptations Induced by Resistance to an ABC Transporter Blocker." *Experimental Parasitology* 114 (2006): 1–9.

Madeira, Luciana, Katherine L Owens, Silvane M F Murta, and Stephen M Beverley. 2009. "Regulated Expression of the *Leishmania major* Surface Virulence Factor Lipophosphoglycan Using Conditionally Destabilized Fusion Proteins." *PNAS* 106 (18): 7583–88.

Magalhães P. A., Mayrink W., Da Costa C. A., Melo M. N., Dias M., Batista S. M., Michalick M. S. M., Williams P., 1980. Calazar Na Zona Do Rio Doce - Minas Gerais. Resultados De Medidas Profiláticas. *Rev. Inst. Med. trop.* 22(4):197-202.

Mahajan, Babita, Angamuthu Selvapandiyan, Noel J Gerald, Victoria Majam, Hong Zheng, Thilan Wickramarachchi, Jawahar Tiwari, et al. 2008. "Centrins , Cell Cycle Regulation Proteins in Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*." *The Journal Of Biological Chemistry* 283 (46): 31871–83.

MAPA/MS. 2016. "Nota Técnica N° 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa" 11 (923759): 19–20.

Maroli, Michele, Luigi Gradoni, Gaetano Oliva, Massimo Castagnaro, Alberto Crotti, George Lubas, Saverio Paltrinieri, Xavier Roura, Eric Zini, and Andrea Zatelli. 2010. "Guidelines for Prevention of Leishmaniasis in Dogs." *Vet Med Today: Reference Point* 236 (11): 1200–1206.

Marques, Filipe, Sílvia Vale-costa, Tânia Cruz, Joana Moreira Marques, Tânia Silva, João Vilares Neves, Sofia Cortes, et al. 2015. "Studies in the Mouse Model Identify Strain Variability as a Major Determinant of Disease Outcome in *Leishmania infantum* Infection." *Parasites & Vectors* 8 (644). Parasites & Vectors: 1–12.

Martinez-Calvillo, Santiago, Juan C Vizuet-de-rueda, Luis E Florencio-mart, Rebeca G Manning-cela, and Elisa E Figueroa-angulo. 2010. "Gene Expression in Trypanosomatid Parasites." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1–15.

Martinez-Calvillo, Santiago, Shaofeng Yan, Dan Nguyen, Mark Fox, Kenneth Stuart, Peter J Myler, and Nickerson Street. 2003. "Transcription of *Leishmania major* Friedlin Chromosome 1 Initiates in Both Directions within a Single Region." *Molecular Cell* 11: 1291–99.

Martiny, Andrea, J R Meyer-Fernades, W Souza, and M Vannier-Santos. 1999. "Altered Tyrosine Phosphorylation of ERK1 MAP Kinase and Other Macrophage Molecules Caused by *Leishmania Amastigotes*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 102 (1999): 1–12.

Mary, Charles, R I E Auriault, Bernard Fauge, Charles Mary, Alain J Desein, Mary E T Al, and I Nfect I Mmun. 1999. "Control of *Leishmania infantum* Infection Is Associated with CD8+ and Gamma Interferon- and Interleukin-5-Producing CD4+ Antigen-Specific T Cells." *Infection and Immunity* 67 (11): 5559–66.

Maspi, Nahid, Amir Abdoli, and Fathemeh Ghaffarifar. 2016. "Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines in Cutaneous Leishmaniasis: A Review." *Pathogens and Global Health* 10 (6): 247–60.

Mauël, Jacques. 1996. "Intracellular Survival of Protozoan Parasites with Special Reference to *Leishmania Spp* ., *Toxoplasma Gondii* and *Trypanosoma cruzi*." *Advances in Parasitology* 38: 1–35.

Mcconville, Malcolm J, David De Souza, Eleanor Saunders, Vladimir A Likic, and Thomas Naderer. 2007. "Living in a Phagolysosome; Metabolism of *Leishmania Amastigotes*" 23 (8): 8–10.

Meadows, John C, and Jonathan Millar. 2008. "Latrunculin A Delays Anaphase Onset in Fission Yeast by Disrupting an Ase1-Independent Pathway Controlling Mitotic Spindle Stability." *Molecular Biology of the Cell* 19 (September): 3713–23.

Melby, Peter C, Bysani Chandrasekar, Weigou Zhao, and John E Coe. 2001. "The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response." *J Immunol*, no. 166: 1912–20.

Melby, Peter C, Gary B Ogden, Hector A Flores, Weiguo Zhao, Christopher

Geldmacher, Natalie M Biediger, Sunil K Ahuja, Jose Uranga, and Maria Melendez. 2000. "Identification of Vaccine Candidates for Experimental Visceral Leishmaniasis by Immunization with Sequential Fractions of a cDNA Expression Library." *Infection and Immunity* 68 (10): 5595–5602.

Melby, Peter C, Adriana Tabares, Blanca I Restrepo, Astrid E Cardona, H Stan Mcguff, and Judy M Teale. 2001. "*Leishmania donovani*: Evolution and Architecture of the Splenic Cellular Immune Response Related to Control of Infection." *Experimental Parasitology* 25: 17–25.

Ministério da Saúde. 2013. *Manual de Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 1ª edição. Brasília – DF.

Ministério da Saúde. 2014. *Manual de Vigilância E Controle Da Leishmaniose Visceral. Manual de Vigilância E Controle Da Leishmaniose Visceral*. 1ª edição. Brasília – DF.

Ministério da Saúde. 2016. "Lista Nacional de Notificação Compulsória," no. 17 DE FEVEREIRO DE 2016.

Minocha, Neha. 2011. "Eukaryotic Microbiology." *J. Eukaryot. Microbiol.* 58 (3): 249–53.

Mitchell GF, Handman E, Spithill TW, 1984. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. *Aust J Exp Biol Med Sci.*, 62(Pt 2):145–53.

Mizbani, Amir, Tahereh Taheri, Farnaz Zahedifard, Yasaman Taslimi, and Hiva Azizi. 2010. "Recombinant *Leishmania tarentolae* Expressing the A2 Virulence Gene as a Novel Candidate Vaccine against Visceral Leishmaniasis." *Vaccine* 28: 53–62.

Mizbani, Amir, Yasaman Taslimi, and Farnaz Zahedifard. 2011. "Effect of A2 Gene on Infectivity of the Nonpathogenic Parasite *Leishmania tarentolae*." *Parasitol Res* 109: 793–99.

Mookerjee, Ananda, Parimal C Sen, and Asoke C Ghose. 2003. "Immunosuppression in Hamsters with Progressive Visceral Leishmaniasis Is

Associated with an Impairment of Protein Kinase C Activity in Their Lymphocytes That Can Be Partially Reversed by Okadaic Acid or Anti-Transforming Growth Factor Antibody.” *Infection and Immunity* 71 (5): 2439–46.

Moreira, Diana, Nuno Santarém, Inês Loureiro, Joana Tavares, Ana Marta Silva, Ana Mariana Amorim, Ouaisi Ali, Anabela Cordeiro-da-Silva, and Ricardo Silveirte. 2012. “Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence.” *PLoS Negl Trop Dis* 6 (1): e1469. d

Moura, Tatiana R De, Fernanda O Novais, Fabiano Oliveira, Jorge Clare, Aldina Barral, Claudia Brodskyn, and Camila I De Oliveira. 2005. “Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*.” *Infection and Immunity* 73 (9): 5827–34.

Mukherjee, Angana, Gaétan Roy, Chantal Guimond, and Marc Ouellette. 2009. “The G -Glutamylcysteine Synthetase Gene of *Leishmania* Is Essential and Involved in Response to Oxidants.” *Molecular Microbiology* 74 (October): 914–27.

Mukherjee, Piyali, Asish K Ghosh, and Asoke C Ghose. 2003. “Infection Pattern and Immune Response in the Spleen and Liver of BALB/c Mice Intracardially Infected with *Leishmania donovani* Amastigotes.” *Immunology Letters* 86: 131–38.

Mullen, A B, and A J Baillie. 1998. “Visceral Leishmaniasis in the BALB / c Mouse : A Comparison of the Efficacy of a Nonionic Surfactant Formulation of Sodium Stibogluconate with Those of Three Proprietary Formulations of Amphotericin B.” *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 42 (10): 2722–25.

Murray, Henry W, Jonathan D Berman, Clive R Davies, and Nancy G Saravia. 2005. “Advances in Leishmaniasis.” *The Lancet* 366: 1561–77.

Murray, Henry W, John J Stern, Karl Welte, Susan M Carriero, F Carl Rubin, and C F Nathan. 1987. “Experimental Visceral Leishmaniasis : Production of Interleukin 2 and Interferon-Gamma , Tissue Immune Reaction , and Response to Treatment with Interleukin 2 and Interferon-Gamma . Information about Subscribing to The Journal of Immunology Is Online at :” *The Journal of Immunology* 138: 2290–97.

- Murta, Silvane M F, Tim J Vickers, David A Scott, and Stephen M Beverley. 2009. "Methylene Tetrahydrofolate Dehydrogenase/cyclohydrolase and the Synthesis of 10-CHO-THF Are Essential in *Leishmania major*." *Mol Microbiol.* 71 (6): 1386–1401.
- Mutiso, Joshua M, John C Macharia, and Michael M Gicheru. 2010. "A Review of Adjuvants for Vaccine Candidates." *Journal of Biomedical Research* 24 (1): 16–25.
- Myler, Peter, Lindsey Audleman, Theo Devos, Greg Hixson, Patti Kiser, Craig Lemley, Charles Magness, Et Al. 1999. "*Leishmania major* Friedlin Chromosome 1 Has An Unusual Distribution Of Protein-Coding Genes." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (March): 2902–6.
- Naderer, Thomas, and Malcolm J Mcconville. 2008. "Microreview The *Leishmania* – Macrophage Interaction : A Metabolic Perspective" 10 (December 2007): 301–8.
- Naderer, T. & Mcconville, M.J.. 2011. "Intracellular Growth and Pathogenesis of *Leishmania* Parasites." *Essays Biochem.* 51: 81–95.
- Nadim, A, E Javadian, and M Mohebbali. 1997. "The Experience of Leishmanization in the Islamic Republic of Iran." *La Revue de Santé de La Méditerranée Orientale* 3 (2): 284–89.
- Nadim, A, E Javadian, A M I Ni, and M D Pezechki. 1988. "Control of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis by Mass Leishmanization in Hyperendemic Area of Isfahan." *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran* 2 (2): 4–5.
- Nagill, Rajeev, and Sukhbir Kaur. 2011. "Vaccine Candidates for Leishmaniasis: A Review." *International Immunopharmacology* 11 (10). Elsevier B.V.: 1464–88.
- Nathan, Carl F, and John B Hibbs. 1991. "Role of Nitric Oxide Synthesis in Macrophage Antimicrobial Activity." *Curr Opin Immunol.* 3 (1): 65–70.
- Northrops, Jennifer, Annemarie Weber, S Moosekern, Clara Franzini-armstrong, Marilyn F Bishop, George R Dubyak, Marianne Tucker, and Terrence P Walsh. 1986. "Different Calcium Dependence of the Capping and Cutting Activities of Villin." *The Journal Of Biological Chemistry* 261 (20): 9274–

81.

Nylén & Eidsmo. 2012. "Tissue Damage and Immunity in Cutaneous Leishmaniasis." *Parasite Immunology*, no. dDC: 551–61.

Nylén & Sacks. 2007. "Interleukin-10 and the Pathogenesis of Human Visceral Leishmaniasis." *TRENDS in Immunology* 28 (9): 18–21.

Oliveira, Fabiano, Edgar Rowton, Hamide Aslan, Regis Gomes, Philip A Castrovinci, Patricia H Alvarenga, Maha Abdeladhim, et al. 2015. "A Sand Fly Salivary Protein Vaccine Shows Efficacy against Vector-Transmitted Cutaneous Leishmaniasis in Nonhuman Primates." *Science* 7 (290): 1–12.

Olivier, Martin, Vanessa Diniz Atayde, Amandine Isnard, Kasra Hassani, and Marina Tiemi Shio. 2012. "Leishmania Virulence Factors: Focus on the Metalloprotease GP63." *Microbes and Infection* 14 (15). Elsevier Masson SAS: 1377–89.

Otranto, Domenico, and Filipe Dantas-torres. 2013. "The Prevention of Canine Leishmaniasis and Its Impact on Public Health." *Trends in Parasitology* 29 (7). Elsevier Ltd: 339–45.

Pages, Michel, Patrick Bastien, Francisco Vca, Valrie Rossi Michel Bellis, Patrick Wincker, Jean-antoine Rioux, and Grard Roizes. 1989. "Chromosome Size and Number Polymorphisms in *Leishmania infantum* Suggest Amplification/deletion and Possible Genetic Exchange." *Molecular & Biochemical Parasitology* 36 (1989): 161–68.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O, 2001. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*;65(5):510-7.

Panton, Lindsey J, Robert B Tesh, Kafu C Nadeau, and Stephen M Beverley. 1991. "A Test for Genetic Exchange in Mixed Infections of *Leishmania major* in the Sand Fly *Phlebotomus Papatasi*." *J. Protozool.* 38 (3): 122–26.

Papadopoulou, Barbara, Gaetan Roy, and Marc Ouellette. 1991. "A Novel Antifolate Resistance Circle of *Leishmania* the Amplified H." *The EMBO*

JournalEMBO 1 (1): 3601–8.

Peacock, Christopher S, Kathy Seeger, David Harris, Lee Murphy, Jeronimo C Ruiz, Michael A Quail, Nick Peters, et al. 2007. “Comparative Genomic Analysis of Three *Leishmania* Species That Cause Diverse Human Disease.” *Nature Genetics* 39 (7): 839–47.

Peters, Nathan C, Jackson G Egen, Nagila Secundino, Alain Debrabant, Shaden Kamhawi, Phillip Lawyer, Michael P Fay, Ronald N Germain, and David Sacks. 2008. “In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies.” *Science* 321 (5891): 970–74.

Pinto-da-Silva, Lucia H, Marcelle Camurate, Karina A Costa, Sandra M P Oliveira, Narcisa L Cunha-e-silva, and Elvira M B Saraiva. 2002. “*Leishmania (Viannia) braziliensis* Metacyclic Promastigotes Purified Using Bauhinia Purpurea Lectin Are Complement Resistant and Highly Infective for Macrophages in Vitro and Hamsters in Vivo.” *International Journal for Parasitology* 32: 1371–77.

Podinovskaia, Maria, and Albert Descoteaux. 2015. “*Leishmania* and the Macrophage: A Multifaceted Interaction.” *Future Microbiology* 10 (1): 111–29.

Prianti, M G, M Yokoo, H Goto, and Faculdade De Medicina. 2007. “Infected Mice as a Model for the Study of Glomerular Lesions in Visceral Leishmaniasis.” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 819–23.

Puentes, S. M., Dwyer, D. M., Bates, P. A., and Joiner, K. A., 1989. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 143, 3743–3749.

Quinnell, R J, and O Courtenay. 2009. “Transmission , Reservoir Hosts and Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis.” *Parasitology* 136: 1915–34.

Rafati, Sima, Farnaz Zahedifard, and Fereshteh Nazgouee. 2006. “Prime-Boost Vaccination Using Cysteine Proteinases Type I and II of *Leishmania infantum* Confers Protective Immunity in Murine Visceral Leishmaniasis.” *Vaccine* 24: 2169–75.

Raman, Vanitha S, Malcolm S Duthie, Christopher B Fox, Greg Matlashewski,

and Steven G Reed. 2012. "Adjuvants for *Leishmania* Vaccines : From Models to Clinical Application." *Frontiers in Immunology* 3 (June): 1–15.

Ramirez, Laura, Laura Corvo, Mariana C Duarte, Miguel A Chávez-fumagalli, Diogo G Valadares, Diego M Santos, Camila I De Oliveira, et al. 2014. "Cross-Protective Effect of a Combined L5 plus L3 *Leishmania major* Ribosomal Protein Based Vaccine Combined with a Th1 Adjuvant in Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniasis." *Parasites & Vectors* 7 (3): 1–11.

Real, Fernando, Pilar Tavares, Veras Florentino, Luiza Campos Reis, Eduardo M Ramos-sanchez, Patricia Sampaio, Tavares Veras, et al. 2014. "Cell-to-Cell Transfer of *Leishmania amazonensis* Amastigotes Is Mediated by Immunomodulatory LAMP-Rich Parasitophorous Extrusions." *Cellular Microbiology* 16 (June): 1549–64.

Reithinger, Richard, Jean-claude Dujardin, Hechmi Louzir, Claude Pirmez, Bruce Alexander, Simon Brooker, George Washington, and Prince Leopold. 2007. "Cutaneous Leishmaniasis." *The Lancet* 7 (September): 581–96.

Ribeiro-Gomes, Flavia L., Nathan C. Peters, Alain Debrabant, and David L. Sacks. 2012. "Efficient Capture of Infected Neutrophils by Dendritic Cells in the Skin Inhibits the Early Anti-*Leishmania* Response." *PLoS Pathogens* 8 (2).

Ribeiro, Jose M C, Andre Vachereau, Govind B Modi, and Robert B Tesh. 1988. "A Novel Vasodilatory Peptide from the Salivary Glands of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*." *Science* 243 (1965): 1985–87.

Ribeiro, M C, and Ivo M B Francischetti. 2003. "Role Of Arthropod Saliva In Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives." *Annu. Rev. Entomol.* 43: 73–88.

Richard, Dave, Philippe Leprohon, Jolyne Drummelsmith, and Marc Ouellette. 2004. "Growth Phase Regulation of the Main Folate Transporter of *Leishmania infantum* and Its Role in Methotrexate Resistance." *The Journal Of Biological Chemistry* 279 (52): 54494–501.

Rittig, M G, and C Bogdan. 2000. "*Leishmania* – Host-Cell Interaction : Complexities and Alternative Views." *Parasitology Today* 16 (7): 292–97.

Rivier D, Shah R, Bovay P, Mauel J., 1993. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunol.*, 15:75–84.

Roberts, Sigrid C. 2011. “The Genetic Toolbox for *Leishmania* Parasites.” *Bioengineered Bugs* 2 (6): 320–26.

Robinson, Kelly A, and Stephen M Beverley. 2003. “Improvements in Transfection Efficiency and Tests of RNA Interference (RNAi) Approaches in the Protozoan Parasite *Leishmania*.” *Molecular & Biochemical Parasitology* 128: 217–28.

Rochael, Natalia C, Anderson B Guimarães-costa, Michelle T C Nascimento, Thiago S Desouza-vieira, Matheus P Oliveira, Luiz F Garcia, and Marcus F Oliveira. 2015. “Classical ROS-Dependent and Early / Rapid ROS-Independent Release of Neutrophil Extracellular Traps Triggered by *Leishmania* Parasites.” *Nature Publishing Group* 5 (18302). Nature Publishing Group: 1–11.

Rodrigues, Vasco, Anabela Cordeiro-da-silva, Mireille Laforge, Ricardo Silvestre, and Jérôme Estaquier. 2016. “Regulation of Immunity during Visceral *Leishmania* Infection.” *Parasites & Vectors* 9 (118). Parasites & Vectors: 1–13.

Rodriguez-contreras, Dayana, XiuHong Feng, Kristie M Keeney, H G Archie, and Scott M Landfear. 2007. “Phenotypic Characterization of a Glucose Transporter Null Mutant in *Leishmania mexicana*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 153 (1): 9–18.

Rogers, Matthew B, James D Hilley, Nicholas J Dickens, Jon Wilkes, Paul a Bates, Daniel P Depledge, David Harris, et al. 2011. “Chromosome and Gene Copy Number Variation Allow Major Structural Change between Species and Strains of *Leishmania*.” *Genome Res.* 21: 2129–42.

Romano, Audrey, Ehud Inbar, Alain Debrabant, Melanie Charmoy, Phillip Lawyer, and Flavia Ribeiro-gomes. 2014. “Cross-Species Genetic Exchange between Visceral and Cutaneous Strains of *Leishmania* in the Sand Fly Vector.” *PNAS* 111 (47).

Rostami, Mahmoud Nateghi, Hossein Keshavarz, Rosita Edalat, Abdolfattah

- Sarrafnjad, Fereidoun Mahboudi, and Ali Khamesipour. 2010. "CD8 + T Cells as a Source of IFN- γ Production in Human Cutaneous Leishmaniasis." *PLoS Negl Trop Dis* 4 (10): e845.
- Rougeron, V, T De Meeûs, and A Bañuls. 2016. "Reproduction in *Leishmania*: A Focus on Genetic Exchange." *Infection, Genetics and Evolution* In Press. Elsevier B.V.: 5–9.
- Ryan, Kathleen A, Levi A Garraway, Albert Descoteaux, Salvatore J Turcot, and Stephen M Beverley. 1993. "Isolation of Virulence Genes Directing Surface Glycosyl- Phosphatidylinositol Synthesis by Functional Complementation of *Leishmania*." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (September): 8609–13.
- Sacks, David L., and Peter V. Perkins. 1984. "Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes." *Science* 223 (4643): 1417–19.
- Sacks, David, and Nancy Noben-trauth. 2002. "The Immunology Of Susceptibility And Resistance To *Leishmania* Major In Mice." *Nature* 2 (November): 845–58.
- Sadhukhan, Pranab K, Asit K Chakraborty, Arindam Dasgupta, and Hemanta K Majumder. 1997. "Chromatographic Separation of DNA Dependent RNA Polymerases and Molecular Properties of RNA Polymerase II from a *Leishmania* Spp." *Molecular and Cellular Biochemistry* 171 (1997): 105–14.
- Saljoughian, Noushin, Tahareh Taheri, and Sima Rafati. 2014. "Live Vaccination Tactics: Possible Approaches for Controlling Visceral Leishmaniasis." *Frontiers in Immunology* 5 (March): 1–11.
- Saljoughian, Noushin, Tahereh Taheri, Farnaz Zahedifard, Yasaman Taslimi, and Fatemeh Doustdari. 2013. "Development of Novel Prime-Boost Strategies Based on a Tri-Gene Fusion Recombinant *L. tarentolae* Vaccine against Experimental Murine Visceral Leishmaniasis." *PLoS Negl Trop Dis* 7 (4): 1–15.
- Sanchez, Marco A., Khoa D. Tran, Jessica Valli, Sam Hobbs, Errin Johnson, Eva Gluenz, and Scott M. Landfear. 2016. "KHARON Is an Essential Cytoskeletal Protein Involved in the Trafficking of Flagellar Membrane Proteins and Cell Division in African Trypanosomes. - PubMed - NCBI." *J Biol Chem.* 291 (38): 19760–73.

Saporito, Laura, Giovanni M Giammanco, Simona De Grazia, and Claudia Colomba. 2013. "International Journal of Infectious Diseases Visceral Leishmaniasis: Host – Parasite Interactions and Clinical Presentation in the Immunocompetent and in the Immunocompromised Host." *International Journal of Infectious Diseases* 17 (8). International Society for Infectious Diseases: e572–76.

Sauer, Brian. 1987. "Functional Expression of the Cre-Lox Site-Specific Recombination System in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 7 (6): 2087–96.

Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C., 1992. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol*;75(2):196-206.

Scott, B Y Phillip, Patricia Natovitz, Robert L Coffman, Edward Pearce, and Alan Sher. 1988. "Immunoregulation Of Cutaneous Leishmaniasis." *J. Exp. Med* 168 (November): 1675–84.

Scott, Phillip, and Jay P Farrell. 1998. "Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells Following Infection of Mice with *Leishmania major*." *Chem Immunol* 70: 60–80.

Scott & Novais. 2016. "Cutaneous Leishmaniasis: Immune Responses in Protection and Pathogenesis." *Nature Publishing Group* 16 (9). Nature Publishing Group: 581–92.

Seccombe AK, Ready PD, Huddleston LM. A catalogue of Old World Phlebotomine sandflies (Dip- tera: Psychodidae). *Occas Pap Syst Entomol.* 1993; 8: 1–57.

Selvapandiyan, Angamuthu, Alain Debrabant, Robert Duncan, Jacqueline Muller, Poonam Salotra, Gannavaram Sreenivas, Jeffrey L Salisbury, and Hira L Nakhasi. 2004. "Centrin Gene Disruption Impairs Stage-Specific Basal Body Duplication and Cell Cycle Progression in *Leishmania*." *The Journal Of Biological Chemistry* 279 (24): 25703–10.

Selvapandiyan, Angamuthu, Ranadhir Dey, Sreenivas Gannavaram, Ines Lakhhal-naouar, Robert Duncan, Poonam Salotra, and Hira L Nakhasi. 2012.

“Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites.” *Journal of Tropical Medicine* 2012 (631460): 1687–9686.

Selvapandiyan, Angamuthu, Ranadhir Dey, Sreenivas Gannavaram, Sumit Solanki, Poonam Salotra, and Hira L Nakhasi. 2014. “Generation of Growth Arrested *Leishmania* Amastigotes: A Tool to Develop Live Attenuated Vaccine Candidates against Visceral Leishmaniasis.” *Vaccine* 32 (31). Elsevier Ltd: 3895–3901.

Selvapandiyan, Angamuthu, Ranadhir Dey, Susanne Nylen, Robert Duncan, David Sacks, Hira L Nakhasi, Angamuthu Selvapandiyan, et al. 2009. “Intracellular Replication-Deficient *Leishmania donovani* Induces Long Lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis.” *The Journal of Immunology* 183: 1813–20.

Selvapandiyan, Angamuthu, Robert Duncan, Alain Debrabant, Sylvie Bertholet, Gannavaram Sreenivas, Narender S Negi, Poonam Salotra, and Hira L Nakhasi. 2001. “Expression of a Mutant Form of *Leishmania donovani* Centrin Reduces the Growth of the Parasite.” *The Journal Of Biological Chemistry* 276 (46): 43253–61.

Selvapandiyan, Angamuthu, Praveen Kumar, James C Morris, Jeffrey L Salisbury, Ching C Wang, and Hira L Nakhasi. 2007. “Centrin1 Is Required for Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*.” *Molecular Biology of the Cell* 18 (September): 3290–3301.

Shahbazi, Mehdi, Farnaz Zahedifard, Tahereh Taheri, and Yasaman Taslimi. 2015. “Evaluation of Live Recombinant Nonpathogenic *Leishmania tarentolae* Expressing Cysteine Proteinase and A2 Genes as a Candidate Vaccine against Experimental Canine Visceral Leishmaniasis.” *PLoS ONE* 10 (7): 1–22.

Shaw, J. J., R. R. Braga, R. Lainson, and E. A Y Ishikawa. 1991. “Aconitate Hydratase (ACON), an Enzyme That Distinguishes *Leishmania* of the Subgenus *Viannia* from Other Trypanosomatids.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85 (5): 597–98.

Silvestre, Ricardo, Anabela Cordeiro-da-silva, Baptiste Vergnes, Denis Sereno, Ali Ouaiissi, Denis Sereno, and Ali Ouaiissi. 2007. “SIR2-Deficient *Leishmania*

infantum Induces a Defined IFN- γ /IL-10 Pattern That Correlates with Protection.” *The Journal of Immunology* 179 (3): 3161–70.

Silvestre, Ricardo, Anabela Cordeiro, and Ali Ouaisi. 2008. “Live Attenuated *Leishmania* Vaccines: A Potential Strategic Alternative.” *Arch. Immunol. Ther. Exp* 56: 123–26.

Simpson, Larry. 1964. “Effect Of Acriflavin On The Kinetoplast Of *Leishmania tarentolae*.” *The Journal of Cell Biology* 37: 660–82.

Singh, Bhawana, and Shyam Sundar. 2012. “Leishmaniasis: Vaccine Candidates and Perspectives.” *Vaccine* 30 (26). Elsevier Ltd: 3834–42.

Soares, Milena B P, Richard G Titus, Charles B Shoemaker, John R David, Marcelo Bozza, and Marcelo Bozza. 1998. “The Vasoactive Peptide Maxadilan from Sand Fly Saliva Inhibits TNF- α and Induces IL-6 by Mouse Macrophages Through Interaction with the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Receptor.” *The Journal of Immunology* 160: 1811–16.

Solano-gallego, L, A Koutinas, G Miro, L Cardoso, M G Pennisi, L Ferrer, P Bourdeau, G Oliva, and G Baneth. 2009. “Veterinary Parasitology Directions for the Diagnosis, Clinical Staging, Treatment and Prevention of Canine Leishmaniosis.” *Veterinary Parasitology* 165: 1–18.

Sollelis, Lauriane, Mehdi Ghorbal, Cameron Ross Macpherson, Rafael Miyazawa Martins, Nada Kuk, Lucien Crobu, Patrick Bastien, Artur Scherf, and Yvon Sterkers. 2015. “Breaking R Eport First Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania* Parasites.” *Cellular Microbiology* 17 (June): 1405–12.

Souza, Miriam C De, Mariana Silva, Leopoldo Marques, Angela Vieira, Daniel Doro, Daniel Avelar, Ana Maria, et al. 2014. “Antibody Responses Induced by Leish-Tec®, an A2-Based Vaccine for Visceral Leishmaniasis, in a Heterogeneous Canine Population.” *Veterinary Parasitology* 204 (3–4). Elsevier B.V.: 169–76.

Späth, Gerald F, and Stephen M Beverley. 2001. “A Lipophosphoglycan-Independent Method for Isolation of Infective *Leishmania* Metacyclic Promastigotes by Density Gradient Centrifugation.” *Experimental Parasitology*

103: 97–103.

Späth, Gerald F, and Joachim Clos. 2016. "Joining Forces : First Application of a Rapamycin-Induced Dimerizable CRE System (DiCre) for Conditional Null Mutant Analysis in *Leishmania*." *Molecular Microbiology* 100 (6): 923–927.

Spector, I, NR Shochet, Y Kashman, and A. Groweiss. 1983. "Latrunculins: Novel Marine Toxins That Disrupt Microfilament Organization in Cultured Cells." *Science* 5932 (February): 493–95.

Spörri, Roman, and Caetano Reis. 2005. "Inflammatory Mediators Are Insufficient for Full Dendritic Cell Activation and Promote Expansion of CD4 + T Cell Populations Lacking Helper Function." *Nature Immunology* 6 (2): 163–70.

Srivastava, Saumya, Prem Shankar, Jyotsna Mishra, and Sarman Singh. 2016. "Possibilities and Challenges for Developing a Successful Vaccine for Leishmaniasis." *Parasites & Vectors* 9 (277). Parasites & Vectors: 1–15.

Stäger, Simona, Deborah F Smith, Paul M Kaye, Simona Sta, Deborah F Smith, and Paul M Kaye. 2000. "Immunization with a Recombinant Stage-Regulated Surface Protein from *Leishmania donovani* Induces Protection Against Visceral Leishmaniasis." *J Immunol* 165: 7064–71.

Stamler, Jonathan S. 1994. "Redox Signaling : Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric Oxide." *Cell* 78 (September): 931–36.

Stanley, Amanda C, and Christian R Engwerda. 2007. "Balancing Immunity and Pathology in Visceral Leishmaniasis," 138–47.

Sterkers, Yvon, Laurence Lachaud, Nathalie Bourgeois, Lucien Crobu, Patrick Bastien, and Michel Pagès. 2012. "Novel Insights into Genome Plasticity in Eukaryotes : Mosaic Aneuploidy in *Leishmania* Micro Review Novel Insights into Genome Plasticity in Eukaryotes : Mosaic Aneuploidy in *Leishmania*." *Molecular Microbiology* 86 (1): 14–23.

Sterkers, Yvon, Laurence Lachaud, Lucien Crobu, Patrick Bastien, and Michel Pagès. 2011. "FISH Analysis Reveals Aneuploidy and Continual Generation of Chromosomal Mosaicism in *Leishmania major*." *Celular Microbiology* 13 (October 2010): 274–83.

Stockdale, Lisa, and Robert Newton. 2013. "A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (6): 1–16.

Streit, Judy A, Thomas J Recker, Frederico Gueiros Filho, Stephen M Beverley, Mary E Wilson, and Mary E Wilson. 2001. "Protective Immunity Against the Protozoan *Leishmania chagasi* Is Induced by Subclinical Cutaneous Infection with Virulent But Not Avirulent Organisms." *The Journal of Immunology* 166: 1921–29.

Sundar, Shyam, and Neena Goyal. 2007. "Molecular Mechanisms of Antimony Resistance in *Leishmania*." *Journal of Medical Microbiology* 58 (2007): 143–53.

Sundar, Shyam, and Anup Singh. 2016. "Recent Developments and Future Prospects in the Treatment of Visceral Leishmaniasis." *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 3 (3–4): 98–109.

Sypek, By Joseph P, Charles L Chung, Sharon E H Mayor, Janaki M Subramanyam, Samuel J Goldman, Derek S Sieburth, Stanley F Wolf, and Robert G Schaub. 1993. "Resolution of Cutaneous Leishmaniasis: Interleukin 12 Initiates a Protective T Helper Type 1 Immune Response." *The Journal of Experimental Medicine* 177 (June): 8–13.

Tamma, T V Satish, Amogh A Sahasrabudhe, Virendra K Bajpai, and Chhitar M Gupta. 2010. "ADF/cofilin-Driven Actin Dynamics in Early Events of *Leishmania* Cell Division." *Journal of Cell Science* 123: 1894–1901.

Tewary, Poonam, Manju Jain, Mayurbhai H Sahani, Shailendra Saxena, and Rentala Madhubala. 2005. "A Heterologous Prime-Boost Vaccination Regimen Using ORFF DNA and Recombinant ORFF Protein Confers Protective Immunity against Experimental Visceral Leishmaniasis." *The Journal of Infectious Diseases* 191: 0–7.

Theodos & Titus. 1993. "Salivary Gland Material from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Has an Inhibitory Effect on Macrophage Function in Vitro." *Parasite Immunology* 15: 481–87.

Titus, Richard G, M Marchand, T Boon, and J Louis. 1985. "A Limiting Dilution Assay for Quantifying *Leishmania major* in Tissues of Infected Mice." *Parasite*

Immunology 7: 545–55.

Tournier, Sylvie, Yannick Gachet, Vicky Buck, Jeremy S Hyams, and Jonathan B A Millar. 2004. “Disruption of Astral Microtubule Contact with the Cell Cortex Activates a Bub1 , Bub3 , and Mad3- Dependent Checkpoint in Fission Yeast .” *Molecular Biology of the Cell* 15 (July): 3345–56.

Tran, Khoa D., Dayana Rodriguez-Contreras, Danielle P. Vieira, Phillip A. Yates, Larry David, Wandy Beatty, Johannes Elferich, and Scott M. Landfear. 2013. “KHARON1 Mediates Flagellar Targeting of a Glucose Transporter in *Leishmania mexicana* and Is Critical for Viability of Infectious Intracellular Amastigotes.” *Journal of Biological Chemistry* 288 (31): 22721–33.

Tran, Khoa D., Danielle P. Vieira, Marco A. Sanchez, Jessica Valli, Eva Gluenz, and Scott M. Landfear. 2015. “Kharon1 Null Mutants of *Leishmania mexicana* Are Avirulent in Mice and Exhibit a Cytokinesis Defect within Macrophages.” *PLoS ONE* 10 (8): 1–19.

Turco, S. J., and Descoteaux, A., 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 65–94.

Uenoa, Norikiyo, and Mary E. Wilson. 2013. “Receptor-Mediated Phagocytosis of *Leishmania*: Implications for Intracellular Survival.” *Trends in Parasitology* 28 (8): 335–44.

Ullu, Elisabetta, Christian Tschudi, and Tirtha Chakraborty. 2004. “RNA Interference in Protozoan Parasites Microreview RNA Interference in Protozoan Parasites.” *Cellular Microbiology* 6 (6): 509–19.

Uzcategui, Nestor Luis, Katherine Figarella, Natacha Camacho, and Alicia Ponte-sucre. 2005. “Substrate Preferences and Glucose Uptake in Glibenclamide-Resistant *Leishmania* Parasites.” *Comparative Biochemistry and Physiology* 140: 395–402.

Uzonna, Jude E., Gerald F. Spath, Stephen M. Beverley, and Phillip Scott. 2004. “Vaccination with Phosphoglycan-Deficient *Leishmania major* Protects Highly Susceptible Mice from Virulent Challenge without Inducing a Strong Th1 Response 1.” *The Journal of Immunology* 172 (6): 3793–97.

van Zandbergen, Ger, Matthias Klinger, Antje Mueller, Andreas Gebert, and Werner Solbach. 2004. "Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages." *The Journal of Immunology*, no. 173: 6521–25.

Wakil, By Adil E, Zhi-en Wang, James C Ryan, Deborah J Fowell, and Richard M Locksley. 1998. "Interferon-Gamma Derived from CD4 + T Cells Is Sufficient to Mediate T Helper Cell Type 1 Development." *J Exp Med* 188 (9): 1651–56.

Wei, Xiao-Qing, Ian G. Charles, Austin Smith, Jan Ure, Gui-Jie Feng, Fang-Ping Huang, Damo Xu, Werner Mullers, And Fool Y. Liew. 1995. "Altered Immune Responses in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase." *Nature* 375: 408–11.

Wheeler, Richard J, Eva Gluenz, and Keith Gull. 2011. "The Cell Cycle of *Leishmania*: Morphogenetic Events and Their Implications for Parasite Biology." *Molecular Microbiology* 79 (3): 647–62.

World Health Organization. 2012. "Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis." *World Health Organization Technical Report Series*, no. 975: v–xii, 1-100.

World Health Organization. 2010. "Control of the Leishmaniases." *World Health Organization Technical Report Series*, no. 949: 1–107.

World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, 2016. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. Weekly epidemiological record. No. 22, 2016, 91, 285–296. Disponível em http://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_wer9122/en/

Yan, Shaofeng, Santiago Martinez-calvillo, Achim Schnauffer, and Susan Sunkin. 2002. "A Low-Background Inducible Promoter System in *Leishmania donovani*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 119 (2002): 217–23.

Yan, Shaofeng, Peter J Myler, and Kenneth Stuart. 2001. "Tetracycline Regulated Gene Expression in *Leishmania donovani*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 112: 61–69.

Yao, Chaoqun, Jiwen Luo, Chia-hung Christine Hsiao, John E Donelson, and Mary E Wilson. 2008. "*Leishmania chagasi*: A Tetracycline-Inducible Cell Line Driven by T7 RNA Polymerase." *Experimental Parasitology* 116 (3): 205–13.

Yarmola, Elena G, Thayumanasamy Somasundaram, and Todd A Boring. 2000. "Actin-Latrunculin A Structure and Function: Differential Modulation of Actin-Binding Protein Function by Latrunculin A Department of Medicine , University of Florida , Gainesville , FL 32610 , 1 Institute of Molecular Biophysics , Florida State Universit." *The Journal Of Biological Chemistry* 275 (36): 28120–27.

Yazdanpanab, M, S Noorbakhsh, M Kalantari, M Maleki, and B Kiafar. 2006. "Dermatofibrosarcoma Protuberans Occurring in the Site of Prior Leishmanization." *Nternational Journal of Dermatology* 45: 1476–77.

Zahedifard, Farnaz, Elham Gholami, Tahereh Taheri, Yasaman Taslimi, Fatemeh Doustdari, Jesus G Valenzuela, and Sima Rafati. 2014. "Enhanced Protective Efficacy of Nonpathogenic Recombinant *Leishmania tarentolae* Expressing Cysteine Proteinases Combined with a Sand Fly Salivary Antigen." *PLoS Negl Trop Dis* 8 (3): e2751.

Zanin, Francisca H C, Eduardo A F Coelho, Carlos A P Tavares, Eduardo A Marques-da-silva, Miriam Maria, Silva Costa, Simone A Rezende, Ricardo T Gazzinelli, and Ana Paula. 2007. "Evaluation of Immune Responses and Protection Induced by A2 and Nucleoside Hydrolase (NH) DNA Vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* Experimental Infections." *Microbes and Infection* 9: 1070–77.

Zaph, Colby, Jude Uzonna, Stephen M Beverley, and Phillip Scott. 2004. "Central Memory T Cells Mediate Long-Term Immunity to *Leishmania major* in the Absence of Persistent Parasites." *Nature Medicine* 10 (10):

Zhai, Liwei, Peilin Zhao, Alfredo Panebra, Anthony L Guerrero, and Seema Khurana. 2001. "Tyrosine Phosphorylation of Villin Regulates the Organization of the Actin Cytoskeleton." *The Journal Of Biological Chemistry* 276 (39): 36163–67.

Zhang, Wen-Wei, Patrick Lypaczewski, and Greg Matlashewski. 2017. "Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for *Leishmania* and Its Use To

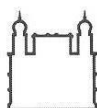
Target a Multigene Family, Induce Chromosomal Translocation, and Study DNA Break Repair Mechanisms.” *American Society for Microbiology* 2 (1): e00340-16.

Zhang, Wen-wei, and Greg Matlashewski. 2015. “CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania donovani*.” *mBio* 6 (4): 1–14.

Zijlstra, E. E., A. M. El-Hassan, A. Ismael, and H. W. Ghalib. 1994. “Endemic Kala-Azar in Eastern Sudan: A Longitudinal Study on the Incidence of Clinical and Subclinical Infection and Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51 (6): 826–36.

ANEXOS

ANEXO I



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-28/14

Certificamos que o protocolo (P-60/13-3), intitulado "Identificação de novos candidatos para drogas e vacinas contra Leishmanioses", sob a responsabilidade de SILVANE MARIA FONSECA MURTA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/05/2018 e inclui o uso total de :

Mesocricetus auratus

- 144 Machos de Golden, Idade: 3 Mes(es).

Mus musculus

- 340 Machos de B6.129S7-lfng, Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 2400 Machos de BALB/c, Peso: 20,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 19 de maio de 2014

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04628550

ANEXO V

Busca por domínios da proteína Kharon1 de *L. infantum*

← → ↻ Seguro | <https://swissmodel.expasy.org/interactive/Cth4kr/templates/> VIL1 - Villin-1 - Homo sapiens (Human) - VIL1 gene & prot

BIOZENTRUM **SWISS-MODEL** Universität Basel The Center for Molecular Life Sciences Modelling Repository Documentation Log in Create Account

☰ All Projects

Untitled Project Created: today at 23:17

Summary Templates **13** Models

Template Results

Templates Sequence Similarity Alignment of Selected Templates More ▾

Name	Title	Coverage	Identity	Method	Oligo State	Ligands
<input checked="" type="checkbox"/> 5hb6.2.A	Nucleoporin NUP145		28.00	X-ray, 1.3Å	monomer	None
<input type="checkbox"/> 5hb6.1.A	Nucleoporin NUP145		28.00	X-ray, 1.3Å	monomer	None
<input type="checkbox"/> 3pbp.1.B	Nucleoporin NUP116/NSP116		22.45	X-ray, 2.6Å	hetero-oligomer	None
<input type="checkbox"/> 2aiv.1.A	fragment of Nucleoporin NUP116/NSP116		22.45	NMR	monomer	None
<input type="checkbox"/> 3nki.1.A	Villin-1		26.67	X-ray, 1.6Å	monomer	None
<input type="checkbox"/> 1yu7.1.A	Villin		26.67	X-ray, 1.5Å	monomer	None
<input type="checkbox"/> 1yu8.1.A	Villin		26.67	X-ray, 1.4Å	monomer	None
<input type="checkbox"/> 2l3x.1.A	ABLIM2 protein		23.33	NMR	monomer	None
<input type="checkbox"/> 1qzp.1.A	dematin		23.33	NMR	monomer	None
<input type="checkbox"/> 1zv6.1.A	EPB49 protein		23.33	NMR	monomer	None
<input type="checkbox"/> 3p24.1.A	BFT-3		24.00	X-ray, 1.8Å	monomer	2 x AZI ^{CS} , 1 x ZN ^{CS}
<input type="checkbox"/> 3p24.2.A	BFT-3		24.00	X-ray, 1.8Å	monomer	1 x AZI ^{CS} , 1 x ZN ^{CS}
<input type="checkbox"/> 3p24.4.A	BFT-3		24.00	X-ray, 1.8Å	monomer	1 x ZN ^{CS}

Build Models 1

Clear Selection