

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

***Leishmania* VIVA ATENUADA PELA DELEÇÃO DE *kharon1*, USANDO
CRISPR/CAS9, PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E COMO MODELO
PARA ESTUDAR DIVISÃO CELULAR**

por

Paulo Otávio Lourenço Moreira

Belo Horizonte

2023

TESE DCS-IRR P.O.L. MOREIRA 2023

PAULO OTÁVIO LOURENÇO MOREIRA

***Leishmania* VIVA ATENUADA PELA DELEÇÃO DE *kharon1*, USANDO
CRISPR/CAS9, PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E COMO MODELO
PARA ESTUDAR DIVISÃO CELULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde na área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dr. Rubens Lima do Monte Neto

Coorientação: Dr. Nilmar Silvio Moretti

Belo Horizonte

2023

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

M8381 Moreira, Paulo Otávio Lourenço.
2023

Leishmania viva atenuada pela deleção de *kharon1*, usando CRISPR/Cas9, para o desenvolvimento de vacinas e como modelo para estudar divisão celular / Paulo Otávio Lourenço Moreira. - Belo Horizonte, 2023.

162 f. : il. color.

Orientador: Rubens Lima do Monte Neto.

Coorientador: Nilmar Silvio Moretti

Tese (Doutorado Acadêmico em Ciências da Saúde), Belo Horizonte, 2023.

Bibliografia: f. 134 - 147.

1. Leishmaniose/terapia. 2. *Leishmania*/isolamento & purificação. 3. Divisão Celular/imunologia. 4. Vacinas/uso terapêutico. I. Título.

CDD 616.936

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

PAULO OTÁVIO LOURENÇO MOREIRA

***Leishmania* VIVA ATENUADA PELA DELEÇÃO DE *kharon1*, USANDO
CRISPR/CAS9, PARA O DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E COMO MODELO
PARA ESTUDAR DIVISÃO CELULAR**

Banca Examinadora:

Dr. Rubens Lima do Monte Neto (IRR/Fiocruz MG) Presidente

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG) Titular

Dr. Adriano Cappellazzo Coelho (Unicamp) Titular

Dra. Patrícia Flávia Quaresma (UFSC) Titular

Dra. Sandra Grossi Gava (IRR/Fiocruz MG) Titular

Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias (IRR/Fiocruz MG) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 18/07/2023

EPÍGRAFE

Os benefícios da ciência não são para os cientistas, e sim para a humanidade!

Louis Pasteur

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as etapas da minha vida, e acima de tudo, pelo amor incondicional que sempre tiveram por mim e me mostraram o caminho a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar minha gratidão a Deus por me iluminar e acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos pais, Carmo e Leia, e à minha irmã Lívia, meu profundo agradecimento por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e proporcionando todo o suporte necessário. Sem vocês, eu não teria chegado tão longe. E aos meus filhos, Marina e Miguel, por me darem forças em todos os momentos de minha vida e me encherem de alegria.

Ao meu orientador e mentor, Rubens do Monte, sou imensamente grato por sua orientação e incentivo ao longo desta jornada. Jamais teria conseguido sem seu apoio incondicional. Espero continuar colaborando em nossos projetos futuros.

Ao meu coorientador, Nilmar, agradeço pelos valiosos conselhos e sugestões durante todo o processo de doutorado, bem como por me receber em seu laboratório e contribuir para a minha formação.

Agradeço também a todos os membros da comissão avaliadora por dedicarem seu tempo para avaliar este trabalho e por fornecerem conselhos e sugestões que certamente contribuirão para o melhoramento da tese.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa BAP, cuja colaboração foi essencial em todos esses anos. E a todos os colegas de laboratório que contribuíram de alguma forma para a minha jornada, meu sincero agradecimento.

Às pessoas do Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos da Unifesp, meu profundo reconhecimento pelos ensinamentos compartilhados durante minha estadia em São Paulo. Um agradecimento especial à minha grande amiga e irmã, Suellen, cujo apoio foi fundamental para a minha formação. Muito obrigado por tudo! Você é uma pessoa que vou levar por toda minha vida. Não sei explicar o quanto sou grato por ter te conhecido.

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia da UFOP, especialmente Gabriel, Thaís e Bruno, agradeço a ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Fiocruz, sou grato pela oportunidade de realizar meu doutorado e por todo suporte institucional, acesso a recursos e infraestrutura fornecidos. Agradeço também, a toda rede de plataformas da Fiocruz e seu técnicos. Em especial, quero agradecer

às minhas amigas Viviane, Anna Salin, Camila e Dani, por toda ajuda e conselhos ao longo desses anos.

Um agradecimento especial ao meu grande amigo, Fernando Varotti, por sua orientação e apoio desde o início da minha graduação. Sua amizade e companheirismo são inestimáveis.

A todos os meus amigos de infância e aqueles que conheci ao longo da minha jornada, meu profundo agradecimento pelo apoio incondicional ao longo da minha vida. Vocês são minha segunda família.

Aos pesquisadores, amigos e colegas do IRR, meu sincero agradecimento por compartilharem seu conhecimento e orientação ao longo dos anos.

Por fim, gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, nesta trajetória da minha carreira. O apoio de cada um foi fundamental e sou imensamente grato por cada contribuição.

O presente trabalho foi realizado com apoios das agências de Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e Fiocruz. A essas agências o meu singelo agradecimento.

À biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências dessa tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

RESUMO

A busca pelo desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses é urgente, uma vez que não há nenhuma solução profilática segura e efetiva disponível para humanos. A utilização de parasitos vivos atenuados do gênero *Leishmania* como candidatos vacinais tem sido revisitada, pelo fato de hoje termos ferramentas mais precisas e eficientes de edição gênica, como o sistema CRISPR/Cas9. A deleção do gene que codifica para a proteína KHARON1 (KH1) promove defeitos no desenvolvimento que culminam com a morte de formas amastigotas intracelulares, tornando os parasitos incapazes de manterem a infecção, mostrando serem candidatos promissores para uma vacina viva atenuada. Nesse sentido, selecionamos cepas atenuadas de *L. infantum* e *L. mexicana* mediante a deleção do gene *kh1* (*Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}*) e avaliamos o potencial vacinal contra a leishmaniose visceral em modelos de camundongos BALB/c. Os mutantes de *Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}* foram capazes de induzir a produção de IFN- γ com diminuição de IL-10, sugerindo uma resposta imune protetora com tropismo Th1. Além disso, as vacinas foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos T e gerar células de memória efetora e central. A eficácia da vacina foi evidenciada pela redução ou manutenção da carga parasitária no fígado e/ou no baço contra o desafio da cepa virulenta de *L. infantum*. Uma vez que KHARON1 está envolvida na dinâmica de divisão celular, avaliamos os níveis de expressão diferencial nos transcritos de *Likh1^{-/-}* utilizando técnicas de RT-qPCR e/ou cDNA-Seq. No total, 87 alvos tiveram seus níveis de expressão alterados estatisticamente, seja *upregulated* ou *downregulated*. Ao selecionarmos alvos conhecidos associados à divisão celular e ao citoesqueleto, na ausência de *kh1*, as promastigotas tiveram aumento dos níveis de mRNA para Sfi1, KHAP2, TFK1, KPP1, CYC6, SETE/SETE7, PK53 e AP2, enquanto as amastigotas intracelulares apresentaram aumento da expressão de KHAP1, KHAP2 e PK53. Além disso KHAP1 e KHAP2 mostraram localizações subcelulares em pelo menos uma região em que KHARON1 está presente, mostrando possíveis interações dessas proteínas em processos fisiológicos distintos. Estas descobertas podem auxiliar na melhor compreensão de como é orquestrada a divisão celular em *Leishmania*, além de poderem ser estudadas como alvos farmacológicos, contribuindo no combate à leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania*, KHARON1, vacina.

ABSTRACT

The search for the development of vaccines against leishmaniasis is urgent, since there is no safe and effective prophylactic solution available for humans. The use of live attenuated parasites of the *Leishmania* genus as vaccine candidates has been revisited, due to the fact that today we have more precise and efficient gene editing tools, such as the CRISPR/Cas9 system. Deletion of the gene that codes for the KHARON1 (KH1) protein promotes developmental defects that culminate in the death of intracellular amastigotes, making the parasites unable to maintain the infection, showing them to be promising candidates for a live attenuated vaccine. In this sense, we selected attenuated strains of *L. infantum* and *L. Mexicana* by deleting the *kh1* gene (*Likh1*^{-/-} and *Lmexkh1*^{-/-}) and evaluated the vaccine potential against visceral leishmaniasis in BALB/c mouse models. *Likh1*^{-/-} and *Lmexkh1*^{-/-} mutants were able to induce the production of IFN- γ with a decrease in IL-10, suggesting a protective immune response with Th1 tropism. Furthermore, the vaccines were able to induce the proliferation of T lymphocytes and generate effector and central memory cells. The effectiveness of the vaccine was evidenced by the reduction or maintenance of the parasite load in the liver and/or spleen against challenge with the virulent strain of *L. infantum*. Since KHARON1 is involved in cell division dynamics, we assessed differential expression levels in *Likh1*^{-/-} transcripts using RT-qPCR and/or cDNA-Seq techniques. In total, 87 targets had their expression levels statistically altered, either upregulated or downregulated. When we selected known targets associated with cell division and the cytoskeleton, in the absence of *kh1*, promastigotes had an increase in mRNA levels for Sfi1, KHAP2, TFK1, KPP1, CYC6, SETE/SETE7, PK53, and AP2, while intracellular amastigotes showed an increase in the expression of KHAP1, KHAP2, and PK53. Furthermore, KHAP1 and KHAP2 showed subcellular localizations in at least one region in which KHARON1 is present, indicating possible interactions of these proteins in distinct physiological processes. These discoveries can help to better understand how cell division is orchestrated in *Leishmania*, in addition to being studied as pharmacological targets, contributing to the fight against leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*, KHARON1, vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos reportados de Leishmaniose Visceral no mundo em 2021.....	23
Figura 2: Ciclo biológico dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> spp.....	27
Figura 3: Representação esquemática do ciclo celular em <i>L. major</i>	28
Figura 4: Esquema representativo da estratégia de leishmanização com parasitos vivos atenuados.....	34
Figura 5: Representação do sistema CRISPR/Cas9 para edição do genoma.....	37
Figura 6: Sistema modular de plasmídeos para edição simplificada de genes.....	39
Figura 7: Estratégia de amplificação dos plasmídeos pT destinados ao nocaute de <i>kharon1</i> em <i>Leishmania</i>	50
Figura 8: Esquema representativo dos protocolos de vacinação em camundongos BALB/c.....	58
Figura 9: Estratégia de análise imunofenotípica das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ CD44 ⁺ produtoras das citocinas IFN- γ e IL-10 pelas células T CD4 ⁺	63
Figura 10: Estratégia de análise para avaliação da proliferação total e das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e TCD8 ⁺ utilizando CFSE.....	65
Figura 11: Estratégia para caracterização de células T de memória central (MC) e memória efetora (ME).....	67
Figura 12: Esquema ilustrativo da estratégia usada para amplificar os plasmídeos pPLOT destinados à marcação de genes em <i>Leishmania</i>	76
Figura 13: Produtos de PCR destinado à deleção de <i>kh1</i> em <i>L. infantum</i>	82
Figura 14: Confirmação da deleção de <i>kharon1</i> e integração do DNA doador em <i>L. infantum</i>	83
Figura 15: Dosagem gênica por qPCR do gene <i>kh1</i> nos clones selecionados em <i>L. infantum</i>	84
Figura 16: Deleção de <i>kharon1</i> em <i>L. mexicana</i>	85
Figura 17: Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. mexicana</i> na presença ou ausência do gene <i>kh1</i>	86
Figura 18: Resposta humoral avaliada por meio da dosagem de imunoglobulinas murinas anti <i>leishmania</i> na proteção homóloga.....	88
Figura 19: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IFN- γ) após estimulação <i>in vitro</i> com ASLi.....	89

Figura 20: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IL-10) após estimulação <i>in vitro</i> com ASLi.....	90
Figura 21: Razão das citocinas produzidas pelos linfócitos (IFN- γ /IL-10) na proteção homóloga.....	91
Figura 22: Percentual da proliferação de linfócitos T na proteção homóloga.....	92
Figura 23: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ de memória central (MC) e memória efetora (ME) na proteção homóloga.....	93
Figura 24: Carga parasitária no fígado e no baço dos camundongos BALB/c na proteção homóloga.....	94
Figura 25: Resposta humoral avaliada por meio da dosagem de imunoglobulinas murinas anti <i>leishmania</i> na proteção heteróloga.....	96
Figura 26: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IFN- γ) após estimulação <i>in vitro</i> com ASLi.....	97
Figura 27: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IL-10) após estimulação <i>in vitro</i> com ASLi.....	98
Figura 28: Razão das citocinas produzidas pelos linfócitos (IFN- γ /IL-10) na proteção heteróloga.....	99
Figura 29: Percentual da proliferação de linfócitos T na proteção heteróloga.....	100
Figura 30: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ de memória central (MC) e memória efetora (ME) na proteção heteróloga.....	101
Figura 31: Carga parasitária no fígado e no baço de camundongos BALB/c na proteção heteróloga.....	102
Figura 32: Análise dos níveis de transcritos que codificam para proteínas associadas à divisão celular e/ou ao citoesqueleto em promastigotas e amastigotas de <i>Likh1</i> ^{-/-}	104
Figura 33: Gráfico de vulcão (<i>volcano plot</i>) indicando transcritos diferencialmente expressos nos mutantes <i>Likh1</i> ^{-/-} / WT.....	105
Figura 34: Representação em mapa de calor (<i>heatmap</i>) dos genes diferencialmente expressos.....	106
Figura 35: Níveis de transcritos que codificam para proteínas com função na divisão celular e no citoesqueleto selecionados a partir do sequenciamento do cDNA.....	110

Figura 36: Comparação dos níveis de transcritos obtidos no sequenciamento de cDNA e na RT-qPCR.....	111
Figura 37: Comparação dos níveis de transcritos obtidos por meio do sequenciamento de cDNA e da RT-qPCR para os alvos previamente selecionados.....	112
Figura 38: Cassetes de sgRNA5' e DNA doadores destinados à marcação com <i>mNeonGreen</i> em <i>Leishmania</i>	113
Figura 39: Confirmação das linhagens mutantes fluorescentes com <i>mNeonGreen</i>	114
Figura 40: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em promastigotas de <i>L. infantum</i> WT.....	116
Figura 41: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em promastigotas de <i>Likh1^{-/-}</i>	117
Figura 42: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em amastigotas intracelulares de <i>L. infantum</i> WT.....	118
Figura 43: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em amastigotas intracelulares de <i>Likh1^{-/-}</i>	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Marcadores utilizados para fenotipagem das subpopulações de linfócitos T e das citocinas intracitoplasmáticas.....	62
Quadro 2: Marcadores utilizados para fenotipagem das células de memória efetora e central.....	66
Quadro 3: Diluição dos anticorpos primários e secundários para confirmação da marcação das proteínas com o repórter fluorescente (Tag).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Plasmídeos clonados em <i>E. coli</i> DH5 α	48
Tabela 2: Iniciadores utilizados destinados ao nocaute de <i>kharon1</i> e confirmação da deleção.....	51
Tabela 3: Condições das PCRs convencionais.....	52
Tabela 4: Concentrações dos antibióticos utilizados para seleção dos mutantes de <i>Leishmania</i>	53
Tabela 5: Iniciadores de qPCR utilizados para avaliar a dosagem gênica.....	55
Tabela 6: Condições da qPCR.....	55
Tabela 7: Iniciadores da qPCR para determinação da carga parasitária.....	70
Tabela 8: Síntese da segunda fita de cDNA.....	72
Tabela 9: Iniciadores utilizados na RT-qPCR para avaliar o nível de transcritos de alvos específicos em <i>Leishmania</i>	73
Tabela 10: Iniciadores utilizados na RT-qPCR para avaliar o nível de transcritos em <i>Leishmania</i>	75
Tabela 11: Iniciadores utilizados para marcação a com repórter que emite fluorescência (Tagging).....	77
Tabela 12: Células de <i>L. infantum</i> que foram marcadas com fluorescência <i>mNeonGreen</i> fusionado a <i>kharon1</i> ; <i>khap1</i> e <i>Khap2</i>	78
Tabela 13: Genes diferencialmente expressos entres as promastigotas <i>Likh1</i> ^{-/-} em relação a <i>LMT</i>	107
Tabela 14: Ortólogos de alvos proteicos em tripanossomatídeos associados ao citoesqueleto ou com função na divisão celular que foram diferencialmente expressos e <i>L. infantum kh1</i> ^{-/-}	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- α -MEM** – Meio Essencial Mínimo (*Minimum Essential Medium α*)
- AIRK** – Cinase Relacionada à Aurora (*Aurora-I Related Kinase*)
- AP2** – Proteína associada ao promotor de anáfase (*Anaphase promoting complex-associated Protein AP2*)
- ASLi** – Antígeno solúvel de *L. infantum*
- BFA** – Brefeldina A
- BSA** – *Bovine Serun Albumin*
- BOD** – Demanda Bioquímica de Oxigênio (*Biochemical Oxygen Demand*)
- BSD** – Blastocidina-S desaminase (*Blasticidin-S Deaminase*) – gene que confere resistência à Blastocidina
- CD3⁺** - Marcador de superfície celular de linfócitos T
- CD4⁺** - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
- CD8⁺** - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos
- CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CFDA-SE** – *Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester*
- CFSE** – *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- CRISPR/Cas** – Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas/Endonuclease Associada a CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated endonuclease*)
- CRK3** – Cinase relacionada ao cdc2 (*Cdc2-related kinase 3*)
- CTAB** - *Cetyltrimethylammonium bromide*
- CYC6** – Ciclina dependente de cinase 6 (*Cyclin 6*)
- DAPI** – dicloridrato de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2phenylindole*)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DSB** – Quebra de fita dupla de DNA (*Double Strand Break*)
- GAPDH** – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
- HDR** – Reparo Direcionado por Homologia (*Homologous Directed Repair*)
- HR** – Recombinação Homóloga (*Homologous Recombination*)
- HYG** – Higromicina fosfotransferase (Hygromycin phosphotransferase) – gene que confere resistência à Higromicina
- IFN- γ** – Interferon- γ

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

KH1 – Proteína Kharon1

kh1 – Gene que codifica para a proteína KH1

KHAP1 – Proteína associada à Kharon1 1 (*Kharon1 Associated Protein 1*)

KHAP2 – Proteína associada à Kharon1 2 (*Kharon1 Associated Protein 2*)

KKT – Proteína do cinetocoro de cinetoplastídeo (*Kinetoplastid Kinetochores Protein*)

KMP-11 – Proteína de membrana de cinetoplastídeo 11 (*Kinetoplastid Membrane Protein 11*)

KPP1 – Proteína fosfatase 1 específica de cinetoplastídeos (*Protein phosphatase 1*)

LB – Meio de cultura para crescimento bacteriano *Luria Bertani*

LmxGT1 – Transportador de glicose em *Leishmania mexicana*

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

MMEJ – União de extremidades mediada por micro homologia (*Microhomology end-joining*)

mRNA – RNA mensageiro

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NHEJ – Junção de extremidades não homólogas (*Non-Homologous end-joining*)

NEO – Neomicina-fosfotransferase (*Amino 3'glycosyl phosphotransferase*) – gene que confere resistência à Neomicina

NUP92 – Nucleoporina 92 (*Nucleoporin Mlp92*)

PAM – Motivo adjacente ao protoespaçador (*Protospacer adjacent motif*)

PAC – Puomicina N-acetiltransferase (*Puromycin N-acetyltransferase*) – gene que confere resistência à Puomicina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PBS – Tampão fosfato-salino

PK53 – Proteína cinase PK53

PMA – *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

Org. Citoesq. – Proteína com função organizadora do citoesqueleto

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

T7RNAP – T7 RNA polimerase

RT-qPCR – transcrição reversa seguida pela reação quantitativa em cadeia da polimerase (*Reverse transcription – polymerase chain reaction*)

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* (Meio de cultivo celular RPMI 1640)

SAS-6 – Proteína do corpo basal 6 (*Spindle Assembly Abnormal Protein 6*)

SET/SET7 – Proteína cinase SET/SET7

SFB – Soro fetal bovino

sgRNA – RNA guia único (*Single guide RNA*)

Sfi-1 – Proteína do corpo do fuso (*Spindle Body Protein*)

TFK1 – Proteína de fibra de transição do corpo basal (*Basal body transition fibre protein*)

THP-1 – Células derivadas da linhagem monocítica humana

TNF- α – Fator de necrose tumoral

VS – Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Leishmanioses	21
1.2 Aspectos gerais da leishmaniose visceral.....	22
1.3 Biologia da <i>Leishmania</i>	25
1.4 Divisão Celular em <i>Leishmania</i>	28
1.5 Resposta imune nas leishmanioses.....	30
1.6 Vacina contra as leishmanioses.....	32
1.7 Manipulação genética em <i>Leishmania</i> para obtenção de parasitos vivos atenuados	35
1.8 Proteína KHARON1	40
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Cultivo e manutenção dos parasitos	45
4.1.1 Parasitos para nocaute, marcação de proteínas e vacinação	45
4.1.2 Parasitos para o desafio experimental.....	45
4.2 Cultivo e manutenção das células THP-1	46
4.3 Preparo de bactérias cálcio competentes	47
4.4 Clonagem dos plasmídeos em bactérias cálcio competentes.....	47
4.5 Transfecção em <i>Leishmania</i>	48
4.6 Produção dos RNAs guias e DNAs doadores destinados a deleção de <i>Kharon1</i>	49
4.7 Eletroforese em gel de agarose	52
4.8 Transfecção em <i>Leishmania</i> expressando a Cas9 ⁺ /RNAP T7	53
4.9 Extração de DNA genômico.....	54
4.10 Quantificação do número de cópias gênicas	54
4.11 Clonagem celular da população mutante.....	55
4.12 Curva de crescimento dos parasitos	56
4.13 Estudos fenotípicos das vacinas com parasitos vivos atenuados	56
4.13.1 Protocolos vacinais	56
4.13.2 Vacinação, infecção e desafio.....	58
4.13.3 Avaliação do perfil de imunoglobulinas.....	59
4.13.4 Obtenção dos esplenócitos	60
4.13.5 Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T produtores de citocinas intracitoplasmáticas	61
4.13.6 Caracterização fenotípica da atividade proliferativa de subpopulações de linfócitos T.....	63
4.14.7 Caracterização fenotípica das células T de memória central e efetora	65
4.14.8 Quantificação da carga parasitária por qPCR.....	67
4.14 Nível de expressão gênica de transcritos associados à divisão celular/citoesqueleto em <i>L. infantum</i>	70
4.15 Sequenciamento de cDNA para análise de expressão diferencial.....	74
4.16 Validação dos alvos diferencialmente expressos por RT-qPCR	75

4.17	Localizações subcelulares de KHARON1, KHAP1 e KHAP2.....	75
4.17.1	Confirmação da marca de fluorescência em <i>L. infantum</i>	78
4.18	Análises estatísticas.....	81
5	RESULTADOS.....	82
5.1	Deleção de <i>kharon1</i> em <i>L. infantum</i> e <i>L. mexicana</i>	82
5.2	Crescimento de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e <i>L. mexicana</i>	86
5.3	Caracterização fenotípica das vacinas vivas atenuadas.....	87
5.3.1	Proteção homóloga.....	87
5.3.2	Proteção heteróloga.....	95
5.4	Expressão gênica de transcritos para alvos associados à divisão celular e ao citoesqueleto em <i>Likh1^{-/-}</i>	103
5.5	Transcriptoma de <i>Likh1^{-/-}</i>	105
5.6	Localização subcelular de KHARON1, KHAP1 e KHAP2.....	113
6	DISCUSSÃO.....	120
6.1	Imunogenicidade e eficácia da vacina viva atenuada.....	120
6.2	Alvos associados a divisão celular e ao citoesqueleto no contexto de KHARON1.....	127
7	CONCLUSÕES.....	132
8	PERSPECTIVAS.....	133
	REFERÊNCIAS.....	134
	APÊNDICES.....	148
	Apêndice I – Tipagem para definição de espécie de <i>Leishmania</i>	148
	Apêndice II – Tabela de eficiência dos <i>primers</i> da RT-qPCR.....	154
	Apêndice III – Artigo de publicado relacionado a tese.....	155
	Apêndice IV – Trabalhos publicados no período do doutorado.....	156
	ANEXOS.....	160
	Anexo I – Licença LW59/19.....	160
	Anexo II – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais.....	162

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são caracterizadas como um complexo de doenças infecciosas causadas por mais de 20 protozoários heteroxênicos do gênero *Leishmania* (Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae). Estes são transmitidos para o homem pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, e estão classificadas entre as nove doenças infecto-parasitárias em termos de importância global (AKHOUNDI et al., 2016; WHO, 2023).

Esta doença está tradicionalmente associada a condições de pobreza e suas ramificações, tendo um impacto desproporcional nas comunidades mais desfavorecidas. Por essa razão, é classificada como uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas globalmente, com taxas de mortalidade elevadas quando não tratada (MARINHO et al., 2015). Apesar disso, com o processo de urbanização associado à busca por maior qualidade de vida em áreas próximas ao habitat de vetores, tem ocorrido também o acometimento de indivíduos de maior poder aquisitivo (OMARI et al., 2020; RANGEL; VILELA, 2008).

Além de ser classificada como uma doença negligenciada, ela também pode ser considerada como doenças emergentes ou reemergentes, pois nas últimas décadas houve um aumento alarmante na incidência de casos. Dentre os fatores associados, destaca-se: I) o número crescente de migração de pessoas que viviam em áreas rurais para regiões urbanas; II) mudanças climáticas e intervenção humana; III) deterioração das condições socioeconômicas e; IV) presença de coinfeção HIV/*Leishmania* (DESJEUX, 2004; GOTO; LINDOSO, 2010).

As leishmanioses podem ser classificadas de acordo com duas principais manifestações clínicas: leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT); onde a evolução da infecção vai depender da espécie do parasito, da virulência da cepa, da quantidade de parasitos inoculados no momento da infecção, além da resposta imune do hospedeiro (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são classificados em diferentes subgêneros, com destaque para os subgêneros *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), de acordo com o desenvolvimento dos parasitos no inseto vetor e com base em marcadores moleculares filogenéticos. Estes subgêneros englobam a maioria das espécies que são responsáveis pela transmissão da doença ao homem (RAMÍREZ et al., 2016).

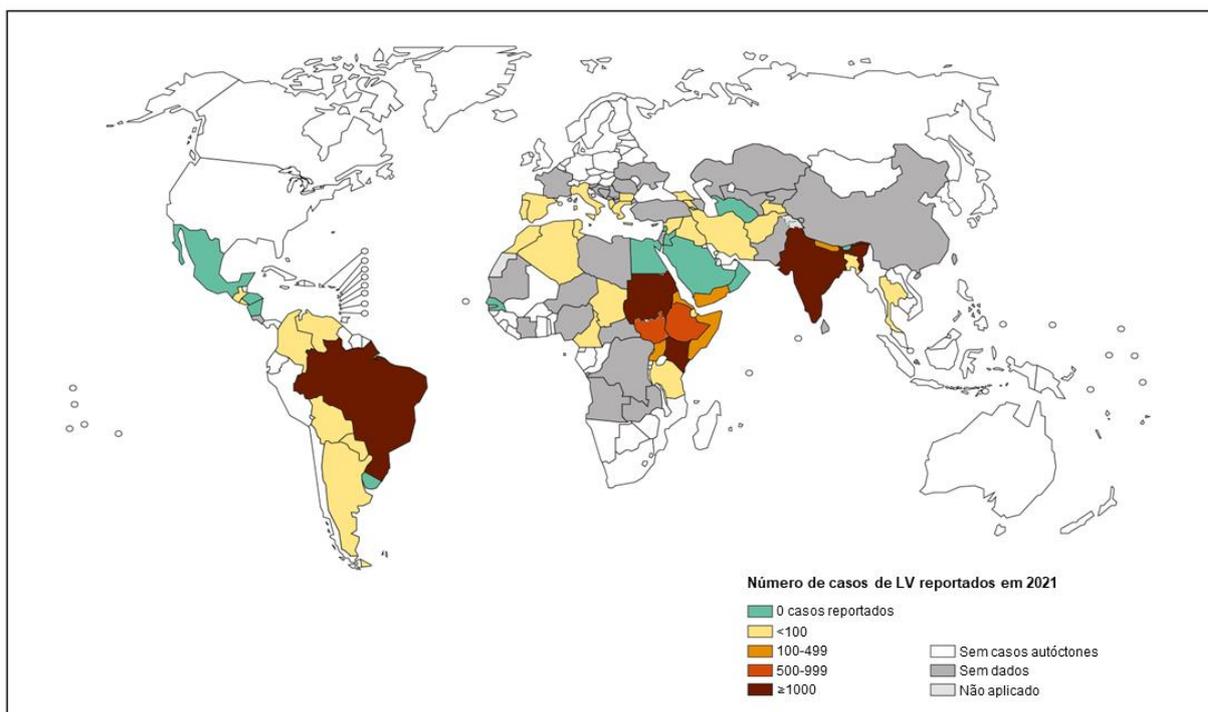
1.2 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), conhecida também como Kala-azar ou Calazar, é uma doença crônica grave com alta letalidade, que afeta preferencialmente os órgãos linfoides, como baço, medula óssea, linfonodos e fígado. Esta condição pode permanecer assintomática por longos períodos ou se manifestar com sintomas como perda significativa de peso, aumento do fígado e baço, febre intermitente prolongada e anemia. O período de incubação varia de 2 a 6 meses (RODRIGUES et al., 2016; SINGH et al., 2014; VARMA; NASEEM, 2010). Os parasitos viáveis podem persistir por décadas, mesmo após o tratamento aparentemente bem-sucedido, e no caso de imuno supressão, estes reativam-se e manifestam a doença (DIRO et al., 2015).

Entre as doenças tropicais transmitidas por vetores, a LV se torna parcialmente fatal, ocupando o segundo lugar em termos de mortalidade e o sétimo lugar em perda de anos de vida (KYU et al., 2018). Além disso, nas regiões mais afetadas, o acesso aos serviços de saúde pode ser limitado e os medicamentos muitas das vezes não são acessíveis, o que contribui para o aumento da taxa de mortalidade (MURRAY, 2002).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 foram relatados quase 13.000 casos de LV (WHO, 2023). A doença é endêmica em mais de 70 países espalhados por todos os continentes, exceto Antártica e Austrália, com uma população de risco estimada em mais de 200 milhões de pessoas (Figura 1) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). No entanto, apesar de estar amplamente distribuída, mais de 90% dos casos mundiais são relatados em sete países, Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Estima-se que anualmente ocorram 500.000 novos casos de LV, resultando em aproximadamente 50.000 mil mortes. No entanto, esses números são considerados subestimados (MURRAY, 2002; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012). Nas Américas, o Brasil registra mais de 90 % dos casos distribuídos em todas as regiões do país, sendo a região Nordeste com maior número. No período de 2003 a 2018, foram confirmados 51.000 casos humanos, com incidência média de 1,7 casos/100.000 habitantes e letalidade de 7,1 % (FERREIRA et al., 2021).

Figura 1: Casos reportados de Leishmaniose Visceral no mundo em 2021.



Disponível em: https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_vl_2021e2ccf4cc-dd58-471b-876b-d011047d3fd6.png?sfvrsn=caadc6a5_3

A LV, se não tratada, apresenta altos índices de mortalidade. Nos últimos anos, a doença tem assumido um caráter predominantemente urbano, com os cães atuando como principal reservatório. Além disso, apresenta maior incidência de casos em crianças menores de 10 anos, o que se atribui principalmente à imaturidade do sistema imunológico nessa faixa etária, bem como à desnutrição (COTA et al., 2021; FURTADO et al., 2022; SCARPINI et al., 2022). Em certas áreas, como na África Oriental, o número crescente de pessoas imunossuprimidas devido ao HIV resulta num aumento de casos de LV (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012).

As espécies dos parasitos associadas com a LV são: *Leishmania (Leishmania) donovani*, encontrada nas regiões do continente Asiático e na África Oriental, onde o reservatório do patógeno é representado pelos humanos; *Leishmania (L.) infantum*, presente na América Latina e na região do Mediterrâneo, no qual a LV é uma doença zoonótica, sendo o cão o principal reservatório (COSTA et al., 2023).

No geral, o diagnóstico da LV é desafiador devido a sua apresentação clínica que se assemelha a outras infecções, tais como febre tifóide, tuberculose, brucelose, malária e algumas doenças malignas hematológicas (SAFAVI; ESHAGHI; HAJIHASSANI, 2021). Além disso, o teste ideal deve ser capaz de fazer a distinção

entre a doença na fase aguda e a infecção assintomática. Visto que, nenhum dos medicamentos disponíveis atualmente é considerado seguro o suficiente para tratar infecções assintomáticas (CHAPPUIS et al., 2007). Tradicionalmente, em uma pessoa com suspeita de LV, o diagnóstico pode ser confirmado pela demonstração direta de *Leishmania* em amostras de tecidos ou culturas, ou por meio de testes sorológicos (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019). Entretanto, essas técnicas apresentam limitações em termos de sensibilidade e especificidade e baixo desempenho em pacientes imunocomprometidos (ELMAHALLAWY et al., 2014). Surgiram outras opções de diagnósticos, como kits de diagnóstico rápido e testes de reação em cadeia da polimerase (PCR), que oferece vantagens significativas, como rapidez, sensibilidade elevada e capacidade de detecção mesmo em pacientes imunocomprometidos (ELMAHALLAWY et al., 2014). Em geral, recomenda-se o uso de múltiplas abordagens diagnósticas para melhorar a precisão do diagnóstico e facilitar a identificação da doença, especialmente em áreas endêmicas.

Na ausência de uma vacina segura e eficaz para o uso em humanos, a quimioterapia continua sendo a principal forma de controle das leishmanioses. Existem poucas opções de fármacos e os que estão atualmente disponíveis possuem várias limitações, como efeitos colaterais sistêmicos que demandam uma supervisão cuidadosa durante o tratamento. Além disso, a crescente resistência aos medicamentos representa um desafio adicional, comprometendo a eficácia do tratamento (SUNDAR; SINGH, 2018).

Os medicamentos disponíveis para esse uso são limitados a compostos antimoniais pentavalentes como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina; paromomicina injetável; miltefosina oral; e anfotericina B em duas formulações (desoxicolato livre e em sua formulação lipídica) (ALVES et al., 2018). Além disso, não existem ensaios que investiguem uma abordagem terapêutica específica para a idade pediátrica, os ensaios experimentais aplicaram a mesma abordagem que para adultos (SUNDAR; SINGH, 2018).

É importante ressaltar que, por ser predominantemente uma doença que afeta países em desenvolvimento, a indústria farmacêutica demonstra pouco interesse em investir em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para leishmaniose. Como resultado, a LV está incluída entre as “doenças negligenciadas” (PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021; YAMEY; TORREELE, 2002). Além disso, nas áreas mais

afetadas, o acesso aos cuidados de saúde pode ser difícil e os medicamentos muitas vezes não são acessíveis, tornando a taxa de mortalidade ainda mais elevada (MURRAY, 2002). Esses desafios ressaltam a necessidade premente de buscar novas medidas preventivas para enfrentar as leishmanioses. Entre essas estratégias, a vacinação emerge como uma das abordagens mais promissoras contra a doença (PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021).

1.3 Biologia da *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem ciclo heteroxênico, passando por um hospedeiro invertebrado (vetor) e por um hospedeiro vertebrado. Os vetores para leishmanioses são fêmeas de flebotomíneos, insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae. Dois gêneros estão associados com a transmissão, o *Lutzomyia spp.*, encontrado nas regiões das Américas, também conhecidas como “Regiões do Novo Mundo,” e *Phlebotomus spp.*, presente na Europa, África e Ásia, conhecidas como regiões do “Velho Mundo” (AKHOUNDI et al., 2016).

O padrão de transmissão da leishmaniose visceral pode ocorrer de duas formas de acordo com as duas espécies descritas: O ciclo antroponótico, representada por *L. donovani*, onde os humanos infectados atuam como reservatórios. Esse modelo de transmissão é predominante em regiões da Ásia e África. A *L. infantum*, é caracterizada pelo ciclo zoonótico, que depende de um reservatório não humano infectado, sendo a principal fonte de infecção para flebotomíneos. Esta forma de transmissão está presente nas áreas do Mediterrâneo e na América Latina (READY, 2014).

No ciclo zoonótico, os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) se tornam o principal reservatório da *Leishmania*, sendo essenciais para a manutenção do ciclo do parasito no ambiente e na transmissão para o homem. Com menos frequência, alguns mamíferos selvagens como por exemplo, cães do mato (*Cerdocyon thous*), preguiças (*Choloepus didactylus*) e algumas espécies de roedores como *Proechimys guyanensis* e *Proechimys cuvieri* já foram descritos como reservatórios de *Leishmania* (ROQUE; JANSEN, 2014).

Parasitos de *Leishmania* apresentam duas principais formas evolutivas: a promastigota, presente no inseto vetor, sendo forma infectante para o hospedeiro vertebrado. São caracterizadas por serem formas móveis e delgadas, com 5 a 14 µM

de comprimento, apresentando um flagelo longo em sua porção anterior; e as amastigotas, que são formas arredondadas, medindo de 2 a 4 μM , e possuem um flagelo muito curto, não sendo aparente em preparados para a microscopia óptica. Esta forma é encontrada geralmente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, onde se proliferam e estabelecem a infecção (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; UENO; WILSON, 2012; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

O ciclo de vida do parasito tem início no hospedeiro vertebrado quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas, ao se alimentarem de sangue, regurgitam formas promastigotas metacíclicas no local da picada juntamente com a saliva, que desempenha um papel fundamental no sucesso do repasto sanguíneo (AOKI et al., 2022). Nela estão presentes uma variedade de substâncias, como anticoagulantes e peptídeos vasodilatadores, que atuam de modo a impedir a agregação plaquetária (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Adicionalmente, a saliva é responsável por modular a resposta imune do hospedeiro, diminuir a ativação de linfócitos T, e inibir a produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos macrófagos, favorecendo a infecção por *Leishmania* (OLIVEIRA; DE CARVALHO; DE OLIVEIRA, 2013).

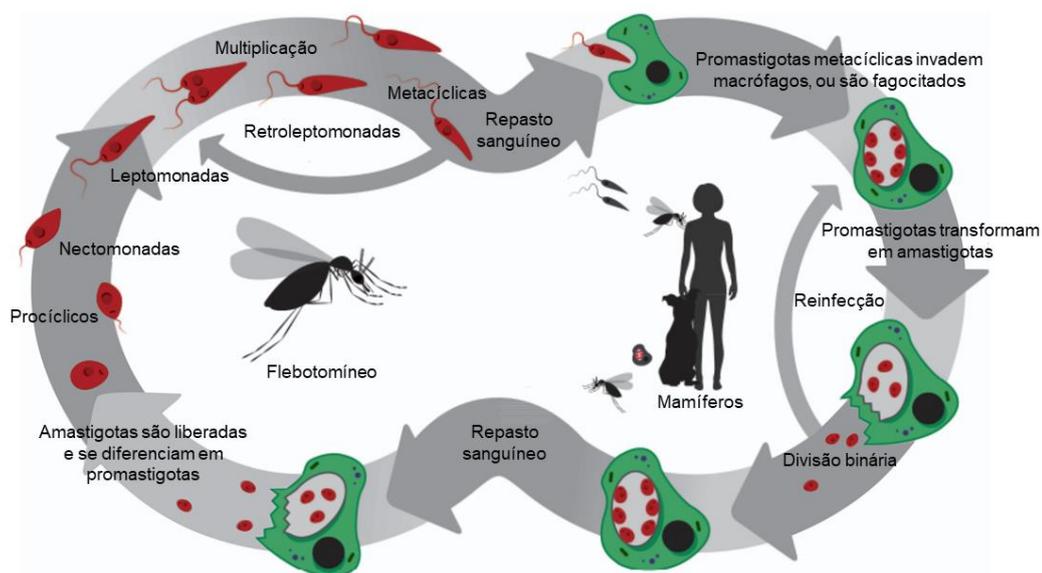
Os parasitos são fagocitados por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos ou células dendríticas, onde se transformam em amastigotas (CONTRERAS et al., 2014). As amastigotas se multiplicam por divisão binária até que a célula se rompa e libere parasitos para infectar fagócitos vizinhos. Este hospedeiro será fonte para que novos flebotomíneos realizem o repasto sanguíneo e se infectem ao ingerir fagócitos infectados e amastigotas presentes no sangue (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; CHANG; CHAUDHURI; FONG, 1990).

No intestino médio do inseto vetor, as amastigotas se transformam em promastigotas, e subsequentemente, através de um processo conhecido como metaciclogênese, as promastigotas passam por vários estágios de desenvolvimento, caracterizados por alterações morfológicas e funcionais. O primeiro estágio é das promastigotas procíclicas que posteriormente se diferenciam em formas nectomonadas, haptomonadas, leptomonadas e por fim promastigotas metacíclicas (forma infectante). Estas promastigotas metacíclicas migram para a faringe do vetor,

podendo ser novamente inoculadas na pele de potenciais hospedeiros durante a próxima alimentação sanguínea do inseto (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Adicionalmente, em um processo descrito como meteciclogênese reversa, promastigotas metacíclicas em resposta às subseqüentes ingestões de sangue do flebotomíneo no hospedeiro, desencadeiam a diferenciação reversa ao estágio semelhante a leptomonadas caracterizado como retroleptomonadas. Nessa transição, o flagelo do parasito se encurta significativamente, o corpo celular aumenta de tamanho e as promastigotas começam a dividir. Demonstrando que as promastigotas metacíclicas podem responder a sinais ambientais devidos aos componentes presentes no sangue do hospedeiro. À medida que o sangue presente no vetor é digerido e excretado, as retroleptomonadas se diferenciam novamente em promastigotas metacíclicas amplificando o número de parasitos virulentos presentes no vetor (Figura 2) (SERAFIM et al., 2018; WAGNER et al., 2019).

Figura 2: Ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania* spp.



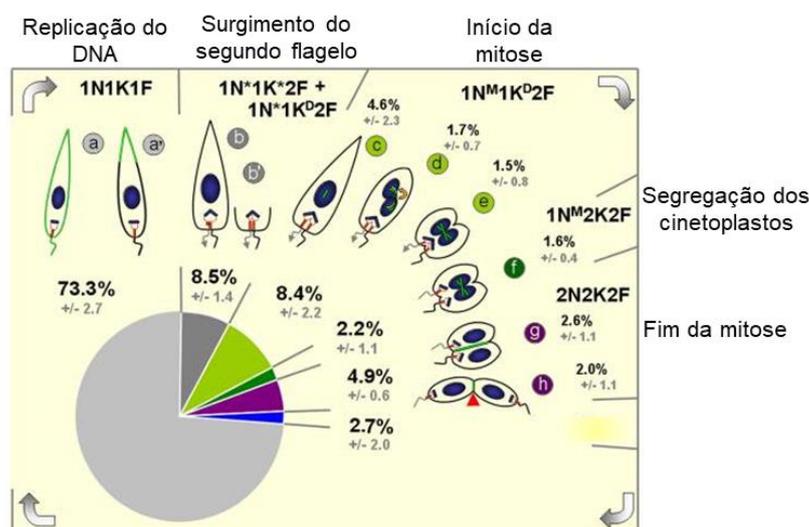
Promastigotas metacíclicas são transmitidos para o hospedeiro mamífero por meio da picada de flebotomíneos fêmea. No hospedeiro mamífero as promastigotas invadem ou são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear onde se diferenciam em amastigotas. Após sucessivas divisões binárias os macrófagos se rompem e as amastigotas podem invadir novas células. Por meio do repasto sanguíneo, o flebotomíneo ingere macrófagos contendo amastigotas. Nas paredes do intestino do vetor as amastigotas são liberadas e se diferenciam em promastigotas, passando por várias etapas (meteciclogênese) até se diferenciarem em promastigotas metacíclicas que podem ser transmitidas novamente ao hospedeiro vertebrado num repasto sanguíneo subseqüente. Devido múltiplos repastos sanguíneos do vetor, pode ocorrer a desdiferenciação de promastigotas metacíclicas a um estágio capaz de se multiplicar chamado de retroleptomonadas, que se diferenciam novamente em metacíclicas, aumentando o número de parasitos virulentos no inseto vetor. Adaptado de (WAGNER et al., 2019).

1.4 Divisão Celular em *Leishmania*

As promastigotas de *Leishmania* são células altamente polarizadas, caracterizadas pela presença de várias organelas únicas com as localizações subcelulares definidas. Estas organelas incluem o núcleo, o aparelho de Golgi, o corpo basal, a mitocôndria (que incorpora o cinetoplasto) e o flagelo, que se projeta do corpo celular a partir da bolsa flagelar na região anterior. A geração de progênes viáveis depende do controle preciso da duplicação e segregação dessas organelas (Figura 3) (HALLIDAY et al., 2019; HAVENS et al., 2000; MINOCHA et al., 2011; TAMMANA et al., 2010).

O ciclo celular da forma procíclica de *Trypanosoma brucei* foi amplamente caracterizado e forma uma base para a comparação de outros tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania*. Na forma procíclica de *T. brucei*, bem como a *Leishmania tarentolae* (HALLIDAY et al., 2019; SIMPSON, 1968), a divisão do cinetoplasto é concluída antes do início da mitose nuclear, enquanto em *L. mexicana* e *L. donovani*, esses eventos parecem ocorrer na ordem inversa (HAVENS et al., 2000; MINOCHA et al., 2011; TAMMANA et al., 2010).

Figura 3: Representação esquemática do ciclo celular em *L. major*.



Para cada célula, os números de núcleos (N), cinetoplastos (K) e flagelos (F) foram pontuados. Asteriscos indicam organelas na fase S ou G₂, com M para mitose nuclear e D para divisão cinetoplástica. As porcentagens indicam quais fases da divisão a população de células se encontra na fase log de crescimento. A imagem mostra uma representação simplificada do ciclo celular da promastigota. Adaptado de (AMBIT et al., 2011).

Os cromossomos de *T. brucei* não se condensam visivelmente e o envelope nuclear permanece intacto durante a mitose; além disso, nenhum equivalente estrutural dos corpos polares do fuso de mamíferos (centrossomas) foi identificado (OGBADOYI et al., 2000). No entanto, os centríolos dos corpos basais flagelares estão envolvidos diretamente na partição do genoma mitocondrial (ROBINSON et al., 1995), e a segregação cromossômica no núcleo em divisão envolve não apenas cinetocoros, mas também microtúbulos interpolares (ERSFELD; GULL, 1997; ERSFELD; MELVILLE; GULL, 1999). A extensa remodelação do citoesqueleto microtubular que ocorre durante a citocinese de células de mamíferos não foi descrita para nenhum tripanossomatídeo, embora mudanças tenham sido detalhadas na forma celular de promastigotas de *L. mexicana* desde a entrada na mitose até a citocinese precoce (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

Os microtúbulos fazem parte de muitas estruturas particulares em tripanossomatídeos: a rede de microtúbulos subpeliculares reforçam a membrana plasmática e definem a forma das células; os microtúbulos flagelares formam o axonema; os microtúbulos intracelulares compõem o fuso mitótico e; os microtúbulos densamente compactados, nas proximidades do cinetoplasto, fazem parte de estruturas como os corpos basais (ROBINSON et al., 1995). Além disso, está bem estabelecido que nesses parasitos, a progressão ao longo do ciclo celular é dependente de eventos mediados por microtúbulos, e interferir com a polimerização/despolimerização dos microtúbulos demonstrou afetar a duplicação do corpo basal, a segregação do cinetoplasto, crescimento do axonema flagelar, mitose, células em crescimento e citocinese de tripanossomas (MCKEAN, 2003; ROBINSON et al., 1995).

Durante o processo de divisão celular em *Leishmania*, as divisões do corpo celular, da bolsa flagelar e flagelo, ocorrem antes mesmo da divisão do cinetoplasto (Figura 3), o qual duplica e se divide imediatamente antes da cariocinese (AZAB; ABDEL MAWLA, 2018). Diferente do que acontece em células de mamíferos, a mitose em *Leishmania* é considerada fechada, ocorrendo sem a fragmentação da membrana nuclear, um processo também conhecido como pleuomitose (AZAB; ABDEL MAWLA, 2018; NEPOMUCENO-MEJÍA; FLORENCIO-MARTÍNEZ; MARTÍNEZ-CALVILLO, 2018). Nesse caso, a segregação cromossômica se dá compartimentalizada no núcleo e guiada pelo fuso mitótico, com a manutenção de toda estrutura nuclear

(AMBIT et al., 2011). Portanto, desvendar a regulação dos processos de segregação cromossômica pode auxiliar a compreensão de eventos como aneuploidia – alteração no número de cromossomos associadas com a perda ou ganho de um ou mais cromossomos no genoma – uma situação comum em parasitos do gênero *Leishmania* (BLACK et al., 2023), situação que também é observado em células tumorais ou em tecidos de órgãos como fígado e placenta, podendo estar associados a síndromes ou incompatibilidade com a vida em humanos (NAGAOKA; HASSOLD; HUNT, 2012). Embora parasitos *Leishmania* se multipliquem por divisão binária em seus hospedeiros vertebrados, evidências recentes sugerem a ocorrência de mecanismos de recombinação de DNA com elementos sugestivos de meiose em *Leishmania*, mediante um estresse externo, seja em cultura ou nos hospedeiros invertebrados (CATTAPRETA et al., 2023; LOURADOUR et al., 2022; SHAIK et al., 2021). Assim, compreender a divisão celular em *Leishmania* pode servir como um modelo valioso para estabelecer padrões de segregação cromossômica em outros grupos na natureza.

1.5 Resposta imune nas leishmanioses

A resistência ou suscetibilidade à infecção por *Leishmania* é influenciada por diversos fatores, como a espécie e cepa do parasito, variações genéticas do hospedeiro, estado imunológico, tamanho do inóculo do parasito, localização e número de picadas do vetor, bem como a microbiota associada ao vetor, incluindo proteínas da saliva e vesículas extracelulares (COSTA-DA-SILVA et al., 2022; DUBIE; MOHAMMED, 2020; OLIVIER; ZAMBONI, 2020). Além disso, os parasitos podem escapar do sistema imunológico do hospedeiro, auxiliando no estabelecimento da infecção (ASSIS et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2020). Os linfócitos T auxiliares desempenham um papel crítico na resposta imune contra o parasito no hospedeiro mamífero. Foi demonstrado que a polarização dessas células em direção à resposta Th1 ou Th2 é um importante determinante do resultado da doença, principalmente com base em investigações usando *L. major* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SCOTT; NOVAIS, 2016).

O combate à *Leishmania* depende do desenvolvimento da resposta imune do tipo 1 (Th1), que é caracterizada pela secreção inicial de interleucina-12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), levando a diferenciação de Th0 em Th1,

que posteriormente, induzem a secreção de interferon- γ (IFN- γ) pelas células T (MÜLLER et al., 1989). Estes por sua vez, induzirão os macrófagos a ativarem seus mecanismos microbicidas por meio da indução da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são altamente eficazes na morte de amastigotas intracelulares (KAYE; SCOTT, 2011). Além disso outras citocinas estão envolvidas na resposta do tipo Th1 como TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-17 e IL-23, sendo fundamentais na imunidade contra à reinfecção (BOGDAN, 2020).

Em contraste, a produção de algumas citocinas chaves produzidas pela resposta Th2, principalmente TGF- β IL-4, IL-10 e IL-13 – citocinas anti-inflamatórias – suprimem a imunidade do hospedeiro e podem favorecer a sobrevivência do parasito (HURDAYAL; BROMBACHER, 2014; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Além disso, aumento da produção de IL-10 na leishmaniose, está associado com a severidade e progressão da doença (KANE; MOSSER, 2001). A IL-10 é uma citocina supressora geral com uma série de efeitos anti-inflamatórios em diversas linhagens imunológicas (OUYANG et al., 2011). Na leishmaniose, a IL-10 é capaz de desativar os mecanismos leishmanicidas dos macrófagos e regular negativamente a expressão de moléculas coestimuladoras, resultando na supressão da resposta imune do hospedeiro (BHATTACHARYYA et al., 2001; NYLÉN; SACKS, 2007; VOULDOUKIS et al., 1997). Também é capaz de inibir a produção de IFN- γ nas células T, com bloqueio da migração de células dendríticas (DC) (ATO et al., 2002). A resposta imune pró-inflamatória Th1, juntamente com a Th2 modulada, com aumento da relação Th1/Th2, é essencial para o controle da leishmaniose (SCOTT; NOVAIS, 2016).

A resposta humoral com soroconversão em IgG específicas para anti-*Leishmania* e suas subclasses são produzidas em baixos níveis durante a LC, mas é modulada positivamente nos casos de LV, embora seu papel não seja completamente compreendido (BOGDAN, 2020).

A geração de memória imunológica é requisito para uma vacinação eficaz. Estudos sobre a geração de células TCD4⁺ efectoras e de memória central indicam que estas medeiam a imunidade de longo prazo à infecção por *L. major* (ZAPH et al., 2004). Idealmente, espera-se que a resposta gerada por uma vacina eficaz mimetize a imunidade duradoura, isto é, a vacina deve ser capaz de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune específica do tipo 1, induzindo células T polifuncionais e de memória de longa duração culminando na eliminação do parasito

(ALVES-SILVA et al., 2017; BERTHOLET et al., 2009). Vale ressaltar que uma resposta imune protetora antileishmania pode envolver: resposta humoral com aumento da razão IgG2a/IgG1, aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-17; assim como a proliferação de linfócitos TCD4+ e TCD8+, além da redução da produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e TGF- β (BANERJEE et al., 2018; REIS et al., 2010).

1.6 Vacina contra as leishmanioses

Tendo em vista as limitações e desvantagens associadas aos tratamentos disponíveis contra as leishmanioses, a vacinação emerge como uma alternativa para o controle e prevenção da doença (MUTISO et al., 2013). Um argumento central que sustenta a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose é o fato de que pacientes que se recuperam da doença, seja de forma natural ou após tratamento medicamentoso, frequentemente desenvolvem imunidade contra a reinfeção (ALVAR et al., 2013; GILLESPIE et al., 2016).

Até o momento, não existe uma vacina licenciada para os diferentes tipos de leishmanioses humanas (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012), porém existem inúmeros candidatos vacinais. No entanto, questões relacionadas ao custo, complexidade antigênica, variabilidade genética e a diversidade de respostas imunológicas produzidas têm limitado o progresso na busca por uma vacina segura e eficaz (SINGH; SUNDAR, 2012). Vários antígenos do parasito estão sendo investigados como candidatos vacinais: desde o parasito vivo atenuado ou morto, proteínas recombinantes de *Leishmania* sp., DNA codificadores de proteínas do parasito, até imunomoduladores (ABDIAN et al., 2011; ARAÚJO et al., 2011; NAGILL; KAUR, 2011; ZORGI et al., 2020).

Os primeiros estudos de vacinas contra as leishmanioses ocorreram no passado, onde eram praticados com sucesso na ex-União Soviética, Oriente Médio e Israel. Esse procedimento envolvia a inoculação com parasitos vivos e virulentos em um processo conhecido como leishmanização. No entanto, essa técnica foi abandonada na maioria dos países devido a problemas bioéticos e questões de segurança, incluindo o desenvolvimento de lesões cutâneas que não cicatrizavam e a persistência do parasito no hospedeiro, aumentando a gravidade em pacientes com supressão imunológica (HANDMAN, 2001).

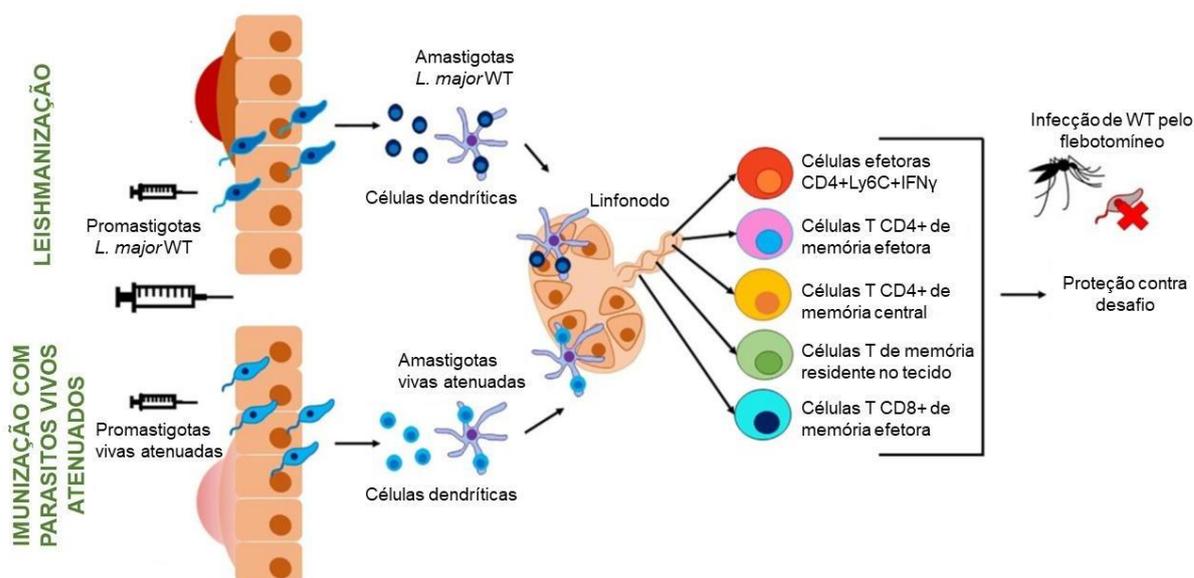
As vacinas contra o parasito *Leishmania* pode ser categorizadas em diferentes formas, de acordo com o antígeno utilizado: I) vacinas de primeira geração, que compreendem em três subgrupos: parasitos totalmente mortos; antígeno de *Leishmania* fracionado e parasitos vivos atenuados; II) segunda geração, que são as derivadas de proteínas recombinantes, produzidas por meio de células geneticamente modificadas, como o exemplo a vacina Leish-Tec[®], licenciada no Brasil, contendo o antígeno A2 de *L. infantum*; III) terceira geração, que são as vacinas de DNA (MOAFI et al., 2019). É importante lembrar que a Leish-Tec[®] teve sua comercialização suspensa devido a problemas de segurança e eficácia (MAPA, 2023). Portanto, no momento, não dispomos de nenhuma alternativa disponível no Brasil, inclusive para cães.

Sabe-se que vacinas compostas por vírus ou bactérias atenuados são consideradas padrão-ouro contra patógenos intracelulares (SEDER; HILL, 2000). Estudos utilizando *Leishmania* viva atenuada têm mostrado ser uma boa estratégia, pois é capaz de produzir uma resposta imune protetora e de longa duração (ANAND; MADHUBALA, 2015; DEY et al., 2013; ISMAIL et al., 2017; KARMAKAR et al., 2021; SOLANA et al., 2017, 2020). Apesar de ser capaz de infectar o hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* viva atenuada não deve manifestar nenhum sinal ou sintoma clínico, mas deve induzir a geração de células de memória (SILVESTRE; CORDEIRO-DASILVA; OUAISSI, 2008). A infecção com *Leishmania* viva atenuada é semelhante a uma infecção por parasitos virulentos, de modo a permitir que o sistema imunológico do hospedeiro interaja com uma grande gama de antígenos de *Leishmania* no desenvolvimento de uma imunidade protetora e prevenindo o risco de manifestação da doença (Figura 4) (SELVAPANDIYAN et al., 2012).

Vários parasitos atenuados foram testados em modelos animais e demonstraram conferir boa proteção em camundongos e hamsters, mesmo na ausência de adjuvante (RIVIER et al., 1999), embora os receios acerca de um possível reestabelecimento da virulência incitem as principais preocupações éticas para o uso em humanos (ALMEIDA et al., 2018). No entanto, a deleção de genes essenciais para a forma amastigota ou de fatores de virulência pode superar essa questão e produzir vacinas de primeira geração candidatas atrativas contra as leishmanioses (MOREIRA; NOGUEIRA; MONTE-NETO, 2023).

A leishmanização sugere que o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas é viável, tanto para animais domésticos quanto para humanos. Os mecanismos moleculares que determinam a aquisição do fenótipo de resistência pós-infecção não são conhecidos em detalhes, mas sabe-se que o processo de diferenciação do parasito para a forma amastigota dentro da célula hospedeira é crucial (SANTI et al., 2018; SELVAPANDIYAN et al., 2009). Neste contexto, buscar alvos que atenuem no estágio de amastigota se torna indispensável para uma vacina viva atenuada, de modo que seja capaz de induzir uma resposta no hospedeiro contra o parasito e gerar memória imunológica a longo prazo.

Figura 4: Esquema representativo da estratégia de leishmanização com parasitos vivos atenuados.



Formas promastigotas de *L. major* virulentas (painel superior) ou parasitos vivos atenuados (painel inferior) são inoculados na pele. A lesão cutânea causada por parasitos selvagens pode ser controlada por termoterapia induzida por radiofrequência. Por outro lado, a infecção utilizando parasitos vivos atenuados não apresenta risco de lesão cutânea. As promastigotas se transformam em amastigotas e são internalizadas por células dendríticas, que migram até os linfonodos drenantes para apresentação de antígenos a linfócitos T. Populações diferentes de células T de memória e efetora são geradas mediante apresentação antigênica. Em função da baixa parasitemia, essas populações persistem no corpo e proveem proteção de longo prazo contra o desafio com cepas virulenta de *Leishmania*. Adaptado de (PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021).

1.7 Manipulação genética em *Leishmania* para obtenção de parasitos vivos atenuados

A edição gênica é uma abordagem que pode ser utilizada para elucidar a função de genes, estabelecer modelos de doenças e melhorar características desejadas de animais e plantas (MA; ZHANG; HUANG, 2014).

Estudos iniciais de Capecchi e Smithies (1985) em células de mamíferos demonstraram que essas células podem incorporar uma cópia exógena de DNA em seu próprio genoma, por meio de um processo chamado recombinação homóloga (CAPECCHI, 1989). Fornecendo um poder sem precedentes para caracterizar os papéis funcionais de vários genes em organismos modelo (LIN; SPERLE; STERNBERG, 1985; SMITHIES et al., 1985).

Em *Leishmania*, a primeira deleção gênica foi reportada em 1990 por Cruz e Beverly, via recombinação homóloga, utilizando fragmentos lineares de DNA contendo um gene que confere resistência à neomicina entre as sequências que flanqueiam o gene a ser deletado (Dihidrofolato redutase-timidilato sintase, DHFR-TS) (CRUZ; BEVERLEY, 1990). No entanto, a manipulação genética de parasitos do gênero *Leishmania* tem sido historicamente desafiadora. A estratégia de deleção convencional mediada por recombinação homóloga em genes de cópias única nos cromossomos dissômicos, envolve múltiplas etapas de clonagem e pelo menos duas rodadas de transfecções contendo diferentes marcadores de resistência para a seleção de mutantes nulos (CRUZ; COBURN; BEVERLEY, 1991). Além disso, espécies de *Leishmania*, devido a mecanismos adaptativos decorrentes de estresse ambientais, o parasito pode ativar processos biológicos que alteram o número de cópias por aneuploidia (NEGREIRA et al., 2023). Portanto, mutações compensatórias podem levar ao fracasso dessa estratégia de edição (ALPIZAR-SOSA et al., 2022).

Repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas/nuclease associada a CRISPR (CRISPR/Cas) – (do inglês – *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated endonuclease*) se configura como um método muito simples e econômico na edição gênica (JINEK et al., 2012). Por notável revolução, a tecnologia foi reconhecida com o prêmio Nobel de Química em 2020, laureando suas descobridoras, a norte-americana Jennifer Doudna e a francesa Emmanuelle Charpentier. O método foi descrito pela primeira vez como um sistema imunológico adaptativo em bactérias e Archea, sendo posteriormente projetado como

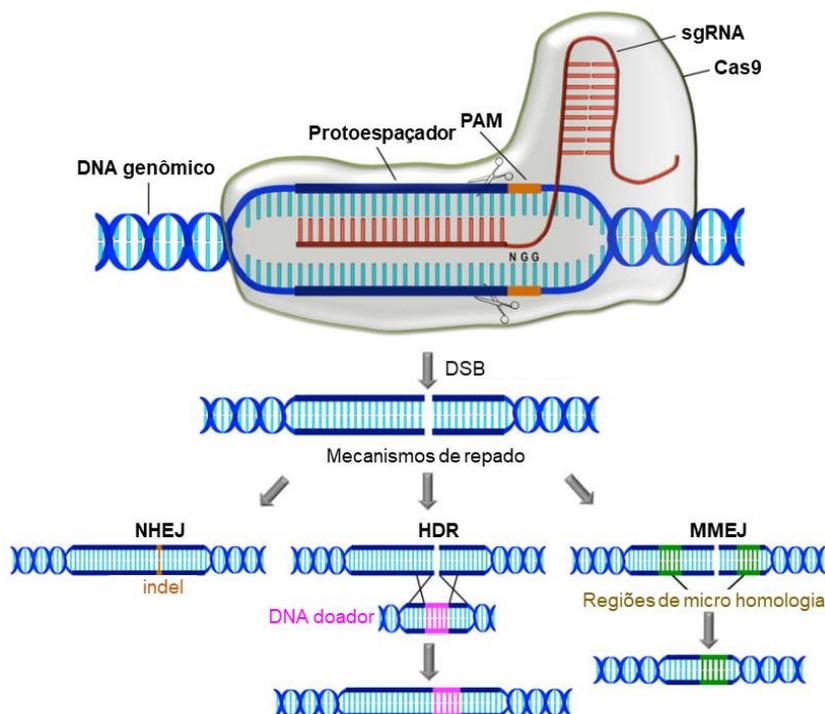
endonucleases guiadas por RNA para edição de genomas (JINEK et al., 2012; MALI et al., 2013; RAN et al., 2013; SHALEM et al., 2014). O sistema CRISPR do tipo II utilizando a nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), é o sistema mais comumente utilizado para edição de genoma, sendo adaptado para muitos organismos (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; YANG, 2015). Esta tecnologia para edição de genes envolve dois componentes principais: um RNA guia único (*single guide RNA* - sgRNA) com sequência complementar ao gene alvo desejado; e a endonuclease Cas9, que formam um complexo ribonucleoproteína no núcleo da célula capaz de reconhecer uma sequência de DNA alvo e produzir uma quebra na fita dupla de DNA (*Double Strand Break* - DSB), levando alterações na sequência do genoma dependente da maquinaria de reparo do DNA do organismo (Figura 5) (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; REDMAN et al., 2016).

O sgRNA pode ser programado para ter como alvo do DNA uma sequência de 20 pb de interesse (protoespaçador) que são complementares (DELTCHEVA et al., 2011). O protoespaçador deve ser localizado imediatamente à montante de um motivo adjacente ao protoespaçador (PAM - *Protospacer Adjacent Motif*), que para Cas9 consiste em uma sequência NGG (onde N é qualquer nucleotídeo e G é uma base de guanina) necessária para o reconhecimento de Cas9. A sequência PAM pode ser encontrado a cada 8 pb em média do genoma (LA RUSSA; QI, 2015).

Ao gerar o DSB no locus do genoma alvo, é ativada a maquinaria de reparo do DNA por meio de junção de extremidade não homóloga (*Non-Homologous End-Joining* - NHEJ) ou reparo direcionado por homologia (*Homologous Directed Repair* - HDR). Na ausência de um molde, NHEJ é ativado, resultando em inserções e/ou exclusões (*Indels*) que interrompem o locus alvo. Na presença de um modelo de doador com homologia ao locus alvo, a via de HDR opera, permitindo que mutações precisas sejam feitas (MA; ZHANG; HUANG, 2014). O NHEJ está ausente em tripanossomatídeos (PASSOS-SILVA et al., 2010), mas a HDR é altamente eficiente quando um molde de DNA é fornecido na reação para induzir o reparo de DSB por micro recombinação homóloga no local de clivagem pela Cas9 (ZHANG; LYPACZEWSKI; MATLASHEWSKI, 2017). Um mecanismo alternativo de reparo de DSB denominado união de extremidade mediada por micro homologia (*Microhomology End-Joining* - MMEJ) foi descrito em tripanossomatídeos e não requer a presença de um modelo de doador de DNA, produzindo pequenas deleções no sítio

DSB. No entanto, é muito menos eficiente do que o HDR e requer a presença de regiões de micro homologia flanqueando o sítio DSB no genoma (GLOVER; JUN; HORN, 2011; LANDER; CHIURILLO; DOCAMPO, 2016).

Figura 5: Representação do sistema CRISPR/Cas9 para edição do genoma.



O sgRNA e a nuclease Cas9 se reúnem no núcleo da célula formando um complexo ribonucleoproteína, em que o sgRNA tem como alvo uma sequência complementar ao DNA genômico de aproximadamente 20 pb (protoespaçador). O protoespaçador está localizado a montante de uma sequência NGG denominada motivo adjacente ao protoespaçador (PAM). A nuclease Cas9 produz uma quebra na fita dupla de DNA (DSB) indicados pelas tesouras na sequência alvo. O reparo posterior do DNA ocorre por mecanismos alternativos descritos até agora. A união de extremidades não homólogas (NHEJ) leva a pequenas deleções (indels) no DNA. O reparo direcionado por homologia (HDR) ocorre na presença de uma molécula de DNA doadora com regiões de homologia correspondente às sequências a montante e a jusante do local de corte de Cas9. O DNA do doador fornece um modelo para induzir o reparo por micro recombinação homóloga. No reparo do DNA por junção de extremidade mediada por micro homologia (MMEJ), a DSB revela micro homologias curtas em cada lado da quebra, que são então alinhadas para guiar o reparo. O reparo por MMEJ sempre leva à deleção da sequência de DNA entre as micro homologias. Adaptado de (LANDER; CHIURILLO; DOCAMPO, 2016).

Este recente sistema baseado em edição de genes revolucionou a maneira como manipulamos os genomas, inclusive *Leishmania*. Esta técnica robusta e precisa permite a interrupção ou marcação de genes, inserindo ou eliminando vários alelos em uma única rodada de transfecção (JINEK et al., 2012). Isso levou os pesquisadores a selecionarem cepas de *Leishmania* vivas atenuadas mais rapidamente e com maior precisão e segurança, incluindo a obtenção de mutantes livres de marcadores (VOLPEDO et al., 2022).

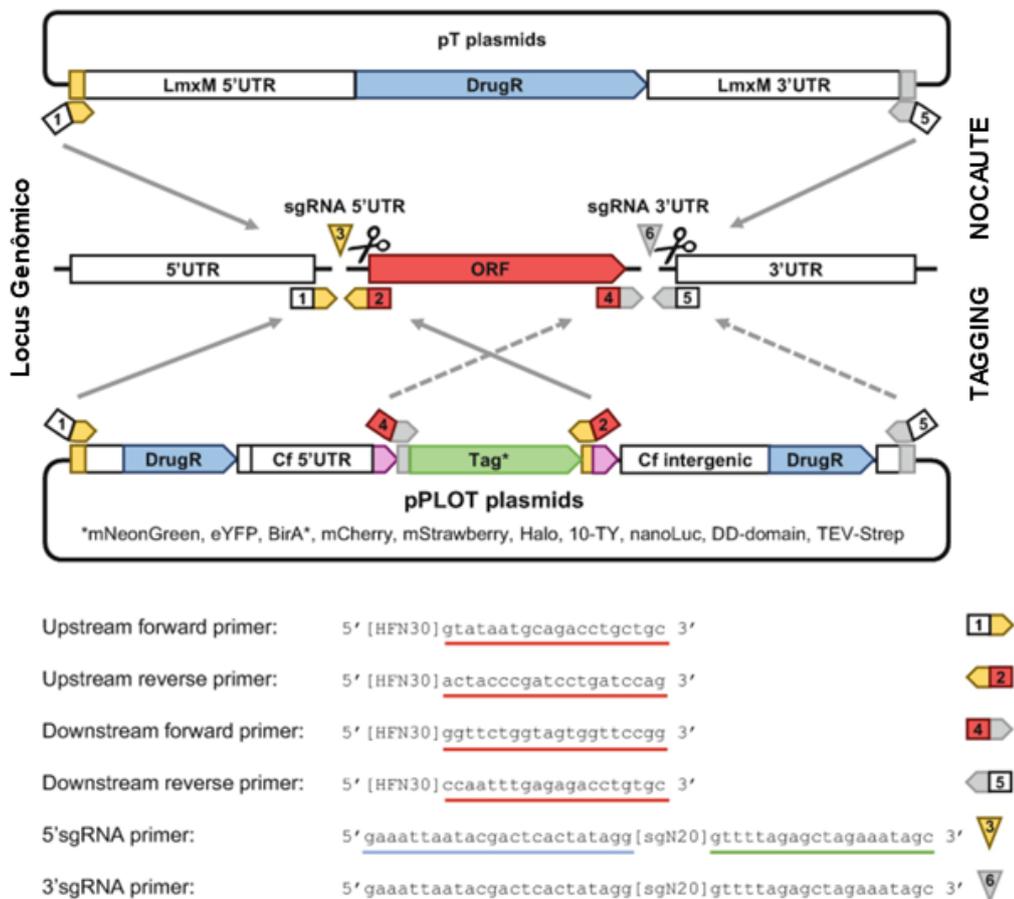
Dentre as diferentes metodologias empregadas para a manipulação genética por CRISPR/Cas9, podemos destacar a edição gênica descrita por Beneke e colaboradores (2019). Este protocolo foi desenvolvido utilizando um sistema de entrega dos RNAs guias (sgRNAs) e dos DNAs doadores que são gerados a partir de PCRs convencionais, onde os iniciadores são projetos por meio de uma plataforma on-line (LeishGEdit.net). Os RNAs guias são posteriormente transcritos *in vivo* pela RNA polimerase T7 (BENEKE; GLUENZ, 2019).

A produção do DNA doador com a finalidade selecionar mutantes nulos (nocatues), foi feita por meio de um sistema de plasmídeos modulares (plasmídeos pT), onde cada plasmídeo serve como modelo para amplificação por PCR de um cassete de reparo selecionável contendo um marcador de resistência a fármaco (BENEKE; GLUENZ, 2019).

A construção do DNA doador com finalidade de marcar de forma estável genes que dão origem a uma proteína-alvo fusionada com fluorescência, são produzidos utilizando os plasmídeos pPLOT, que foram desenvolvidos baseadas nos plasmídeos pPOT de *Trypanosoma brucei*, gerando marcações (*tags*) em sua região N-terminal ou C-terminal, sendo possível a rápida triagem de sua localização subcelular em *Leishmania* (HALLIDAY et al., 2019).

Os sítios de ligação dos iniciadores usados para amplificar o DNA do doador são os mesmos para todos os plasmídeos pT e pPLOT de modo que um conjunto de iniciadores padronizados e um arcabouço de sgRNA projetados para serem complementares às sequências dos alvos, são suficientes para realizar o nocaute e a marcação em *Leishmania* (Figura 6) (BENEKE et al., 2017).

Figura 6: Sistema modular de plasmídeos para edição simplificada de genes.



Estratégia modular para amplificação do DNA doador a partir dos plasmídeos pT e pPLOT. Os números 1 a 6 correspondem aos iniciadores projetados para edição gênica. Os iniciadores 1, 2, 4 e 5 contêm aproximadamente 30 nucleotídeos (HFN30) complementares ao gene que servirão de micro recombinação homóloga após a quebra do DNA pela nuclease Cas9. Os iniciadores 3 e 6 correspondem aos RNAs guias que irão direcionar a Cas9 ao gene alvo. Estes iniciadores (3 e 6) contêm ligados a eles a região promotora da RNA polimerase T7 (sublinhado em azul), seguidos de 20 nucleotídeos complementares ao alvo (sgN20). Exemplos de marcações são descritas nos plasmídeos pPLOT. Adaptado de (BENEKE; GLUENZ, 2019).

1.8 Proteína KHARON1

A proteína KHARON1 (KH1) foi descrita durante a caracterização de um transportador de glicose *LmxGT1* em *L. mexicana*, onde *LmxGT1* é direcionado de forma seletiva da bolsa flagelar para a membrana do flagelo nas formas promastigotas (TRAN et al., 2013). Para elucidar os mecanismos celulares subjacentes ao tráfego flagelar de *LmxGT1* e identificar proteínas que interagem com o transportador, foi empregada uma estratégia de purificação conhecida como TAP (do inglês *tandem-affinity purification* ou purificação de afinidade em tandem (TAGWERKER et al., 2006). Nessa técnica, promastigotas de *L. mexicana* cujo *LmxGT1* foi previamente fusionado com uma cauda de histidina biotilada, são lisadas, e aquelas proteínas que foram capazes de interagir de forma específica com *LmxGT1* são identificadas por espectrometria de massa (TRAN et al., 2013).

A proteína KH1 foi então identificada interagindo especificamente com o domínio de direcionamento flagelar de *LmxGT1*, sendo necessária no encaminhamento eficiente desta permease para a membrana flagelar. O nome da proteína tem inspiração na mitologia grega, na qual o Caronte é o barqueiro de Hades que carrega as almas dos recém-mortos sobre as águas do rio Estige e Aqueronte, que dividiam o mundo dos vivos e o mundo dos mortos (TRAN et al., 2013). Ao utilizar marcadores de KH1 para determinar sua localização subcelular, observou-se que a proteína é encontrada na base do flagelo e ao redor do corpo celular, inclusive em células em divisão, sugerindo que KHARON1 é uma proteína associada ao citoesqueleto, estando ligada a: I) estruturas baseadas em microtúbulos na base do flagelo (TRAN et al., 2013); II) na rede de microtúbulos subpeliculares que se estende por todo o corpo celular do parasito no lado citosólico da membrana plasmática (TRAN et al., 2013) e; III) nos fusos mitóticos (SANCHEZ et al., 2016).

Estudos fenotípicos iniciais de parasitos mutantes deficientes do gene *kharon1*, utilizando espécies de *L. mexicana* e *L. infantum* (*Lmexkh1^{-/-}* e *Likh1^{-/-}* respectivamente), mostraram que em *L. mexicana* as promastigotas são fortemente prejudicados em direcionar *LmxGT1* para a membrana do flagelo, sendo o tráfego dessa permease interrompido na bolsa flagelar. No entanto, tanto para *L. mexicana* quando para *L. infantum*, a deficiência do gene *kharon1* não compromete a viabilidade do parasito e nem o transporte de glicose para o interior das células (SANTI et al., 2018; TRAN et al., 2013). As promastigotas são capazes de infectar os macrófagos,

se diferenciar em amastigotas, mas não são capazes de sustentar a infecção, morrendo em alguns dias após o estabelecimento da infecção inicial, indicando desempenhar um papel crítico nesse estágio de vida do parasito (SANTI et al., 2018; TRAN et al., 2013).

Ainda não se sabe a função precisa de KH1 em amastigotas, especialmente porque a proteína *LmxGT1* não é expressa neste estágio do ciclo de vida (MARIC; EPTING; ENGMAN, 2010). Assim, o comprometimento do crescimento de amastigotas não pode ser atribuído à falha em direcionar *LmxGT1* adequadamente dentro de amastigotas (TRAN et al., 2013).

A investigação em amastigotas infecciosas de *Leishmania* tanto em macrófagos *in vitro* quanto no modelo murino, mostraram que as amastigotas deficientes de *kh1* replicam o núcleo, cinetoplasto e o flagelo, mas não sofrem citocinese, como consequência se acumulam como células multinucleadas dentro dos macrófagos (SANTI et al., 2018; TRAN et al., 2015). Além disso, mutantes nulos para *kharon1* (*Lmexkh1^{-/-}*) se mostraram avirulentos em infecção de BALB/c (TRAN et al., 2015).

Em ambas as espécies, a infecção experimental *in vitro* mostrou que os *Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}* foram incapazes de manter a infecção nos macrófagos por mais de 16 dias. Após 10 a 12 dias de infecção, quase todos os parasitos possuem mais de dois núcleos, um fenótipo que culmina com a morte dos mesmos (SANTI et al., 2018; TRAN et al., 2013).

As promastigotas de *Likh1^{-/-}* exibiram um padrão de crescimento semelhante ao da linhagem selvagem, no entanto, sugerem uma diferença na morfologia da célula em sua região posterior, mas não afetam a viabilidade do parasito. A análise do ciclo celular de amastigotas demonstraram células concentradas na fase G2/M (SANTI et al., 2018). Camundongos imunizados com *Likh1^{-/-}* tiveram carga parasitária reduzida ao serem desafiados com *L. infantum* virulenta, além de um efeito associado ao aumento dos níveis séricos de IgG específicos e produção de IL-17. Assim, parasitos *Likh1^{-/-}* apresentam fenótipo infeccioso atenuado devido ao defeito da citocinese, ao passo que induz imunidade contra leishmaniose visceral em modelo de camundongo, sendo um candidato vacinal contra leishmaniose visceral (SANTI et al., 2018).

As três localizações subcelulares descritas para KH1 (região da bolsa flagelar, rede subpeliculares de microtúbulos e fuso mitótico) levantam a questão de que a

proteína poderia estar associada a múltiplas funções (SANCHEZ et al., 2016; TRAN et al., 2013). Onde a localização de KH1 na base do flagelo, possivelmente está associada com a função de direcionamento do GT1 para a membrana do flagelo em promastigotas (KELLY et al., 2020). O fato de GT1 não ser expresso de forma estável em amastigotas intracelulares, fornece evidência de que, provavelmente, o direcionamento dele por KH1 não deve ser o mecanismo associado com a atenuação *in vivo* (KELLY et al., 2020). Embora KH1 possa ser responsável pelo tráfego de outras proteínas desconhecida para o flagelo em amastigota, uma possibilidade distinta é que a falha de *kh1* em amastigotas relacionados à citocinese podem refletir a uma função correspondente as suas outras localizações, seja no citoesqueleto subpelicular ou no fuso mitótico. Além disso, KH1 pode estar associada a diferentes complexos multiproteicos com subunidades distintas e propriedades únicas, podendo estar associadas devido a suas diferentes localizações. Se esta hipótese estiver correta, pode ser possível identificar parceiros KH1 únicos que podem ajudar a desenvolver funções múltiplas desta proteína e atribuir diferentes papéis funcionais (KELLY et al., 2020).

Análises de sequências públicas, revelaram que KHARON1 é conservada em todos os cinetoplastídeos cujos genomas foram sequenciados, mas a ORF não foi identificada em organismos superiores, portanto sem ortólogos descritos. Assim, KHARON1 é considerada como uma proteína específica de cinetoplastídeos (TRAN et al., 2013). Em *L. infantum* o gene correspondente a proteína (*LinJ.36.6110*) possui 1593 pb e *L. mexicana* (*LmxM.36.5850.1*) *Kh1* contém 1563 pb, e ambos estão localizados no cromossomo 36, que são dissômicos.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços dedicados nos últimos anos ao desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses, ainda não há nenhum método profilático seguro e eficaz disponível. Além disso, os tratamentos atualmente disponíveis são limitados e, em algumas situações, podem ser ineficazes (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). Diante deste cenário, é urgente a busca por alternativas vacinais para o controle das leishmanioses.

Vacinas utilizando parasitos vivos atenuados representam uma opção para uma alternativa terapêutica. Isso ocorre porque infecção por *Leishmania* atenuada é semelhante à infecção por parasitos patogênicos, de forma que ocorra apresentação de vários antígenos do parasito para às células do sistema imune, induzindo a produção de células de memória, além de serem muito imunogênicas, dispensando o uso de adjuvantes (PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021).

Dentre os possíveis alvos para a deleção e geração de uma cepa atenuada, a proteína KHARON1 tem se demonstrado um candidato promissor, capaz de induzir resposta imune sem a manifestação da doença clínica (SANTI et al., 2018). Assim, o presente estudo teve como primeiro objetivo obter cepas vivas atenuadas de *Leishmania* spp. mediante a deleção do gene *kh1* utilizando CRISPR/Cas9, e posteriormente, avaliar o potencial vacinal desses mutantes. Além disso, há poucos estudos sobre a dinâmica da divisão celular em *Leishmania* e os mecanismos de segregação cromossômica. Portanto esses mutantes, se tornam uma ferramenta útil na elucidação de processos básicos que podem servir para apontar processos vitais e, conseqüentemente, identificar novos alvos quimioterápicos. Nesse sentido, trabalho também teve como objetivo, avaliar os níveis de transcritos diferencialmente expressos no contexto de *kharon1*.

Este projeto tem caráter translacional que objetiva reduzir o distanciamento entre a produção do conhecimento em laboratórios e sua aplicação médica, utilizando conceitos de genética para solucionar um problema de saúde pública mundial. Os resultados obtidos são passíveis de proteção intelectual com relevância econômica e social, sendo importantes para o desenvolvimento científico e tecnológico do país, contribuindo assim para a erradicação e controle das leishmanioses e promovendo a saúde e bem-estar social.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter cepas atenuadas de *Leishmania infantum* e *Leishmania mexicana* mediante deleção do gene *kharon1* para serem utilizadas em estudos de profilaxia contra a leishmaniose visceral e como ferramenta para compreender a dinâmica da divisão celular.

3.2 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar mutantes de *L. infantum* e *L. mexicana* deficientes em *kharon1*;
- Avaliar a indução da proteção das cepas vivas atenuadas por meio de duas metodologias:
 - Avaliação da imunogenicidade de *Likh1^{-/-}*, seguido da análise de proteção homóloga, utilizando o esquema de leishmanização com *Likh1^{-/-}* e desafio com espécie de *L. infantum* selvagem;
 - Avaliação da imunogenicidade de *Lmexkh1^{-/-}*, seguido da análise de proteção heteróloga, utilizando o esquema de leishmanização com *Lmexkh1^{-/-}*, e desafio com espécie de *L. infantum* selvagem.
- Avaliar a modulação de transcritos para alvos associadas ao citoesqueleto e a divisão celular no contexto de *Kharon1* em *L. infantum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção dos parasitos

4.1.1 Parasitos para nocaute, marcação de proteínas e vacinação

Formas promastigotas das espécies: *Leishmania (Leishmania) infantum* JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-724) e *Leishmania (L.) mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) foram cultivados a partir de culturas criopreservadas, as quais foram descongeladas a temperatura ambiente e seu conteúdo transferido para um tubo Falcon de 15 mL contendo 10 mL de meio α -MEM (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*). As células foram centrifugadas a 1700 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 mL de meio α -MEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*), previamente inativado pelo calor, 5 μ g/mL de hemina e 5 μ M de biopterina em pH 7,04 (meio completo). A suspensão celular foi transferida para garrafas de cultivo celular T-25 (25 cm²) (*Sarstedt*) e mantida em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 26 °C.

O acompanhamento das culturas foi realizado por observação em microscópio invertido (*Olympus CK2*) utilizando uma objetiva de 40x. Para a manutenção dos parasitos foram realizados repiques a cada três dias de acordo com os dias da curva de crescimento. As contagens do número de células foram realizadas em câmara de Neubauer (*New Optics*) espelhada, de 0,1 mm² de profundidade e as culturas foram mantidas utilizando-se inóculo de 1 x 10⁶ parasitos/mL no volume final de 5 mL de α -MEM completo. Os parasitos foram congelados na fase logarítmica de crescimento em criotubos de criopreservação de 2 mL contendo meio α -MEM suplementado com 20 % de SFB, 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados em ultrafreezer à -80 °C no banco de criopreservação do grupo de pesquisa.

As espécies de *Leishmania* utilizadas foram confirmadas por tipagem utilizando a amplificação do gene AQP1 seguida de sequenciamento por Sanger (Apêndice I).

4.1.2 Parasitos para o desafio experimental

Para a realização do desafio experimental foram utilizadas formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46) recuperadas do baço de hamsters infectados (*Mesocricetus auratus*). A cepa utilizada foi isolada de um cão sintomático proveniente da cidade de Governador Valadares, Minas Gerais/Brasil e foi caracterizada pelo grupo de pesquisa do laboratório de imunopatologia do Núcleo

de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) utilizando a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction* (PCR-RFLP) (MOREIRA et al., 2009). A cepa está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob registro A12DF71, e apresentou alta virulência mostrando ser patogênica nos modelos hamster e camundongo (MOREIRA et al., 2009; REIS et al., 2017).

Para a infecção experimental os parasitos foram mantidos *in vivo* em hamsters alojados no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os parasitos foram isolados a partir de fragmentos de baço mantidos em meio ágar-sangue, *Nicolle-Novy-Neal* (NNN), associado ao *Liver Infusion Tryptose* (LIT- produzido *in house*) suplementado com 10 % SFB e mantidos em BOD a 24 °C durante 10 dias. Após este período, foram realizadas passagens da cultura em *erlenmeyers* utilizando-se inóculo de 1×10^6 parasitos/mL contendo apenas meio LIT com 10 % de SFB até a obtenção de uma cultura pura estável para realização dos ensaios biológicos e não ultrapassando a quarta passagem de repique para garantir a infectividade. Para o armazenamento, os parasitos foram congelados na fase logarítmica de crescimento em criotubos de criopreservação de 2 mL contendo meio LIT suplementado com 20 % de SFB, 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados em ultrafreezer à -80 °C no banco de criopreservação do grupo de pesquisa.

4.2 Cultivo e manutenção das células THP-1

As células derivadas da linhagem monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202) foram cultivadas a partir de ampolas criopreservadas, elas foram descongeladas a temperatura ambiente, seu conteúdo transferido para um tubo Falcon de 15 mL com 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*). As células foram centrifugadas a $150 \times g$ por 5 min, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado com 25 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 2 g/L de NaHCO_3 , 10 % de SBF, previamente inativado pelo calor, 1.000 unidades/mL de penicilina e 10.000 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*) (meio completo). As células foram transferidas para garrafas plásticas de cultivo T-75 (75 cm^2) (*Sarstedt*) e mantidas em estufa a 37 °C (*Forma Scientific*) com atmosfera úmida de 5 % de CO_2 . Para a manutenção, as células foram contadas em câmara de Neubauer

(New Optics) espelhada, de 0,1 mm² de profundidade e realizados repiques a cada três dias, sendo inoculadas 5 x 10⁵ células/mL para o volume final de 25 mL de meio RPMI em garrafas T-75 (*Sarstedt*). O monitoramento cotidiano das células, no intuito de acompanhar possíveis contaminações e confirmar a morfologia celular, foi realizado por meio da observação em microscópio invertido (*Olympus CK2*) utilizando uma objetiva de 20x. O congelamento das células foi realizado em criotubos de 2 mL com uma solução contendo meio RPMI 1640 completo e 5 % de DMSO, armazenados em ultrafreezer -80 °C.

4.3 Preparo de bactérias cálcio competentes

Cem microlitros de uma cultura de *Escherichia coli*, cepa DH5 α , mantida congelada a -80 °C foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio LB (*Luria Bertani*) e incubada sob agitação constante a 37 °C por 16 h em *Shaker Thermo MaxQ 4000* (*Thermo Scientific*). Após a incubação, foi transferido 1 mL do pré-inóculo para 24 mL de meio LB líquido, mantendo-se sob agitação a 37 °C por aproximadamente 1 h e 30 min.

A densidade óptica da cultura foi monitorada a uma absorbância de 590 nm até que a mesma atingisse valores entre 600 e 700 nm. A cultura foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada a 2.400 x *g* por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com 5 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1 M gelado e estéril seguido da incubação no gelo por 20 min. Após esse período, centrifugou-se novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado com 2 mL de CaCl₂ 50 mM estéril e gelado. As células foram aliqüotadas em microtubos *ependorf* de 1,5 mL contendo 200 μ L da cultura de *E. coli* DH5 α com 20% de glicerol estéril e colocados imediatamente em gelo seco, onde posteriormente foram armazenadas em ultrafreezer -80 °C.

4.4 Clonagem dos plasmídeos em bactérias cálcio competentes

Os plasmídeos utilizados para a seleção de *Leishmania* mutantes (Tabela 1), foram clonados em bactérias *E. coli* DH5 α cálcio competentes por transformação utilizando choque térmico. Para este fim, as bactérias foram descongeladas a partir do banco criopreservação e foram feitas alíqüotas de 100 μ L em *ependorfs* de 1,5 mL onde foram adicionados entre 20-30 ng de plasmídeo. Uma alíqüota sem adição

de plasmídeo foi utilizada como controle negativo. As alíquotas foram mantidas por 30 min no gelo e após esse período foi realizado o choque térmico em banho seco (*Thermomixer compact, Eppendorf*) a 42 °C por 2 min, em seguida os microtubos foram transferidos em gelo por 10 min. Foram adicionados 800 µL de meio LB sem antibiótico, seguido de incubação a 37 °C por 45 min em agitação de 250 rpm no *Shaker Thermo MaxQ 4000 (Thermo Scientific)*. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio LB sólido (LB + ágar) na presença de ampicilina (*Sigma-Aldrich*[®]) a 100 µg/mL seguido da incubação por 18 h a 37 °C estufa. Posteriormente as colônias brancas (positivas) foram selecionadas e os clones foram crescidos em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL). Os plasmídeos foram purificados utilizando o kit “*Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System*” (*Promega*) conforme orientações do fabricante. Após a purificação, a concentração dos plasmídeos foi mensurada em espectrofotômetro *NanodropTM ND-100 (Thermo Scientific)* e armazenados a -20 °C.

Tabela 1: Plasmídeos clonados em *E. coli* DH5α.

Nome	Expressão proteica	Resistência	Cassete Tag 5'	Tamanho (kb)
pTB007	hSpCas9, T7 RNAP*	Higromicina HYG	-	-
pTBlast	blastidina-S desaminase	Blasticidina (BSD)	-	1.70
pTNeo	neomicina fosfotransferase	Neomicina (NEO)	-	1.75
pTPuro	puromicina N-acetiltransferase	Puromicina (PAC)	-	1.80
pPLOT-mNG puro-puro	puromicina N-acetiltransferase	Puromicina (PAC)	Myc ₍₃₎ ::mNeonGreen	2.30
pPLOT-mNG blast-blast	blastidina-S desaminase	Blasticidina (BSD)	Myc ₍₃₎ ::mNeonGreen	2.10

*hSpCas9: Nuclease Cas9; T7 RNAP: RNA polimerase T7

4.5 Transfecção em *Leishmania*

A geração das linhagens mutantes de *L. infantum* e *L. mexicana* foi realizada por meio de emprego do sistema da edição de DNA utilizando CRISPR/Cas9 conforme descrito por Beneke e colaboradores (2017). Inicialmente foram geradas formas de promastigotas de *Leishmania* expressarem a nuclease Cas9 e RNA polimerase T7 de forma constitutiva. Para este fim, foram transfectados nos parasitos o plasmídeo episomal pTB007, que contém: (i) o gene codificante da Cas9 de *Streptococcus*

pyogenes humanizado (hSpCas9) contendo um sinal de localização nuclear; (ii) a sequência que corresponde a RNA polimerase T7 e; (iii) uma sequência que codifica a higromicina fosfotransferase (HYG), cujo produto garante a seleção dos mutantes na presença do antibiótico higromicina (Tabela 1).

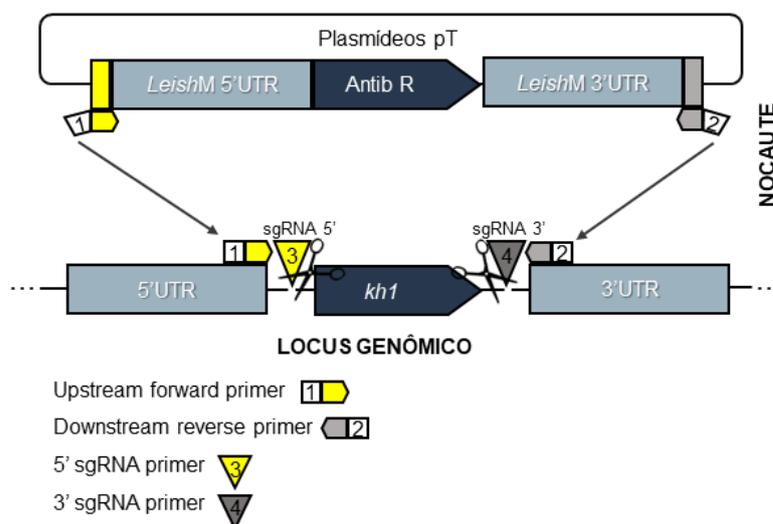
Promastigotas de *Leishmania* em fase log de crescimento com 1×10^8 parasitos foram centrifugados a $1700 \times g$ por 5 min, lavadas uma vez em solução *Citomix* 1x (66,7 mM de Na_2HPO_4 , 23,3 mM de NaH_2PO_4 , 5 mM de KCl, 50 mM de HEPES, 150 μM CaCl_2 , pH 7.4). O *pellet* foi ressuscitado em 400 μL de *Citomix* 1x e a cultura transferida para cubetas de eletroporação de 2 mm (*Bio-Rad*) com 20 μg de DNA circular e colocadas imediatamente no gelo por 15 min. Uma cultura de *Leishmania* sem a presença do plasmídeo foi utilizada como controle negativo. 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. Foram estabelecidos intervalos de 10 a 15 s entre os pulsos e as constantes ideais dos pulsos foram mantidas entre 3 e 6 ms. As cubetas foram mantidas no gelo por 10 min e em seguida as células foram transferidas para garrafas T-25 (*Sarstedt*) contendo 10 mL de meio α -MEM completo e mantidas em cultivo a 26 °C por 24h na BOD. Após o período, a cultura foi dividida em duas garrafas T-25 (*Sarstedt*) com 5 mL cada e adicionou-se a concentração (v/v) de HYG para a seleção das células positivas (Tabela 4). Após a seleção, as células positivas (Cas9⁺/RNAP T7) foram mantidas em cultura na presença da pressão seletiva de HYG.

4.6 Produção dos RNAs guias e DNAs doadores destinados a deleção de *Kharon1*

A produção dos RNAs guias 5' e 3' (SgRNA5' e sgRNA3' respectivamente) e dos DNAs doadores foram realizados por PCR convencional seguido da co-transfecção nas promastigotas de *Leishmania* spp. Cas9⁺/RNAP T7. Os RNAs guias foram amplificados utilizando o iniciador do promotor G00 da RNAP T7 com os iniciadores complementares do gene alvo - 5' sgRNA *primer* ou 3' sgRNA *primer*. O DNA doador com a finalidade de substituir o alvo deletado (KO ou nocate), foi feito pela amplificação de um plasmídeo modular (plasmídeos pT) (Tabela 1). Os iniciadores utilizados *upstream* senso (F ou *forward*) e *downstream* antisenso (R ou *reverse*) corresponde à sequência gênica de cada espécie com aproximadamente 30

nucleotídeos, gerando DNAs doadores contendo regiões de micro recombinação homóloga juntamente com o marcador de resistência a antibiótico (Figura 7).

Figura 7: Estratégia de amplificação dos plasmídeos pT destinados ao nocaute de *kharon1* em *Leishmania*.



A imagem representa de forma esquemática a geração de um DNA doador por PCR para o reparo das fitas após a quebra realizada pela Cas9 guiada pelos RNAs guias. Para deletar o gene alvo são necessários dois sgRNAs que irão direcionar a Cas9 à montante (5') e à jusante (3') do gene. Um conjunto de 2 iniciadores de aproximadamente 30 nt, complementares às regiões não traduzidas que flanqueiam o gene, é necessário para amplificar os plasmídeos destinados à construção do cassete de DNAs doadores. Os iniciadores 5'sgRNA e 3'sgRNA são ligados ao promotor da T7 RNAP por PCR de *in vitro*, onde após transfecção, são transcritos em sgRNAs *in vivo* pelo próprio parasito, utilizando a RNA polimerase T7 previamente transfectada (Adaptado de BENEKE et al., 2017). Antib R: gene contendo marcador de seleção que confere resistência ao antibiótico; *kh1*: gene *kharon1* que será deletado.

As tabelas 2 e 3 mostram os iniciadores e as condições das PCRs utilizados, respectivamente.

Tabela 2: Iniciadores utilizados destinados ao nocaute de *kharon1* e confirmação da deleção.

Ensaio	Gene	nº	Iniciador	Sequência (5' → 3')
PCR	<i>Kharon1</i> <i>L. inf.</i> LINF_360068400	1	Iniciador universal sgRNA	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAG TTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACCTGC TATTTCTAGCTCTAAAAC
		2	5' sgRNA F	AGGGGAGGTCTTGATAAGCG
		3	3' sgRNA F	TAAGAAGCAGCACCACCCCT
		4	Upstream F	CCACGCAGAAGTCTCTCTCCGCTCCTCCCA
		5	Downstream R	GGATCTAAGTTCAAGTGCGGTGATGCTCCC
	<i>Kharon1</i> <i>L. mex.</i> LmxM_36.5850	6	5' sgRNA F	AGTACTCGAGACGGCAAGGA
		7	3' sgRNA F	CAGGGAGCATCAGCTAACAG
		8	Upstream F	CCACGCTCATTCAAACCTGCCCTCTTCCC
		9	Downstream R	ATTTTGCTGAGGGGTGGTTTCCTGCGTCAT
PCR confir- mação	<i>Kharon1</i> <i>L. inf.</i> LINF_360068400	10	5UTR out confirmação	TCTCTCGACCGGTGTGTTTCTA
		11	Gene interno confirmação	GCTCGTCATGAAGTACTCATCCGTC
	<i>Kharon1</i> <i>L. mex.</i> LmxM_36.5850	12	5UTR out Confirmação	TCTACCCTCCTCTCACTCGC
		13	Gene interno confirmação	GGTGGAGTCGTCATAGTTGGT
		14	BSD_C-term KO confirmação	CACTATCGCTTTGATCCCAGGA
		15	NEO_C-term KO confirmação	GGTCAGCCCATTGCGCCG
		16	PAC_C-term KO confirmação	CCTCTACTCCTGGAAGAACAAC

O desenho dos iniciadores utilizados destinados às deleções foi feito usando a plataforma *LeishGEdit* (<http://leishgedit.net/>). Os iniciadores para confirmações foram projetados na plataforma *online Primer QuestSM* (www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antisenso)

Tabela 3: Condições das PCRs convencionais

Produto	Enzima	Reação		Programa		
sgRNA	<i>Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	Componente	Volume (µL)	Desnaturação inicial	98 °C – 30 s	1 ciclo
		Iniciador G00' (10 µM)	0,5	Desnaturação	98 °C – 10 s	
		Iniciador 5' ou 3' sgRNA (10 µM)	0,5	Anelamento	60 °C – 30 s	35 ciclos
		<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0,2	Extensão	72 °C – 15 s	
		dNTPs (10 nM)	0,5	Extensão Final	72 °C – 10 min	1 ciclo
		Tampão 5x	4			
		MgCl (50 mM)	1,5			
		H ₂ O	12,8			
DNAs doadores	<i>Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	Plasmídeo (DNA doador)	0,5	Desnaturação inicial	95 °C – 3 min	1 ciclo
		Iniciador F	1	Desnaturação	95 °C – 30 s	
		Iniciador R	1	Anelamento	65 °C – 30 s	35 ciclos
		<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0,2	Extensão	72 °C 2 min e 15 s	
		dNTPs (10 nM)	1	Extensão Final	72 °C – 5min	1 ciclo
		Tampão 5x	8			
		MgCl (50 mM)	1,5			
		H ₂ O	26,8			

As PCRs foram realizadas no termociclador *Veriti (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific)*. Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antissenso)

4.7 Eletroforese em gel de agarose

As cromatografias de DNA foram realizadas por eletroforese em gel de agarose (*Sigma*), foram utilizados géis com concentrações de 0,8 % e 1,5 % (p/v), e marcados com o intercalante de DNA *GelRed™ (Biotium, Inc)* na proporção de 1:10.000. Para estimar os tamanhos dos fragmentos, foi utilizado o marcador de peso molecular DNA *Ladder 1 kb plus (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific)*. As eletroforeses foram realizadas a 120 V em tampão de corrida TBE 1x (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) em suporte de eletroforese BRL Horizontal Gel *Eletrophoresis Horizon 11.14 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific)*. As imagens foram obtidas utilizando o equipamento *ImageQuant Las 4000 (General Electric)*.

4.8 Transfecção em *Leishmania* expressando a Cas9⁺/RNAP T7

Promastigotas de *L. infantum* e *L. mexicana* (Cas9⁺/RNAP T7) foram centrifugados 1×10^7 parasitos em tubo *ependorf* de 1,5 mL a $630 \times g$ por 2,5 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado com tampão de transfecção *citomix* 1x estéril em um volume final de 200 μ L, considerando os volumes finais dos produtos de PCR utilizados (Tabela 3). Ao citomix foram adicionados de forma concomitante os produtos de amplificação tanto para sgRNAs (5'sgRNA, 3'sgRNA) como para dois cassetes de DNA doador (um marcador de seleção para cada alelo). Toda solução foi transferida para uma cubeta de transfecção (*Bio-Rad*) e a eletroporação foi realizada usando um pulso com o programa X-001 no *Nucleofector*TM IIb (*Lonza*). Após a eletroporação, as culturas foram transferidas para garrafas T-25 (*Sarstedt*) com 10 ou 15 mL de meio α -MEM completo e mantidas em estufa BOD a 26 °C por 24 h. Posteriormente as culturas foram divididas em garrafas T-25 (*Sarstedt*) com um volume final de 5 mL de meio α -MEM e adicionados diferentes combinações dos respectivos antibióticos de acordo com seus marcadores de seleção (Tabela 4). Como controle negativo, utilizou-se culturas apenas com tampão de transfecção sem adição de produtos de PCR.

Tabela 4: Concentrações dos antibióticos utilizados para seleção dos mutantes de *Leishmania*.

Gene	Antibiótico	Concentração	
		<i>L. infantum</i>	<i>L. mexicana</i>
Higromicina fosfotransferase	Higromicina B (HYG)	150 μ g/mL	50 μ g/mL
Blasticidina-S desaminase	Blasticidina (BSD)	20 μ g/mL	20 μ g/mL
Neomicina-fosfotransferase	Neomicina (NEO)	30 μ g/mL	10 μ g/mL
Puomicina N-acetiltransferase	Puomicina (PAC)	30 μ g/mL	50 μ g/mL

Higromicina: *Invitrogen*; Blasticidina: *InvivoGen*; Neomicina: *InvivoGen*; Puomicina: *Invitrogen*

Após a seleção, foi realizada a extração do DNA genômico (gDNA) seguida de PCRs convencionais para a confirmação da deleção do gene e inserção dos DNAs doadores nas linhagens mutantes. Para este fim, foram utilizados iniciadores senso correspondentes às regiões 5' UTR do gene em conjunto com os iniciadores antisense que têm como alvo regiões internas das sequências que correspondem aos marcadores de resistência. Os iniciadores e as condições das PCRs estão descritos nas tabelas 2 (PCR de confirmação) e 3 (amplificação de DNA doador). Além disso, a

PCR quantitativa em tempo real (qPCR), utilizando os iniciadores para o gene de interesse (*kh1*), foi empregada para avaliar a dosagem gênica de *kh1* na *Leishmania*.

4.9 Extração de DNA genômico

Culturas com aproximadamente 1×10^8 promastigotas totais de *L. infantum* e *L. mexicana* em fase exponencial de crescimento foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas por 5 min a $1700 \times g$. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado 1x em tampão fosfato-salino 1X (PBS 1X). Após a obtenção do *pellet*, as células foram lisadas com 500 μ L de DNAzol[®] (Gibco), seguida da adição de etanol 99 % (Sigma-Aldrich[®]) no volume 1:1 (DNAzol:Etanol) para precipitação das proteínas e do DNA. O DNA foi removido mecanicamente com o auxílio de uma alça bacteriológica (Sigma-Aldrich[®]) de 10 μ L e após três lavagens com álcool 70 %, o DNA foi ressuscitado em água livre de DNase e RNase e quantificado por espectrometria no aparelho ND-100 (NanodropTM).

4.10 Quantificação do número de cópias gênicas

A qPCR foi realizada para determinar o percentual de perda do número de cópias de *kh1*. Os DNAs genômicos dos parasitos extraídos foram amplificados com iniciadores para *kh1* descritos na tabela 5. As reações foram realizadas utilizando o kit Power SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems[®]) no qual a intensidade de fluorescência emitida pelo SYBR Green ao intercalar na fita dupla de DNA genômico é proporcional à quantidade de DNA produzida, aumentando a cada ciclo. A fluorescência emitida é convertida em uma curva de amplificação e a quantidade de DNA é então calculada. Os valores de Ct (*cycle threshold*) são inversamente proporcionais à quantidade inicial de DNA. A quantificação relativa foi obtida pela comparação com o *background* selvagem. Foi utilizado o gene constitutivo *GAPDH* de *L. infantum* e *L. mexicana* (LinJ.36.2480, LmxM.29.2980, respectivamente) como normalizador. Em cada reação foram utilizados 100 ng de DNA genômico. Os ensaios de qPCR foram realizados na plataforma de PCR em tempo real do IRR/Fiocruz Minas. Os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Applied Biosystems 2004). As condições e programas das reações estão descritos na tabela 6. Os iniciadores utilizados para qPCR foram avaliados quanto sua eficiência, sendo considerados positivos com $R^2 > 0.9$ e eficiência entre 90-110 % (Apêndice II).

Tabela 5: Iniciadores de qPCR utilizados para avaliar a dosagem gênica.

Ensaio	Gene alvo	n°	Iniciador	Sequência (5' → 3')
qPCR	<i>LinJ.36.2480</i> (<i>GAPDH</i>)	17	<i>GAPDH_F</i>	TCTGGAGAAGCCAGCAACGTACAA
	<i>LinJ.36.2480</i> (<i>GAPDH</i>)	18	<i>GAPDH_F</i>	ATGAGACGAGCTTGACGAAGTGCT
	<i>LinJ.36.6110</i> (<i>kh1</i>)	19	<i>kh1_F</i>	CCTCCTCGCAACAACCTTCA
	<i>LinJ.36.6110</i> (<i>kh1</i>)	20	<i>kh1_R</i>	GTCACGGTTACAGTTGGGATAG
	<i>LmxM.29.2980</i> (<i>GAPDH</i>)	21	<i>GAPDH_F</i>	GGTAAGCTCGGTGTGGATTAC
	<i>LmxM.29.2980</i> (<i>GAPDH</i>)	22	<i>GAPDH_R</i>	CGCTGATCACGACCTTCTTC
	<i>LmxM.36.5850</i> (<i>kh1</i>)	23	<i>kh1_F</i>	TCTACCCTCCTCTCACTCGC
	<i>LmxM.36.5850</i> (<i>kh1</i>)	24	<i>kh1_R</i>	CAGACTCGTTCGCCTTGTTA

O desenho dos iniciadores foi feito usando a ferramenta online *Primer QuestSM* (www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antissenso)

Tabela 6: Condições da qPCR.

Enzima	Reação	Programa
<i>Power SYBR®</i>	Componente	Desnaturação inicial 95 °C – 5 min 1 ciclo
	Mix (SYBR Green)	Desnaturação 95 °C – 15 s 45 ciclos
<i>Green PCR Master Mix</i>	Iniciador F	Anelamento 60 °C – 15 s
	Iniciador R	Extensão 72°C – 30 s
	DNA molde (100 ng/μL)	Extensão Final 72 °C – 5 min 1 ciclo
	H ₂ O	

Vol.: Volume; Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antissenso)

4.11 Clonagem celular da população mutante

Após a confirmação da deleção de uma ou ambas as cópias do gene *kh1*, foi realizada a clonagem celular da população de *Leishmania* mutante crescendo sob pressão do antibiótico de interesse. A seleção de clones tem o objetivo de homogeneizar uma população clonal a partir dos parasitos que sofreram transfecção, cuja eficiência não atinge 100 % e pode manter uma população mais heterogênea. Para tal foi utilizada a estratégia de diluição limitante. Populações de 1×10^5 promastigotas foram diluídas em PBS 1X por diluições de 10 vezes até que chegasse 1×10^2 *Leishmanias* totais, seguido de uma diluição em meio α -MEM suplementado com 20 % de SFB em 20 mL de meio. Foram adicionadas suas respectivas concentrações de antibióticos de seleção (Tabela 4) e plaqueadas em placas de 96 poços em um volume final de 200 μ L de meio/poço, de forma que cada poço contenha

o esperado de 1 *Leishmania*. As placas foram incubadas em estufa BOD a 26 °C. Após um período de crescimento celular de aproximadamente 14 dias, foram selecionados poços (clones) aleatórios e transferidos para garrafa de cultura T-25 (*Sarstedt*) contendo 5 mL de meio α -MEM completo mais os antibióticos de seleção. Com o crescimento da cultura, o DNA dos parasitos foi extraído e realizadas novamente PCRs e qPCRs para confirmações das deleções conforme descrito anteriormente.

4.12 Curva de crescimento dos parasitos

Os parasitos foram incubados em uma concentração de 1×10^6 parasitos/mL em garrafa de cultivo celular T-25 (25 cm²) (*Sarstedt*) contendo meio α -MEM completo e mantidas em estufa BOD a 26 °C. O número de parasitos foi determinado em intervalos de 24 h, utilizando o contador de células Z1 *Coulter*® *Particle Counter* (*Beckman Coulter*TM), o crescimento celular foi avaliado por um período de 5 dias (120 h).

4.13 Estudos fenotípicos das vacinas com parasitos vivos atenuados

4.13.1 Protocolos vacinais

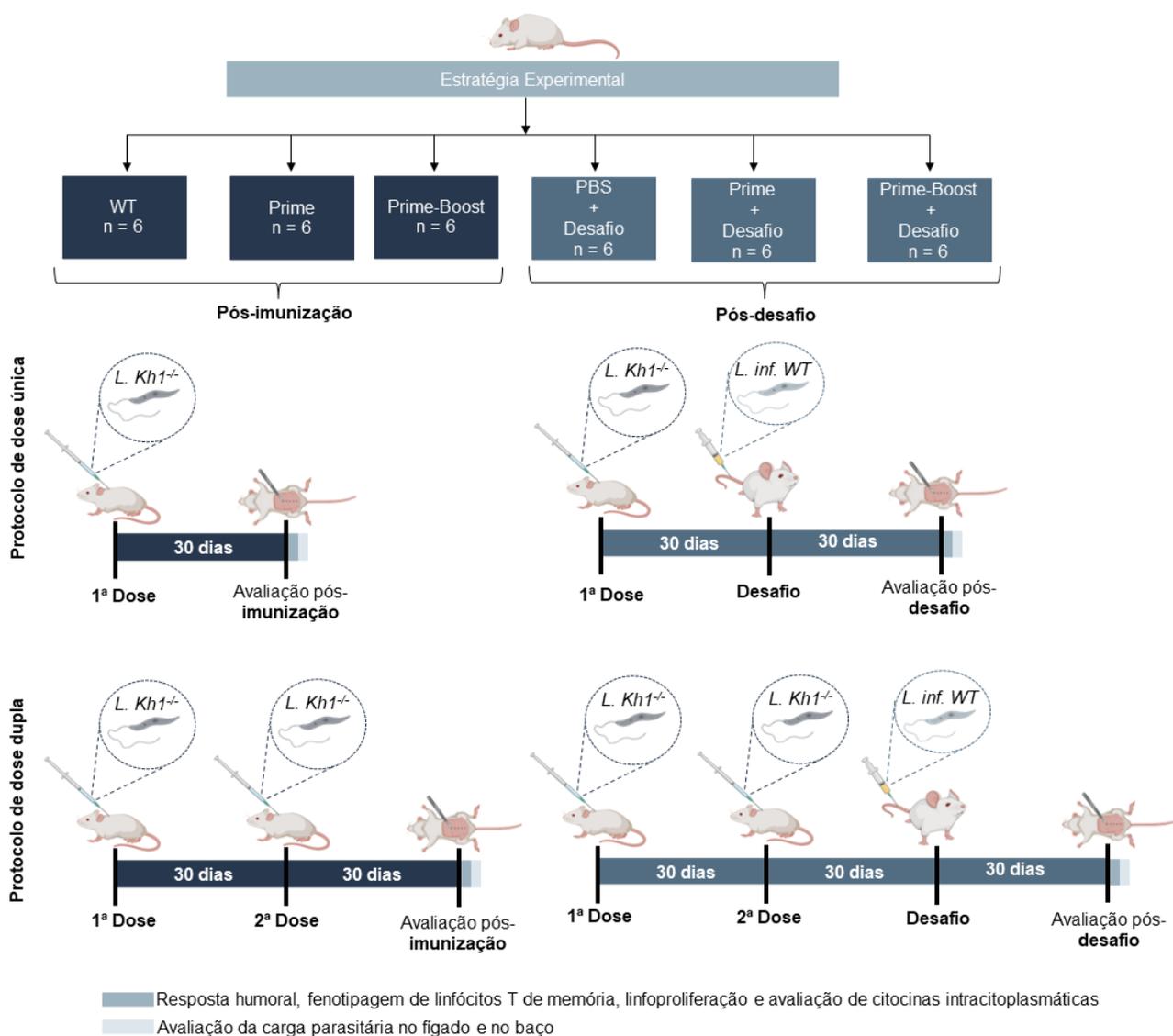
Os estudos *in vivo* foram realizados mediante a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua/Fiocruz e Ceua/UFOP) – conforme os protocolos N° LW-59/19 e N° 5469240222 respectivamente (Disponível nos anexos I e II). As avaliações da resposta imune em camundongos foram feitas de acordo com dois protocolos: (i) a avaliação da proteção homóloga, onde os animais foram vacinados com *L. infantum* deficiente do gene *kharon1* (*Likh1*^{-/-}) e desafiados com *L. infantum* selvagem (WT); (ii) avaliação da possível proteção heteróloga, na qual os animais foram vacinados com com *L. mexicana* deficiente de *kh1* (*Lmexkh1*^{-/-}) e desafiados com *L. infantum* WT.

Para cada objetivo foram utilizados 36 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas e com idade entre seis e oito semanas (os experimentos foram conduzidos em grupos de 6 animais cada). Os camundongos foram adquiridos do biotério de produção de animais (BIOP) do Instituto René Rachou (IRR) - Fiocruz/MG e mantidos em gaiolas isoladas, climatizadas, com ração e água fornecidas diariamente pelo biotério de Experimentação (BIOTEX) do IRR.

Para cada tipo de protocolo, os animais foram divididos em dois principais grupos principais – apenas imunizados (pós-imunização) e imunizados e desafiados (pós-desafio), cada grande grupo se dividiu em três subgrupos conforme descrito a seguir:

- 1 Pós-imunização: 1A) subgrupo infectado com a cepa selvagem de *Leishmania* (WT); 1B) subgrupo vacinado com uma dose da vacina viva atenuada deficiente de *kharon1* (*kh1^{-/-}*) (*prime*); 1C) subgrupo vacinado com duas doses da vacina viva atenuada (*prime-boost*). Em cada ensaio foi determinado um intervalo de 30 dias. A infecção e a(s) vacina(s) foi(ram) administrado(s) por via subcutânea.
- 2 Pós-desafio: 2A) subgrupo vacinado com o “veículo” PBS 1X; 2B) subgrupo vacinado com uma dose da vacina; 2C) subgrupo vacinado com duas doses da vacina. Em cada ensaio foi determinado um intervalo de 30 dias. As vacinas foram administradas por via subcutânea e os desafios foram feitos pela via intravenosa (veia da cauda) com a cepa selvagem virulenta de *L. infantum* OP46 (Figura 8).

Figura 8: Esquema representativo dos protocolos de vacinação em camundongos BALB/c.



No grupo pós-imunização, um grupo foi infectado com *Leishmania selvagem* por via intradérmica e acompanhado por 30 dias. No grupo pós-desafio um grupo foi vacinado com o veículo PBS e posteriormente de desafiado com *L. infantum* selvagem. O protocolo experimental é o mesmo para as duas vacinas vivas atenuadas *Lkh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}*.

4.13.2 Vacinação, infecção e desafio

As culturas de parasitos atenuados e selvagens para os estudos *in vivo* foram cultivados conforme descrito anteriormente. No dia da infecção/vacinação, formas promastigotas de *Leishmania* em cultivo na fase estacionária foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL e centrifugados a 1700 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas 2x com PBS 1X. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e diluídos na concentração de 1×10^7 *Leishmanias* em 100 μ L de PBS1X (equivalente a uma dose aplicada/animal). Para o desafio experimental, as promastigotas de *Leishmania* em fase estacionária foram transferidas para tubos

Falcon de 15 mL e centrifugados a 1700 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado as amostras foram lavadas 2x com PBS 1x. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a população ajustada para 1×10^7 parasitos em 50 μ L de PBS 1x (equivalente a uma dose de desafio aplicada/animal).

4.13.3 Avaliação do perfil de imunoglobulinas

A dosagem das imunoglobulinas IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania* dos modelos murinos, foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Os animais foram anestesiados em solução de cetamina-xilazina na concentração de 100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina, seguida da coleta de amostras de sangue por punção intracardíaca. Posteriormente os animais foram eutanasiados por overdose com os anestésicos supracitados na concentração de 500 mg/kg de cetamina com 100 mg/kg de xilazina. As amostras de sangue foram centrifugadas a 10.000 x g em temperatura ambiente durante 10 min para a separação do soro. Estes foram identificados e armazenados a -20 °C até seu uso. Para a avaliação, placas de 96 poços de fundo chato (*NUNC*) foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *L. infantum* (*ASLi*) na concentração de 1 μ g/poço diluído em H₂O milliQ (pH 9,6) e incubadas por 18 h (*overnight*) à temperatura de 37 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução de PBS 1X contendo 0,05 % de Tween-20 (solução de lavagem) seguido de outra lavagem com PBS 1X. Foi adicionado em cada poço 200 μ L de PBS 1X contendo 2 % de leite em pó desnatado (Molico) e as placas foram mantidas por 120 min à 37 °C para o bloqueio de sítios inespecíficos. Após o período de incubação, a placa foi novamente lavada por duas vezes com a solução de lavagem. Os soros foram diluídos na concentração de 1:50 em solução de bloqueio e incubadas à 37 °C por 60 min. Posteriormente, a placa foi submetida a três lavagens com a solução de lavagem, seguida de três lavagens com PBS 1X. Foram adicionados os anticorpos anti-IgG total, anti-IgG1 e anti-IgG2a conjugados a HRP (*Horseradish peroxidasei*, SouthernBiotech) no título de 1:10.000 e a placa foi novamente incubada à 37 °C por 60 min. As placas foram então lavadas 4 vezes com solução de lavagem seguidas de 4 lavagens com PBS 1X. Ao final de todo o processo, a revelação se deu por meio da adição de 100 μ L de cromógeno tetrametilbenzidina (TMB, *Sigma Aldrich*), e as placas foram armazenadas a temperatura ambiente por 20 min ao abrigo da luz. Após o período, a reação foi

cessada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

4.13.4 Obtenção dos esplenócitos

Ao final de trinta dias de cada protocolo vacinal, os camundongos foram eutanasiados conforme já descrito, e o baço foi removido em capela de fluxo laminar sob condições estéreis para avaliar os linfócitos T produtores de citocinas e a proliferação celular. O órgão foi macerado com auxílio de um macerador de tecido contendo 2 mL de RPMI 1640 (*Gibco*[®], *Thermo Fisher Scientific*) incompleto para a obtenção dos esplenócitos. Após a maceração do órgão, a suspensão celular obtida foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL e adicionado RPMI 1640 incompleto contendo o volume final de 10 mL. Centrifugou-se a cultura a 400 x *g* por 10 min à 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640 incompleto. As células foram contadas em câmara de Neubauer na diluição de 10 µL de cultura em 490 µL de líquido de *Turck* (*Sigma-Aldrich*). O volume foi ajustado para uma concentração de 1 x 10⁷ células/mL. Para a avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas, as células foram transferidas para placas de 96 poços com fundo U (*Corning*[®]) contendo meio de cultura CMBlast (RPMI 1640, SFB 20 %, gentamicina 1 %, L-glutamina 1 %, β-mercaptoetanol 0,1 %) na presença de estímulo com antígeno específico de *Leishmania* (ASL_i) a 25 µg/mL. A cultura controle consistiu em células não estimuladas. As culturas foram mantidas por 24 h em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C para marcação das citocinas. Na avaliação da proliferação celular, a suspensão de células foi marcada com CFDA-SE (*Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester - Vybrant*[®] *CFDA SE Cell Tracer kit, Invitrogen*) e transferidas para placas de 96 poços com fundo U (*Corning*[®]). Como controle positivo, alguns poços foram estimulados com o mitógeno Concanavalina A (ConA - *Concanavalin A from Canavalia ensiformis, Sigma-Aldrich*) na concentração de 1 µg/mL. As culturas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C por 120 h.

4.13.5 Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T produtores de citocinas intracitoplasmáticas

Oito horas antes do término do período de incubação de 24 h na presença de ASLi, foram adicionados 10 µL/poço da solução de Brefeldina A (BFA A *Brefeldin A Penicillium brefeldianum*, Sigma-Aldrich) na concentração final de 10 µg/mL. Para o controle positivo, alguns poços foram estimulados com 10 µL/poço de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*, Sigma-Aldrich) na concentração final de 5 ng/mL e 2 µL/poço de ionomicina (*Ionomycin calcium salt from Streptomyces conglobatus*, Sigma-Aldrich) na concentração final de 1 µg/mL. Quinze minutos antes do término do período de incubação, foi adicionado 20 µL/poço de solução de EDTA com concentração final de 2 mM. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 450 x g a temperatura de 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL/poço de PBS 1X e a placa foi novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 50 µL/poço de PBS 1X contendo *Fixable Viability Stain 450* (FVS 450, *BD Horizon™*), na concentração de 0,5 µg/mL e a placa foi mantida por 15 min ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de tampão PBS-Wash/poço (PBS 1X acrescido de 5 % de albumina) e a placa foi centrifugada novamente. O sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas com as moléculas de superfície com anticorpos anti-CD3 FITC (*BD Horizon™*), anti-CD4 BV605 (*BD Horizon™*), anti-CD8 PerCP CY5.5 (*BD Horizon™*) e anti-CD44 APC (*BD Horizon™*) (Quadro 1). As placas foram incubadas durante 30 min com 30 µL/poço dos anticorpos de superfície diluídos ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as células foram fixadas adicionando-se 150 µL/poço de solução de lise de eritrócitos (citrato de sódio 25,8 g/L, 54 % formaldeído, 30 % dietilenoglicol e 0,4 % heparina, pH 7,85) e mantidas por 10 min em temperatura ambiente. Após o período, as células foram permeabilizadas com 200 µL de PBS-Wash e submetidas novamente a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas com 30 µL/poço do mix de anticorpos anticitocinas intracitoplasmáticas anti-IFN-γ AF700 (*BD Pharmingen™*), anti-IL-10 PE (*BD Pharmingen™*), diluídos na proporção de 1:50 e mantidos por 30 min ao abrigo de luz. Por fim, foram adicionados 200 µL/poço de PBS-Wash e as placas foram novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 200 µL de solução fixadora *Macs Facs Fix* (MFF – paraformaldeído 10 g/L, cacodilato

de sódio 1 %, cloreto de sódio 6,67 g/L, pH 7,2) e transferidas para tubos de poliestireno de 500 µL (*Sarstedt*) para análise de citometria.

Ao todo foram adquiridos 100.000 eventos no citômetro *LSR Fortessa* (*BD Biosciences*) no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMCF/NUPEB) da UFOP. Foram usadas *Beads* (*BD™ CompBeads Anti-Rat and Anti-Hamster Ig k/Negative Control Compensation Particles Set, BD Biosciences*) específicas para compensação do citômetro. A análise dos dados foi realizada no software *FlowJo®* v10.8.0 (*BD Biosciences*).

Quadro 1: Marcadores utilizados para fenotipagem das subpopulações de linfócitos T e das citocinas intracitoplasmáticas.

Marcador*	Fluorocromo	Clone	Diluição	Função
CD3	FITC	17A2	1:100	define populações de linfócitos T
CD4	BV605	RM4-5	1:200	define subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD8	PerCP CY5.5	53-6.7	1:200	define subpopulação de linfócitos T citotóxicos
CD44	APC	IM7	1:100	Marcador de ativação, adesão e migração celular
IFN-γ	AF700	XMG1.2	1:50	citocina Th1
IL-10	PE	JES5-16E3	1:50	citocina reguladora

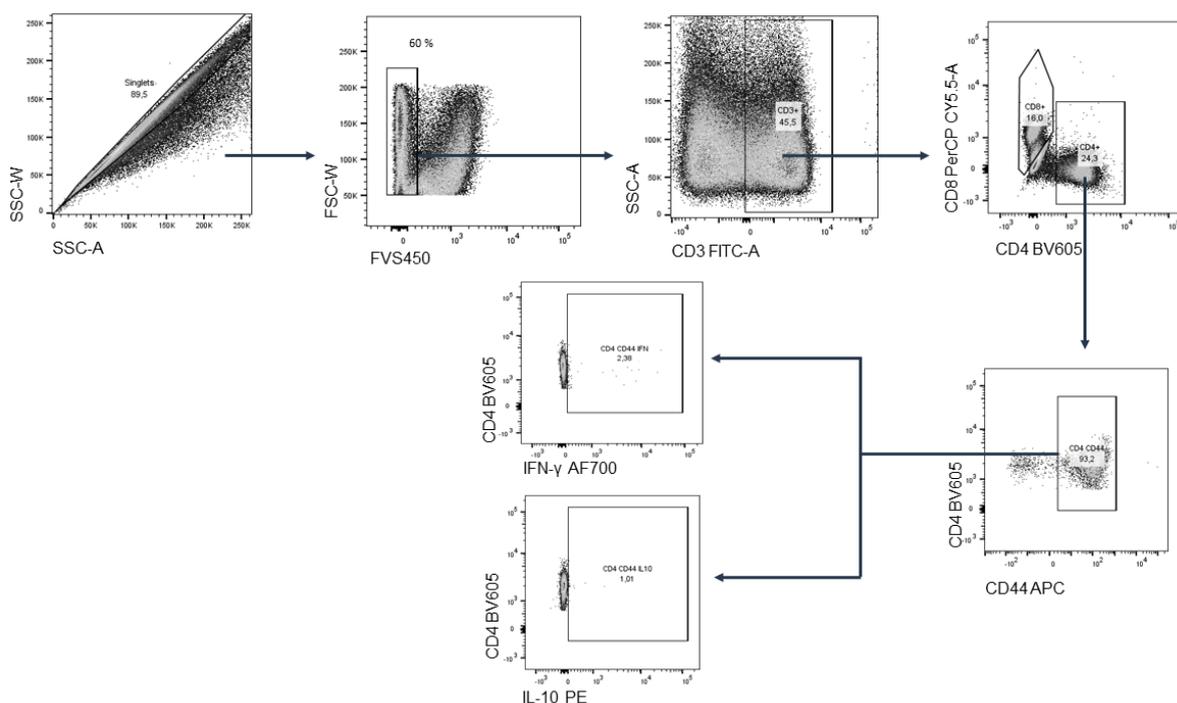
*anticorpos monoclonais *BD Biosciences*.

4.14.5.1 Estratégia para análise das citocinas intracitoplasmáticas

As análises de produção de citocinas intracitoplasmática (CIC) produzidas por tanto por linfócitos T CD4⁺ quanto para linfócitos T CD8⁺ seguiram a estratégia exemplificada na figura 9 dos linfócitos T CD4⁺. Na primeira etapa, foi selecionado os singletos empregando os parâmetros de distribuição pontual de granulosidade SSC-W (*Side Scatter Width*) versus área SSC-A (*Side Scatter Area*). Posteriormente, as células em processo de apoptose ou mortas foram marcadas com marcador de viabilidade FVS450 e foram excluídas das análises subsequentes, obtendo assim apenas células viáveis, representado pelo gráfico intensidade de fluorescência FVS 450 vs FSW (*Forward Scatter Width*). Prosseguiu-se então para a seleção das populações de linfócitos T CD3⁺ (formando o gráfico SSC-A vs intensidade de fluorescência CD3 FITC), com determinação das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, pelas

medidas de intensidade de fluorescência CD4 BV605 vs CD8 PerCP Cy 5.5. A seguir, foi selecionada a população positiva para o marcador CD44⁺ para cada subpopulação selecionada anteriormente. Ao selecionar cada subpopulação separadamente T CD4⁺CD44⁺ ou T CD8⁺CD44⁺ foi avaliado o tipo de citocina produzida, por meio da intensidade de fluorescência IFN- γ AF700 ou IL-10 PE.

Figura 9: Estratégia de análise imunofenotípica das subpopulações de linfócitos T CD4⁺CD44⁺ produtoras das citocinas IFN- γ e IL-10 pelas células T CD4⁺.



Para as citocinas produzidas por T CD8⁺, foram utilizadas a subpopulação CD8⁺CD44⁺.

4.13.6 Caracterização fenotípica da atividade proliferativa de subpopulações de linfócitos T

Ao término do período de incubação de 120 h na presença de *ASLi*, as placas foram submetidas a centrifugação a 450 x *g* por 5 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 μ L/poço de PBS 1X seguido de centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e foi adicionado 50 μ L/poço de PBS 1X, contendo FVS450 na concentração de 0,5 μ g/mL. As placas foram incubadas por 15 min ao abrigo de luz. Após esse período, foram adicionados 100 μ L/poço de PBS-Wash e as placas foram novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas com as moléculas de superfície com anticorpos anti-CD3 BV650 (*BD Horizon*TM), anti-CD4 BV605 (*BD Horizon*TM) e anti-

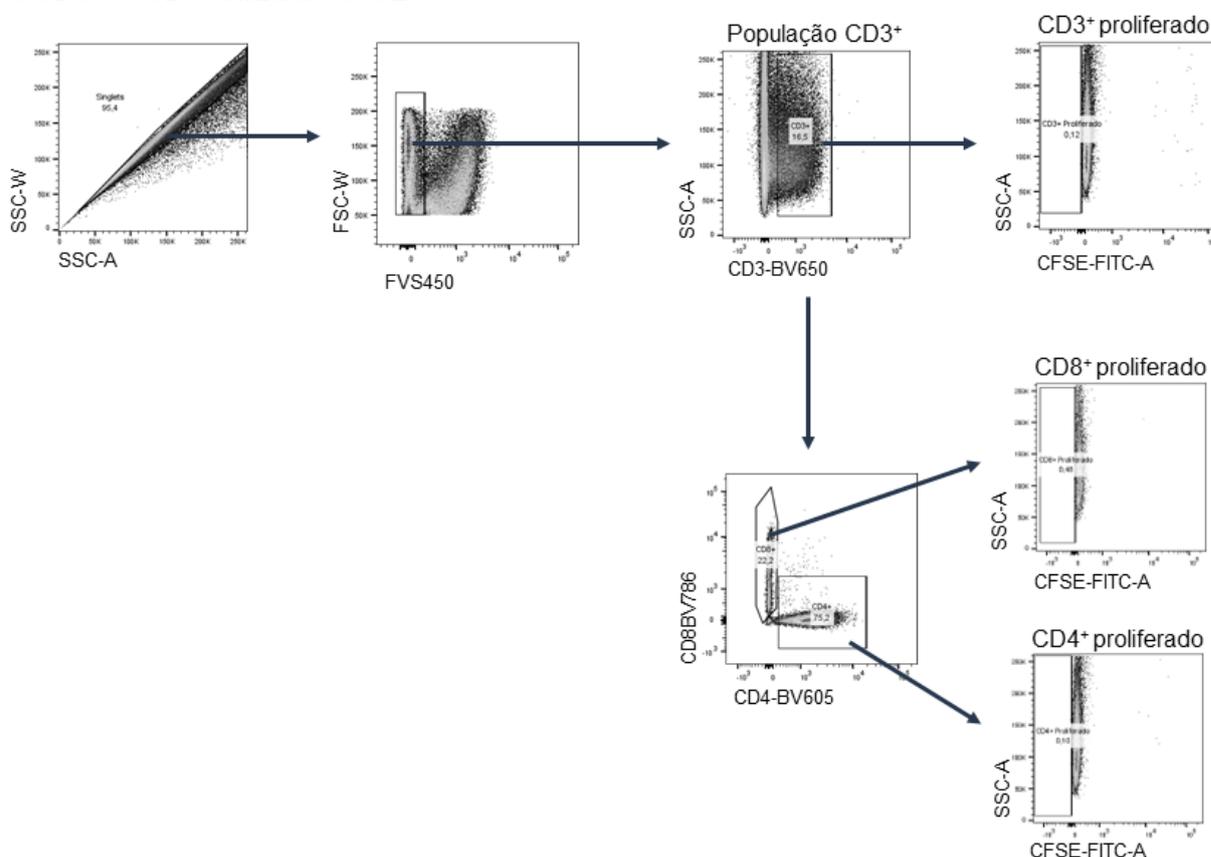
CD8 BV786 (*BD Horizon™*). Os anticorpos foram diluídos em solução PBS 1X contendo proteínas inertes e aplicou-se 30 µL/poço dos anticorpos de superfície, as placas foram mantidas por 30 min ao abrigo da luz. As células foram fixadas e foram adicionados 150 µL/poço de solução de lise de eritrócitos, mantidas em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, adicionou-se 200 µL/poço de PBS-*Wash* e as placas foram submetidas a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL/poço de solução fixadora MFF seguido da transferência da suspensão celular para tubos de poliestireno de 500 µL (*Sarstedt*). Foram adquiridos 100.000 eventos no citômetro *LSR Fortessa™* (*BD Biosciences*) no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMCF/NUPEB) – UFOP. Foram usadas *Beads (BD™ CompBeads Anti-Rat and Anti-Hamster Ig k/Negative Control Compensation Particles Set, BD Biosciences)* específicas para compensação do citômetro. A análise dos dados foi realizada no software *FlowJo®* v10.8.0 (*BD Biosciences*).

4. 13.6.1 Estratégia para análise da proliferação de linfócitos T

A primeira etapa foi selecionar os singletos empregando os parâmetros de distribuição pontual de granulosidade SSC-W (*Side Scatter Width*) vs área SSC-A (*Side Scatter Area*). Depois, as células em processo de apoptose ou mortas foram marcadas com o marcador de viabilidade FVS450, assim essas células foram excluídas das análises subsequentes, sendo representado pelo gráfico FSC-W (*Forward Scatter Width*) vs intensidade de fluorescência FVS 450. Em seguida, a população CD3⁺ foi selecionada em um gráfico formando pelos eixos SSC-A vs intensidade de fluorescência CD3 BV650. A determinação da linfoproliferação total foi realizada estabelecendo um *gate* à esquerda da população CD3⁺, usando os eixos SSC-A vs intensidade de fluorescência CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*). O agente CFDASE atravessa facilmente a membrana plasmática e se liga covalentemente as amins livres das células. A fluorescência é herdada pelas células-filhas após o processo de divisão. Portanto, após 120 horas em cultura, a divisão celular resulta em uma redução sequencial pela metade da fluorescência do CFSE sinalizada pela perda sucessiva da fluorescência celular. Para a determinação da proliferação das subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, foi selecionado tais populações pelo gráfico CD8 BV786 vs intensidade de fluorescência CD4 BV605, os *gates* gerados

foram usados para determinar a proliferação nestas populações, usando os eixos SSC-A vs intensidade de fluorescência CFSE, como exemplificado na figura 10.

Figura 10: Estratégia de análise para avaliação da proliferação total e das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ utilizando CFSE



4.14.7 Caracterização fenotípica das células T de memória central e efetora

A caracterização fenotípica de linfócitos T de memória foi realizada ao término do período de 24 h. Após o período, as placas contendo os esplenócitos foram centrifugadas a 450 x g durante 5 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL/poço de PBS 1X e a placa foi centrifugada a 450 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado em cada poço uma solução de PBS 1X contendo o marcador viabilidade celular FVS450 (*Fixable Viability Stain 450*), as placas foram incubadas por 15 min sob o abrigo de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL/poço de tampão PBS-Wash e as placas foram centrifugadas a 450 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas com painéis contendo combinações distintas de anticorpos para avaliação de células T de memória. O painel multifuncional foi composto por

anticorpos de superfície contra moléculas de células de camundongo: anti-CD3 FITC, anti-CD4 BV605, anti-CD8 PerCP Cy 5.5, anti-CD44 APC, anti-CD62L BV510 (Quadro 2). Todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão de PBS 1X acrescido de proteínas inertes. Foi adicionado 50 µL/poço do coquetel de anticorpos de superfície e armazenado por 30 minutos ao abrigo de luz em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram tratadas com 150 µL/poço de solução de lise e mantidas ao abrigo da luz por 10 min. A placa foi centrifugada a 450 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL/poço de PBS-Wash. A placa foi novamente centrifugada a 450 x g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado, seguido da adição de 300 µL/poço de solução fixadora MFF e transferência para tubos de poliestireno de 500 µL (*Sarstedt*). Foram adquiridos 100.000 eventos no citômetro *LSR Fortessa (BD Biosciences)* no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMCF/NUPEB) – UFOP. Foram usadas *Beads (CompBeads)* específicas para compensação do citômetro. A análise dos dados foi realizada no *software FlowJo®*.

Quadro 2: Marcadores utilizados para fenotipagem das células de memória efetora e central

Marcador*	Fluorocromo	Clone	Diluição	Função
CD3	FITC	17A2	1:200	define populações de linfócitos T
CD4	BV605	RM4-5	1:200	define subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD8	PerCP CY5.5	53-6.7	1:200	define subpopulação de linfócitos T citotóxicos
CD44	APC	IM7	1:100	define células naíve e de memória
CD62L	BV510	MEL-14	1:400	ligante de L-selectina. Distingue células T naíve, efetoras e de memória.

*anticorpos monoclonais *BD Biosciences*.

4.13.7.1 Estratégia para caracterização de linfócitos T de memória central e efetora

Inicialmente foi feita a aquisição dos parâmetros de tamanho SSC-W e SSC-A para obtenção dos singletos. Após a seleção, as células em processo de apoptose ou mortas foram marcadas pelo marcador de viabilidade FVS450, sendo representado pelo gráfico intensidade de fluorescência FSW (*Forward Scatter Width*) vs FVS 450,

assim foram incluídas apenas células viáveis nas análises subsequentes. Após determinar a células T CD3⁺ (eixos SSC-A vs intensidade de fluorescência CD3 FITC-A), foram selecionadas posteriormente as subpopulações de CD4⁺ e CD8⁺ utilizando os gráficos bidimensionais de fluorescências CD8 PerCP Cy5.5 vs intensidade de fluorescência CD4 BV605. A partir dessas subpopulações, foi caracterizado o percentual de células da memória central (CD4⁺/CD8⁺ CD44^{high} CD62L^{high}) e memória efetora (CD4⁺/CD8⁺ CD44^{high} CD62L^{low}), por meio dos gráficos CD44 APC-A vs intensidade de fluorescência CD62L BV510 como exemplificado na Figura 11.

Figura 11: Estratégia para caracterização de células T de memória central (MC) e memória efetora (ME).

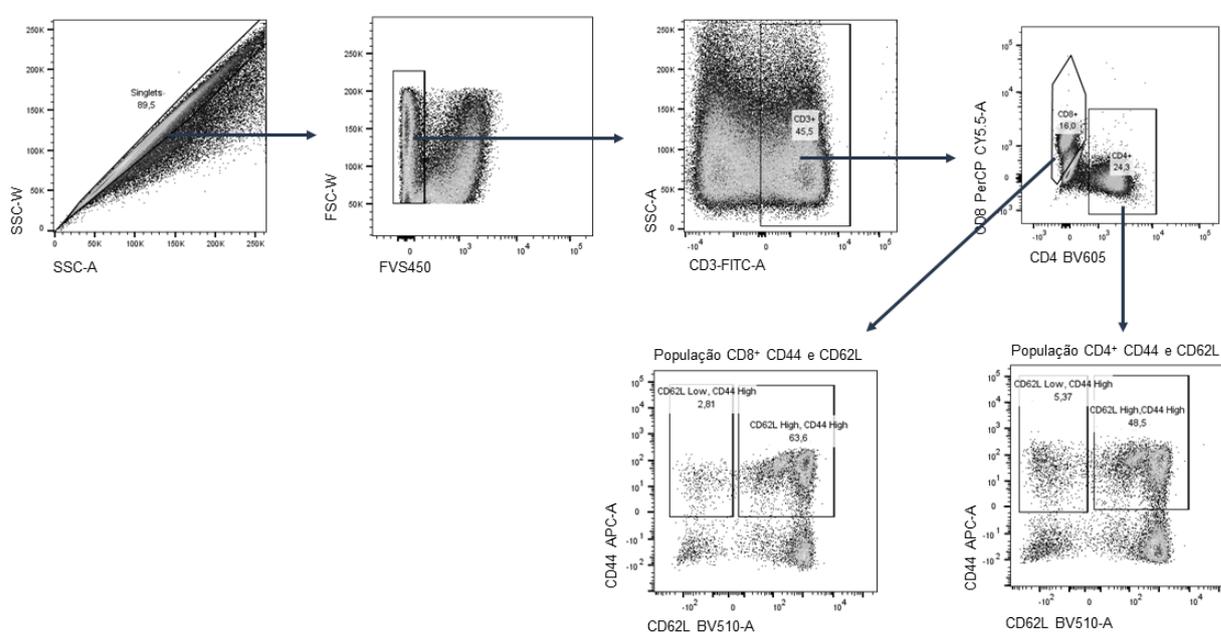


Gráfico de distribuição pontual representativo da expressão dos marcadores de superfície para caracterização de linfócitos T de memória central (CD44^{high} CD62L^{high}) e memória efetora (CD44^{high} CD62L^{low}).

4.14.8 Quantificação da carga parasitária por qPCR

A detecção e a quantificação do gene que codifica para a DNA polimerase (gene de cópia única de *Leishmania*) foi utilizada para mensurar a carga parasitária nos órgãos do fígado e do baço nos camundongos Balb/c. O alvo é capaz de detectar com grande sensibilidade e especificidade a presença de DNA do parasito.

4.13.8.1 Extração de DNA de fragmentos de fígado e baço

A extração de DNA genômico total de fragmentos de baço e fígado contendo parasitos foi realizada pelo método clorofórmio/isopropanol. Fragmentos do fígado e do baço pesando entre 5 e 20 mg de cada animal foram adicionados em microtubos de 2 mL próprio para uso no equipamento *Tissuelyser* (QUIAGEN). Em cada microtubo foram adicionados 500 µL do tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 400 mM, SDS 1 %, pH 8) e as amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas a 37 °C durante 60 min, sendo agitadas em *vórtex* a cada 20 min em rotação máxima por 30 s. Em cada tubo, foi inserida uma *bead* de 5 mm e em seguida, o tecido foi macerado no *Tissuelyser* durante 2 min. Depois deste processo, foram adicionados 100 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 5 M e homogeneizadas lentamente. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho seco à 65 °C por 10 min. Foram adicionadas as amostras 50 µL de solução CTAB/NaCl 10 %, as quais foram novamente incubadas em banho seco durante 20 min a 65 °C. Após o período, foram adicionados 400 µL de clorofórmio 100 % (*Sigma*) e as amostras foram homogeneizadas em *vórtex* por 30 s em rotação máxima, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* durante 10 min. Os sobrenadantes contendo DNA foram transferidos para *ependorfs* de 1,5 mL contendo 400 µL de isopropanol (*Sigma*). As amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos durante 1 a 2 min até turvação da solução contendo o DNA. Posteriormente, as amostras foram incubadas a -20 °C durante 60 min e, em seguida, centrifugadas a 12.000 x *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado e foi realizado uma lavagem adicionando 1 mL de etanol 70 % gelado em cada tubo. A solução foi novamente homogeneizada por inversão dos tubos durante 1 a 2 min e centrifugada por 5 min a 12.000 x *g*. Após descarte do sobrenadante, as amostras de DNA foram hidratadas com 100 µL de água milli-Q autoclavada e mantidas a temperatura ambiente *overnight*. A concentração e a pureza do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro (*Nanodrop2000*, *Thermo Fisher Scientific*) e as amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.13.8.2 Construção da curva padrão e quantificação da carga parasitária

A construção da curva padrão foi realizado utilizando o plasmídeo p-GEM[®]-T *Vector* contendo o gene que codifica para DNA polimerase de *Leishmania* (ROATT et al., 2017). Após a transformação do plasmídeo em bactérias *E. coli*-DH5α cálcio

competentes seguido de sua extração conforme já descrito, o produto da clonagem do gene de *Leishmania* foi utilizado para construção da curva-padrão. A concentração plasmídeo contendo os insertos foi mensurada e a partir da dosagem obtida, calculou-se a concentração de DNA plasmidial em pmol/ μ L de acordo com fórmula.

$$\frac{pmol}{\mu L} = \frac{\mu g}{\mu L} \times \frac{10^6 pg}{1 \mu g} \times \frac{1 pmol}{660 pg} \times \frac{1}{N}$$

Onde:

N é o número de nucleotídeos (plasmídeo + inserto) dados em pares de bases (pb)
660 pg equivale: 1 pmol de 1000 pb DNA = 0,66 μ g.

Utilizando a fórmula determinou-se a concentração da solução contendo “plasmídeo + inserto” em pmol/ μ L. Levando-se em consideração o número de Avogrado equivalente a 1 mol = $6,02 \times 10^{23}$ moléculas, foi possível determinar o número de moléculas de plasmídeos presentes/microlitro de amostra. Posteriormente, foi realizado diluições seriadas de 10x obtendo uma faixa de concentração entre 10^5 até 10^0 moléculas que foi utilizada na curva-padrão.

Os ensaios de qPCR foram realizados em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96 – Well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystems*) e as corridas de amplificação foram feitas nos equipamentos *ViiA7 96 wells standard* e *QuantStudio 12k 96 wells standard (Thermo Fisher Scientific™)* na plataforma de PCR em tempo real do IRR/Fiocruz Minas.

As amostras foram testadas em duplicatas e a integridade do DNA foi verificada na reação de amplificação utilizando o gene constitutivo do fator alfa de necrose tumoral murino (TNF- α) (CUMMINGS; TARLETON, 2003). A quantificação do número de cópias de DNA do parasito foi determinada por meio da regressão linear utilizando os valores de Ct obtidos pela curva padrão. Os resultados foram expressos pelo número de cópias de DNA do parasito por mg de tecido. Foram consideradas apenas reações com eficiência entre 90 e 110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95$ e $0,99$) (Apêndice II). Os iniciadores utilizados para análise da carga estão contidos na tabela 7 e as condições e programas utilizados encontram-se na tabela 6.

Tabela 7: Iniciadores da qPCR para determinação da carga parasitária.

Ensaio	Gene alvo	nº	Iniciador	Sequência (5' → 3')
qPCR	LINF_160021500 (DNA pol. I)*	25	DNApol_F	TGTCGCTTGCAGACCAGATG
	LINF_160021500 (DNA pol. I)*	26	DNApol_R	GCATCGCAGGTGTGAGCAC
	TNF- α	27	TNF- α _F	TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA
	TNF- α	28	TNF- α _R	CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC

*DNA polimerase I; Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antissenso)

4.14 Nível de expressão gênica de transcritos associados à divisão celular/citoesqueleto em *L. infantum*

Em paralelo da caracterização fenotípica da vacina viva atenuada, foi avaliado a modulação dos níveis de transcritos em alvos associados ao citoesqueleto e na dinâmica da divisão celular em *L. infantum* no contexto de Kharon1. Inicialmente foi feita uma busca na literatura de possíveis candidatos em tripanossomatídeos onde foram selecionados 13 alvos: centrina-4 (SELVAPANDIYAN et al., 2007); proteína do corpo do fuso (Sfi-1) (KILMARTIN, 2003; SALISBURY, 2004); proteína de membrana de cinetoplastídeo 11 (KMP-11) (LI; WANG, 2008); cinase relacionada a aurora (AIRK) (CHHAJER et al., 2016); proteína do corpo basal 6 (SAS-6) (VAN BREUGEL et al., 2014); proteína do cinetocoro de cinetoplastídeo (KKT) (ZHOU; DONG; LI, 2018); proteínas associadas a KHARON 1 e 2 (KHAP1 e KHAP2, respectivamente) (KELLY et al., 2020); proteína de fibra de transição do corpo basal (TFK1) (RAMANANTSALAMA et al., 2022); proteína fosfatase específica de cinetoplastídeos 1 (KPP1) (AN; HU; LI, 2021); nucleoporina (NUP92); proteína cinase serina/treonina relacionada à cdc2 (CRK3) (DUNCAN; JONES; MOTTRAM, 2017; PARSONS et al., 2005); e ciclina dependente de cinase 6 (CYC6) (PARSONS et al., 2005).

Após a seleção dos alvos, seus níveis de transcritos foram avaliados em promastigotas e amastigotas de *L. infantum kh1^{-/-}* e comparados com a cepa selvagem de *L. infantum*. Promastigotas em fase logarítmica de crescimento (1×10^8 parasitos) foram centrifugadas a $1700 \times g$ por 5 min e lavadas uma vez em PBS 1X. O RNA total desses parasitos foi extraído utilizando o kit de extração RNeasy® Plus Mini Kit (QUIAGEN) conforme orientações do fabricante. Posteriormente, os RNAs totais foram quantificados em espectrofotômetro ND-100 (Nanodrop®) e armazenados a -80°C .

Nas formas amastigotas, monócitos humanos da linhagem THP-1 foram centrifugados a 150 x *g* por 5 min e o *pellet* ressuspendido em meio RPMI 1640. Foi transferido $1,5 \times 10^7$ células para garrafas T-75 (*Sarstedt*) contendo 25 mL de meio RPMI 1640 completo com 40 ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA – *Sigma-Aldrich*[®]) para diferenciarem-se em macrófagos. Após 72 h em estufa de atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a 37 °C, os macrófagos foram infectados com formas de promastigotas em fase estacionária na proporção de 10 *Leishmania* para cada macrófago (10:1) e incubados por 3 h na estufa a 37 °C. Os parasitos não internalizados foram removidos por meio de sucessivas lavagens (3-5 vezes) de solução HEPES/NaCl+Glicose (200 mM de HEPES, 0,15 M de NaCl, 10 mM de glicose, pH 7.2). Após a lavagem, foram adicionados nas garrafas de cultura 25 mL de meio RPMI 1640 completo seguido da incubação por 72 h a 37 °C. Após o período, as garrafas foram sobrepostas em gelo e as células foram removidas adicionando-se 5 mL de solução de HEPES/NaCl+Glicose com 0,0125 % de SDS e com o auxílio de um rodo de cultura celular, as garrafas foram raspadas até a remoção da maior parte das células. As células foram então centrifugadas por 5 min a 1700 x *g*, o sobrenadante descartado, e o *pellet* foi utilizado para extração do RNA conforme descrito para promastigotas.

Os RNAs totais extraídos foram tratados com DNase I TURBO DNA-free[™] (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) para remoção de qualquer eventual contaminação por DNA genômico, seguindo as orientações do fabricante. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir do RNA total na concentração de 4000 ng utilizando o kit da enzima *SuperScript*[™] IV (*First-Strand Synthesis System, Invitrogen*), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando Oligo dT como iniciador. Para a síntese da segunda fita a partir da primeira fita de cDNA, foi utilizado o kit da enzima *Klenow Fragment* (10 U/ μ L) (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) e como iniciador foi utilizado a sequência *splincing leader* de *Leishmania* (Tabela 9), de forma a direcionar a síntese de cDNA dupla fita apenas para cDNAs do parasito e não de macrófagos (HAYDOCK et al., 2015) as condições da reação de segunda fita estão descritas da tabela 8.

Tabela 8: Síntese da segunda fita de cDNA.

Produto	Enzima	Reação	Programa	
Fita dupla de cDNA	Klenow Fragment (10 U/ μ L)	Etapa 1		
		Componente	*Vol. (μL)	
		Klenow buffer	5	
		Iniciador SL (10 μ M)	3	
		cDNA	20 μ L	
		H ₂ O	26,8	
		Etapa 2		Ambiente - 30 min
		Componente	*Vol. (μL)	
		Klenow fragmente (5U)	0,5 μ L	
		dNTP mix 20 mM	2 μ L	
		Incubação 98 °C – 5 min		

*Vol.: Volume

Posteriormente, os cDNAs de fitas duplas foram purificados utilizando o *kit QIAquick® PCR Purification (QUIAGEN)* conforme as instruções do fabricante. Após a purificação, os cDNAs foram quantificados no aparelho *Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)* com o *kit Qubit 1X dsDNA HS Assay*. Os cDNAs purificados foram utilizados para as reações de RT-qPCR utilizando os iniciadores da tabela 9 e as condições das reações descritos na tabela 6. Para a quantificação relativa foi utilizada como normalizador o gene constitutivo *GAPDH (LinJ.36.2480)* (Tabela 5). É importante ressaltar que os iniciadores dos alvos utilizados nos ensaios foram projetados de forma que não amplifiquem nenhum ortólogo de organismo superior que porventura estivesse presente nos macrófagos e pudesse gerar uma reação cruzada. Foram consideradas apenas reações com eficiência entre 90 e 110 % e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95$ e $0,99$) (Apêndice II).

Tabela 9: Iniciadores utilizados na RT-qPCR para avaliar o nível de transcritos de alvos específicos em *Leishmania*.

Ensaio	Gene Alvo	nº	Iniciador	Sequência (5' → 3')
cDNA	SL-20	29	SL-20	ACAGTTTCTGTACTATATTG
	LinJ.22.1260 (<i>Centrin-4</i>)	30	<i>Centrin4_F</i>	CGAAACTGCTGGGTGAGAA
	LinJ.22.1260 (<i>Centrin-4</i>)	31	<i>Centrin4_R</i>	CTTGAACTCCTCGAAGGACAC
	LinJ.34.1290 (<i>Sfi-1</i>)	32	<i>Sfi1_F</i>	CCGTCCCTTGTCTTCTCAAGT
	LinJ.34.1290 (<i>Sfi-1</i>)	33	<i>Sfi1_R</i>	GGATTCTTCTCCCGCAAAGT
	LinJ.35.2250 (<i>KMP-11</i>)	34	<i>KMP11_F</i>	GATGAGGAGTTCAACAGGAAGA
	LinJ.35.2250 (<i>KMP-11</i>)	35	<i>KMP11_R</i>	CTCGTAGTGCTCCTTCATCTC
	LinJ.28.0550 (<i>AIRK</i>)	36	<i>AIRK_F</i>	GGACCACAATCAGAACATCAAAC
	LinJ.28.0550 (<i>AIRK</i>)	37	<i>AIRK_R</i>	CTAACGATCTCGGGTGGAAAG
	LinJ.35.4350 (<i>SAS-6</i>)	38	<i>SAS-6_F</i>	GCCTACGAGTTGTCCTTTGT
	LinJ.35.4350 (<i>SAS-6</i>)	39	<i>SAS-6_R</i>	CGCAGTAGCACGAGTGAAATA
	LinJ.36.1980 (<i>KKT</i>)	40	<i>KKT_F</i>	TATTGTGTTGCCCTCTGGTATG
	LinJ.36.1980 (<i>KKT</i>)	41	<i>KKT_R</i>	CATCCACTGCTGGTCAAAC
	LinJ.33.2570 (<i>KHAP1</i>)	42	<i>KHAP1_F</i>	CTCCATCCATTCCGAGTATGTG
	LinJ.33.2570 (<i>KHAP1</i>)	43	<i>KHAP1_R</i>	CGACTTGTCGTCTTGTATCTC
	LinJ.05.0380 (<i>KHAP2</i>)	44	<i>KHAP2_F</i>	ACAGAGGGTAGATCCTCGTATG
	LinJ.05.0380 (<i>KHAP2</i>)	45	<i>KHAP2_R</i>	CACTGCCTCCTCCTTCTTTAC
RT-qPCR	LinJ.05.0100 (<i>KPP1_H5</i>)	46	<i>KPP1_C5_F</i>	CATCTTCTCCACGTCTGACTAC
	LinJ.05.0100 (<i>KPP1_H5</i>)	47	<i>KPP1_C5_R</i>	CTTTGTTTCTCGCTGCACTTC
	LinJ.09.0520 (<i>KPP1_H9</i>)	48	<i>KPP1_C9_F</i>	GATGGACTGAAGCTGAGTAAGAG
	LinJ.09.0520 (<i>KPP1_H9</i>)	49	<i>KPP1_C9_R</i>	CACTACACCAGCACCATTCT
	LinJ.12.0015 (<i>TFK1</i>)	50	<i>TFK1_F</i>	CTACCCTACGCGGTTGTATTG
	LinJ.12.0015 (<i>TFK1</i>)	51	<i>TFK1_R</i>	GACTGTAACCTCGTCCGCTAAC
	LinJ.26.2690 (<i>NUP92</i>)	52	<i>NUP92_F</i>	GTGGCTACGTGAAGAAGACTAC
	LinJ.26.2690 (<i>NUP92</i>)	53	<i>NUP92_R</i>	GGTGCTGTAGTGCTTACAAGA
	LINF_360011000 (<i>CRK3</i>)	54	<i>CRK3_F</i>	GCTCTACCTTGTGTTTCGAGTATG
	LINF_360011000 (<i>CRK3</i>)	55	<i>CRK3_R</i>	TAAGCCGCTTCAGATCCATTC
	LINF_320040700 (<i>CYC6</i>)	56	<i>CYC6_F</i>	GCGTATGATCCTCGTAGATTGG
	LINF_320040700 (<i>CYC6</i>)	57	<i>CYC6_R</i>	GGAAAGATAGCGGTCGATAAGG

O desenho dos iniciadores utilizados foi feito usando a plataforma *online Primer Quest*SM (www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). *Centrin-4*: centrina-4; *Sfi-1*: proteína do corpo do fuso; *KMP-11*: proteína de membrana de cinetoplastídeo; *AIRK*: cinase relacionada à aurora; *SAS-6*: proteína do corpo basal; *KKT*: proteína do cinetocoro de cinetoplastídeo; *KHAP-1*: proteína associada a Kharon 1; *KHAP-2*: proteína associada a Kharon 2; *KPP1_H5* e *KPP1_H9*: Proteína fosfatase 1 específica de cinetoplastídeos; *TFK1*: proteína de fibra de transição do corpo basal; *NUP92*: nucleoporina; *CRK3*: cinase relacionada à cdc2 ; *CYC6*: ciclina dependente de cinase 6. Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antisense).

4.15 Sequenciamento de cDNA para análise de expressão diferencial

Para avaliar de forma global as alterações na expressão diferencial de transcritos mediante deleção de *kharon1*, foi obtido o transcriptoma de *L. infantum* nas formas promastigotas por meio do sequenciamento do cDNA (estamos utilizando o termo “sequenciamento de cDNA” pois está cada vez mais comum a sequenciamento direto de moléculas de RNA, e para o qual entendemos ser mais correto atribuir a notação RNA-Seq). Para este propósito, promastigotas de *L. infantum* WT e *Likh1*^{-/-} no final da fase logarítmica em quadriplicatas biológicas, tiveram seus RNAs extraídos utilizando o kit extração *RNeasy® Plus Mini Kit* (QUIAGEN) e tratados com o kit de purificação DNase *TURBO DNA-free™* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) conforme descritos anteriormente. Os RNAs totais extraídos foram dosados em *Qubit 4 Fluorometer* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) utilizando o kit *Qubit RNA HS Assay* para quantificação de fita simples. Posteriormente os RNAs foram analisados quanto à sua integridade por eletroforese capilar no equipamento *Bioanalyzer 2100* (ThermoFisher™).

As construções das bibliotecas das réplicas biológicas foram realizadas na plataforma de sequenciamento de nova geração (NSG) do instituto René Rachou – Fiocruz/MG por meio do kit *Stranded TruSeq RNA* (#20020594 *Illumina*), utilizando enzima *Superscript II™* (*First-Strand Synthesis System*, *Invitrogen*) para síntese de cDNA, seguido da purificação com *beads* magnéticas (*Beckman Coulter*) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento do cDNA foi realizado com o kit de corrida *Illumina Mid Output 2.5* de 300 ciclos (#20024905 *Illumina*) no sequenciador *NextSeq500*, disponível na plataforma do IRR. O mapeamento e a quantificação das leituras de cDNA-seq foram feitas contra o genoma de referência de *L. infantum* JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-724) versão 13/07/2018, Release 52, em 20 de maio de 2021, disponível em: (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/search/dataset/AllDatasets/result?filterTerm=jpcm5>) usando os *softwares* STAR e Salmon, respectivamente. Posteriormente, as análises da expressão diferencial foram realizadas utilizando o pacote DESeq2 do programa R. Genes com uma mudança de Log2 de pelo menos 0,5 (valor absoluto) e um valor de *p* valor ajustado de 0,01 ou menos, foram considerados diferencialmente expressos. Todas as análises de bioinformática das sequências geradas, foram

realizadas em parceria com o Dr. Gabriel da Rocha Fernandes, consultor técnico da plataforma tecnológica de bioinformática do IRR/Fiocruz-Minas.

4.16 Validação dos alvos diferencialmente expressos por RT-qPCR

A partir das análises de expressão diferencial, quatro alvos envolvidos na divisão celular e no citoesqueleto foram selecionados e avaliados por RT-qPCR nas formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum kh1^{-/-}* e comparados *L. infantum* WT. A extração de RNA total das culturas, síntese do cDNA de fita dupla e RT-qPCR foram realizadas conforme descrito anteriormente. Os iniciadores dos alvos selecionados estão descritos na tabela 10. Foram consideradas apenas reações com eficiência entre 90 e 110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95$ e $0,99$) (Apêndice II).

Tabela 10: Iniciadores utilizados na RT-qPCR para avaliar o nível de transcritos em *Leishmania*.

Ensaio	Gene Alvo	nº	Iniciador	Sequência (5' → 3')
RT-PCR	<i>LINF_020011000</i> (<i>STE/STE7</i>)	58	<i>STE/STE7_F</i>	ATCATCAGTGCCGTTTCCTATC
	<i>LINF_020011000</i> (<i>STE/STE7</i>)	59	<i>STE/STE7_R</i>	CGTGCCAAAGTCCGTAATCT
	<i>LINF_060017600</i> (<i>PK53</i>)	60	<i>PK53_F</i>	CGTTCCTGGAGAACCACTATC
	<i>LINF_060017600</i> (<i>PK53</i>)	61	<i>PK53_R</i>	TTGAAGAGATGGAAGTCGGAAA
	<i>LINF_080011400</i> (<i>cytoskeleton organization</i>)	62	<i>Org. Cito_F</i>	CTACGGTCTGATCCCAAAGTTC
	<i>LINF_080011400</i> (<i>cytoskeleton organization</i>)	63	<i>Org. Cito_R</i>	GTGTGGCTGTCCTGATTATGT
	<i>LINF_060017400</i> (<i>AP2</i>)	64	<i>AP2_F</i>	GTGCAGTCTAACGCCATTCT
	<i>LINF_060017400</i> (<i>AP2</i>)	65	<i>AP2_R</i>	GCTGGAGGGCAATCGAAAT

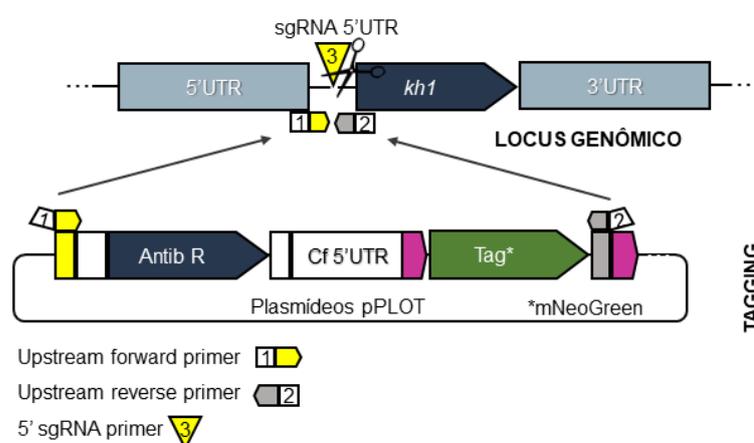
O desenho dos iniciadores foi feito usando a ferramenta *online Primer QuestSM* (www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). SET/SET7: Proteína cinase SET/SET7; PK53: Proteína cinase PK53; Org.Citoesq: Proteína com função organizadora do citoesqueleto; AP2: Proteína associada ao promotor de anáfase. Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antisense).

4.17 Localizações subcelulares de KHARON1, KHAP1 e KHAP2

Após avaliação dos níveis de transcritos, foram selecionadas duas proteínas que são descritas como associadas à KHARON em *L. mexicana* (KELLY et al., 2020), para identificação das suas localizações subcelulares em *L. infantum* WT e *Likh1^{-/-}*. Para este fim, os genes que codificam para as proteínas KHARON, KHAP1 e KHAP2, receberam marcação com repórter do gene que codifica para *mNeonGreen*. As

marcações foram feitas na região N-terminal dos genes por CRISPR/Cas9. Para este fim, foram realizadas PCRs para obtenção dos sgRNA5' e do cassete de DNA doador derivado do plasmídeo pPLOT, dando origem a uma proteína-alvo fusionada com *mNeonGreen* emitindo fluorescência verde, como descrito por BENEKE e colaboradores (2017). A figura 12 exemplifica como ocorre a marcação do gene com mNeonGeen.

Figura 12: Esquema ilustrativo da estratégia usada para amplificar os plasmídeos pPLOT destinados à marcação de genes em *Leishmania*.



Adição da marca (gene que codifica para *mNeonGreen* fluorescente) ao gene alvo (*Tagging*) que será expresso juntamente com a proteína. É necessário um sgRNA 5' que irá direcionar a *Cas9* ao *locus* alvo. Um conjunto de 2 iniciadores de aproximadamente 30 nt, complementar à região intergênica, é necessário para amplificar o produto a partir dos plasmídeos utilizados para construção do cassete de DNA doador. O iniciador correspondendo ao RNA guia 5' (sgRNA 5') é ligado ao promotor da RNAP T7 por PCR, onde após transfecção é transcrito em sgRNA *in vivo* pela RNA polimerase T7 (Adaptado de BENEKE et al., 2017). Estratégias similares utilizadas para marcar as proteínas KHAP1 e KHAP2. Antib R: gene contendo marcador de seleção que confere resistência ao antibiótico; *kh1*: gene *kharon1*.

Os produtos de DNA correspondentes ao sgRNA 5' foram obtidos por PCR através do iniciador do promotor G00 da RNAP T7 e o iniciador complementar do gene alvo - 5' sgRNA *primer*. A construção dos DNAs doadores foi realizada por PCR utilizando o plasmídeo pPLOT (Tabela 1) como molde e os iniciadores *Upstream* senso e *upstream* antisenso correspondente à sequência gênica de cada espécie Tabela 11. As condições das PCRs estão mostradas na tabela 3.

Tabela 11: Iniciadores utilizados para marcação a com repórter que emite fluorescência (*Tagging*).

Ensaio	Proteína	nº	Iniciador	Sequência (5' → 3')
PCR	Kharon1 <i>LINF_360068400</i>	1	Iniciador universal sgRNA	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT TTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCT TATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT AAAAC
		2	5' sgRNA F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGA GGGGAGGTCTTGATAAGCGGTTTT AGAGCTAGAAATAGC
		4	Upstream F	CCACGCAGAAGTCTCTCCGCTC CTCCCAGTATAATGCAGACCTGCT GC
		66	Upstream R	GTTGCGCTGAGGGGAGGTTTCCTG CGTCATACTACCCGATCCTGATCCA G
	KHAP1 <i>LinJ.33.2570</i>	67	5' sgRNA F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG CACCCAGTTCGCTATTCAAGTTTTA GAGCTAGAAATAGC
		68	Upstream F	CCTGTGACGACAGCTTTAACTCTC GTCACAGTATAATGCAGACCTGCT GC
		69	Upstream R	CACAGGAAAATGGTCCGACAAGTT GCGCATACTACCCGATCCTGATCC AG
	KHAP2 <i>LinJ.05.0380</i>	70	5' sgRNA F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGT CTGTTGGGGTGGTTGATGTGTTTTA GAGCTAGAAATAGC
		71	Upstream F	TCCGTGCAACACCACCAACTGGGA TCACCCGTATAATGCAGACCTGCT GC
		72	Upstream R	ATTTGTGAAGGTGGCGACGGCTCC GGACATACTACCCGATCCTGATCC AG

O desenho dos iniciadores destinados as marcações foram feitas usando a plataforma LeishGEdit (<http://leishgedit.net/>). Iniciador F: *forward* (senso); Iniciador R: *reverse* (antisenso)

Para obtenção dos mutantes com fluorescência, formas promastigotas foram transfectadas conforme descrito para deleção do gene, utilizando as combinações de produtos de PCR gerados para *tag*. Os mutantes gerados seguem de acordo com a tabela 12.

Tabela 12: Células de *L. infantum* que foram marcadas com fluorescência *mNeonGreen* fusionado a *kharon1*; *khap1* e *Khap2*.

<i>LiCas9*/T7</i>			<i>L. inf. kh1^{-/-}</i>		
Gene alvo	Plasmídeo	Marcador de Seleção*	Gene alvo	Plasmídeo	Marcador de Seleção*
KHARON1	pPLOT-mNG puro-puro	PAC	KHAP1	pPLOT-mNG puro-puro	PAC
KHAP1	pPLOT-mNG blast-blast	BSD	KHAP2	pPLOT-mNG puro-puro	PAC
KHAP2	pPLOT-mNG blast-blast	BSD			

*BSD: Blastocidina; PAC: Puromicina

4.17.1 Confirmação da marca de fluorescência em *L. infantum*

4.17.1.1 Citometria de fluxo

Com a obtenção dos mutantes gerados foi realizado a citometria de fluxo para confirmação de emissão de fluorescência nas proteínas selecionadas. Aproximadamente 1×10^6 promastigotas foram centrifugadas a $630 \times g$ por 2 min, lavadas uma vez em 500 μ L de PBS 1X e ressuspensas novamente em PBS 1X. A fluorescência das células foi determinada em citômetro de fluxo *Accuri*TM (*BD Biosciences*) utilizando o filtro FL-1 em 20.000 eventos. Os dados foram analisados no *software BD Accuri*TM C6 v1.0.264.21 (*BD Biosciences*). A análise dos dados foi comparada utilizando parasitos parentais, não fluorescentes.

4.17.1.2 Immunoblotting

Para validar a marcação das proteínas de interesse, foi realizado o *western blot* utilizando anticorpo anti *Myc*, uma marca adicional presente no DNA doador. Um total de 1×10^7 parasitos foi adicionado ao tampão *Laemmli* (*Sigma S3401-1v1*) e aquecidas a 75 °C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poli-acrilamida 10 % (SDS-PAGE) e a corrida foi realizada por 120 V. Em seguida, as proteínas foram transferidas

para membrana de nitrocelulose a 100 V por 1 h utilizando o sistema de transferência molhado. Posteriormente, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio, PBS *Tween* 20 0,1 % (PBST) + 5 % de leite desnatado (Molico) ou PBST + 5 % albumina sérica, (BSA – *Interlab*), dependendo do anticorpo primário, por 1 h em temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi incubada com os anticorpos primários *overnight* a 4 °C no mesmo tampão de bloqueio e, subsequentemente, com os anticorpos secundários por 1 h a temperatura ambiente na mesma solução tampão. As diluições dos anticorpos utilizados estão descritas no quadro 3.

Quadro 3: Diluição dos anticorpos primários e secundários para confirmação da marcação das proteínas com o repórter fluorescente (Tag).

Anticorpo	Marca	*Sol. bloqueio	Diluição
cMyc	Merck 05-724	PBST+Leite	1:3.000
Acetil-Lisina	Merck 06-933	PBST+BSA	1:1.000
Aldolase	**PI	PBST+Leite	1:5.000
Mouse 800CW	Biosciences 926-32210	PBS+Leite/BSA	1:10.000
Rabbt1 680RD	Biosciences 926-68070	PBST+Leite/BSA	1:10.000

**PI (produção independente), *Sol. (Solução)

4.17.1.3 Análise da localização subcelular

Com a confirmação da seleção de *L. infantum* expressando constitutivamente o repórter *mNeonGreen* nas proteínas de interesse, formas promastigotas e amastigotas foram visualizadas sob microscopia confocal para análise da localização subcelular de KH1; KHAP1 e KHAP2. No preparo das lâminas nas formas promastigotas, 1×10^7 parasitos foram centrifugados por 2 min à 630 x g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao 500 µL de PBS 1X. Adicionou-se 20 µL de poli-lisina 0,1 % (*Sigma-Aldrich*®) nas cavidades das lâminas para imunofluorescência (*Perfecta*) as quais foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min para aderência celular. As cavidades foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e foram adicionados 20 µL/cavidade da suspensão celular. Após a incubação por 10 min e adesão das células, as cavidades foram lavadas novamente por 3 vezes com PBS 1X. Posteriormente, foram aplicados 50 µL/cavidade de paraformaldeído 4 % (PFA) seguido de incubação por 15 min. As cavidades foram lavadas novamente por 3 vezes com PBS 1X e aplicou-se 20 µL/cavidade do intercalante de DNA

diclorohidrato de 4',6'-diamidino-2-fenilindol 1X (DAPI, *Invitrogen*) (Diluição 1:1000), seguido da incubação de 10 min. As cavidades foram novamente lavadas com PBS 1X por 3 vezes e foram aplicados 2 µL de solução p-fenilenodiamina (PPD) (90 % de glicerol; 10 % de Tris 30 mM, pH 8,0) preparados na hora para aderência da lamínula. As lâminas preparadas foram cobertas com uma lamínula de vidro e armazenadas a -20 °C.

A confecção das lâminas nas formas amastigotas foi preparada diferenciando 1×10^6 células THP-1 por poço em 500 µL RPMI 1640 completo em lâminas *Lab-Tek*TM de 8 poços (*Nunc Lab-Tek Chamber Slide System - Thermo Scientific*TM) contendo 40 ng de PMA. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi removido dos poços e adicionado 1×10^7 parasitos em fase estacionária em 200 µL de meio RPMI, as lâminas foram incubadas por 3 h a 37 °C em estufa com atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas 3x com 500 µL de PBS 1x para remoção dos parasitos não internalizados. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de meio RPMI 1640 completo e mantidos a 37 °C em estufa de 5 % de CO₂. Após 72 h de incubação, o meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X. Foram aplicados 100 µL de DAPI 1X (Diluição 1:1000) (*Invitrogen*) e incubados por 10 min a temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente com PBS 1X por 3 vezes e aplicou-se 4 µL PPD preparados na hora para aderência da lamínula. As lâminas foram fechadas com uma lamínula de vidro e armazenadas a -20 °C. A aquisição das imagens de microscopia confocal foram realizadas no microscópio *LSM 510 META ZEISS* do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e analisados no *software Zeiss Zen lite 3.8* do equipamento e no *software ImageJ*.

4.18 Análises estatísticas

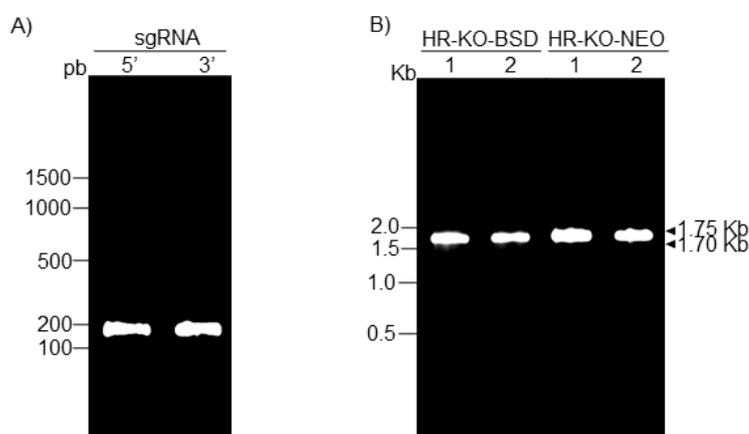
Os gráficos apresentados neste trabalho, bem como as análises estatísticas foram feitos utilizando o *software GraphPad Prism 9.0 (Prism Software Inc. San Diego, CA, EUA)*. A comparação das médias ou medianas dos grupos, foram feitas empregando o teste de análise de variância ANOVA *one-way*, seguido do método de *Dunnet* para comparações múltiplas. Quando pertinente, foi utilizado o teste de hipóteses t de *Student* para comparações de pares com a premissa de seguirem uma distribuição normal. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. O mapa de calor (*heatmap*) foi construído utilizando o pacote *pheatmap* do *software R* e ilustra os genes diferencialmente expressos com *fold change* de 1,5x e $p < 0,01$.

5 RESULTADOS

5.1 Deleção de *kharon1* em *L. infantum* e *L. mexicana*

Na deleção de *kharon1* em *L. infantum* foram utilizados como DNAs doadores os marcadores de resistência aos antibióticos de blasticidina (BSD) e neomicina (NEO). A figura 13 mostra os géis de eletroforese correspondentes aos sgRNAs 5' e 3' com 144 pb cada e dos DNAs doadores, apresentando respectivamente 1700 pb e 1750 pb.

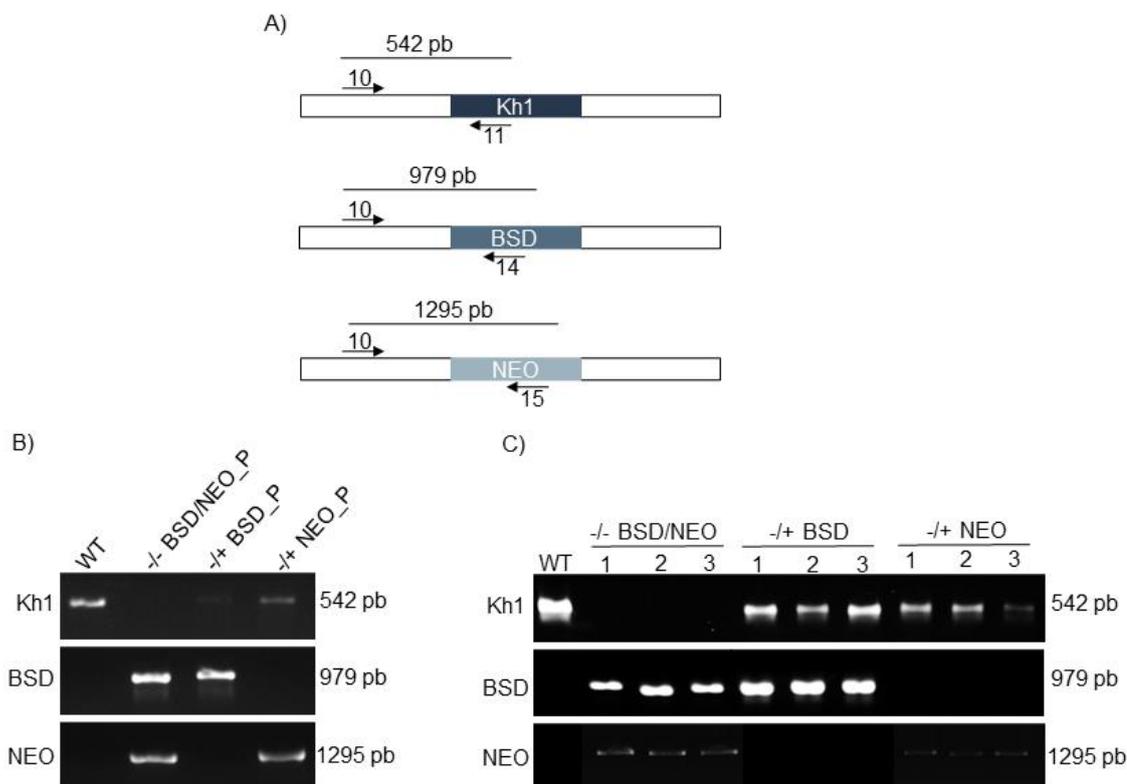
Figura 13: Produtos de PCR destinado à deleção de *kh1* em *L. infantum*.



A) Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos destinados a transcrição *in vivo* pela RNAP T7 dos sgRNAs guias 5' e 3' com 144 pb cada. B) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos DNAs doadores ligados com aproximadamente 30 nt correspondente às UTRs que flanqueiam o gene *kh1*. Os fragmentos de recombinação homóloga (HR) foram amplificados utilizando como molde os plasmídeos que conferem resistência à blasticidina (BSD) (1,7 Kb) e neomicina (NEO) (1,75 Kb) (Tabela 1).

Os produtos de PCR obtidos *in vitro* foram co-transfectadas em promastigotas no final da fase logarítmica e, posteriormente foram divididas em três garrafas de cultura contendo diferentes combinações de antibióticos (ambos os antibióticos BSD+NEO; apenas BSD; ou apenas NEO), utilizando as concentrações apresentadas na Tabela 4. Após a seleção e o estabelecimento da cultura de forma estável, a células foram caracterizados genotipicamente tanto para o nocaute quanto para a inserção correta dos DNAs doadores (Figuras 14 e 15). Utilizamos diferentes combinações de iniciadores que consistiram: (i) um iniciador senso para a região 5' UTR do gene *kh1* em conjunto com o iniciador antisenso de uma região interna do gene gerando um produto de 542 pb; (ii) 5' UTR de *kh1* com o iniciador antisenso de BSD com 979 pb; (iii) 5' UTR do gene com o iniciador NEO gerando um produto de 1295 pb (Figura 14 A).

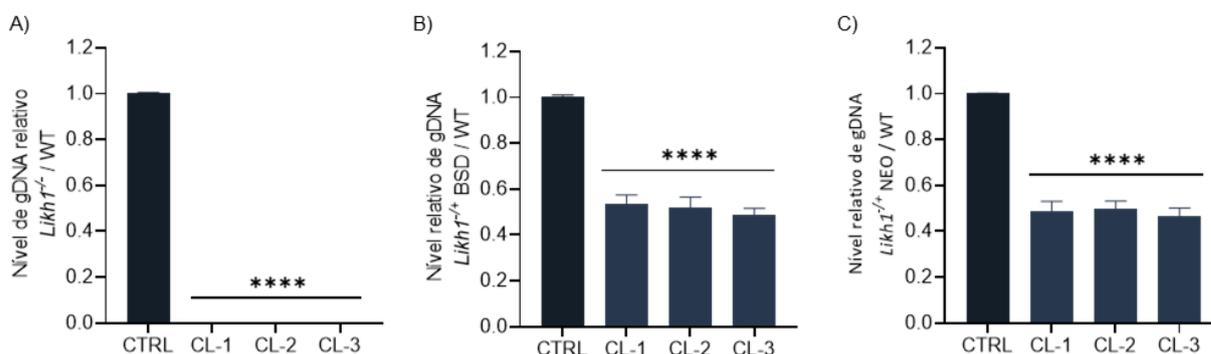
Figura 14: Confirmação da deleção de *kharon1* e integração do DNA doador em *L. infantum*.



A) Estratégia de ampliações utilizados na PCR para confirmação da deleção e inserção dos DNAs doadores. As imagens das bandas mostram que em *L. infantum* obteve-se correta deleção do *kharon* com a presença dos DNAs doadores, tanto para a poluição de células transfectadas (B), quanto para os clones selecionados (C), utilizando mais de um antibiótico para seleção. Nas culturas onde foram utilizados apenas um antibiótico de seleção, é possível observar a presença da banda correspondente a *kh1*. WT: Célula selvagem; -/- BSD/NEO_P: população de células selecionadas com BSD e NEO; +/- BSD_P: População de células selecionadas com BSD; +/- NEO_P: população de células selecionadas com NEO; -/- BSD/NEO_CL 1 - 3: clones de células selecionadas com BSD e NEO; +/- BSD_CL 1 - 3: clones de células selecionadas com BSD; +/- NEO_CL 1 - 3: clones de células selecionadas com NEO.

Os níveis da dosagem gênica do gene *kharon1* por qPCR mostraram que os nulos com os dois antibióticos concomitantes na cultura, não apresentaram nenhum sinal correspondente à amplificação, diferentemente das culturas expostas com apenas um antibiótico, que mostraram em torno de 50 % de sua presença nos clones, indicando que provavelmente apenas um alelo foi deletado (Figura 15). Esses dados corroboram os obtidos pela PCR convencional, que mostraram ausência da banda correspondente a *kharon1* nos nocautes e presença de banda nos hemi-nocautes.

Figura 15: Dosagem gênica por qPCR do gene *kh1* nos clones selecionados em *L. infantum*.

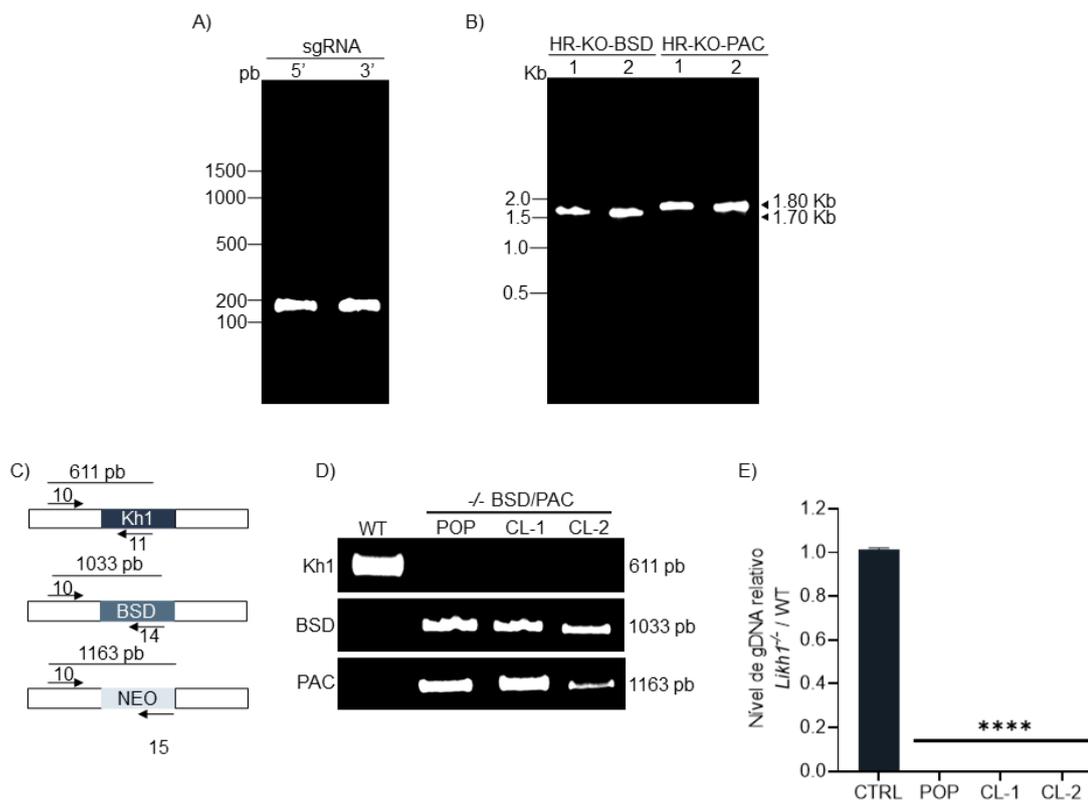


A) Nível de DNA relativo dos clones *kh1*^{+/+} BSD/NEO em relação ao controle. B) Nível de DNA relativo dos clones *kh1*^{+/+} BSD em relação ao controle. C) Nível de DNA relativo dos clones *kh1*^{+/+} NEO em relação ao controle. O gene interno *GAPDH* foi utilizado como normalizador. CTRL: WT – Célula selvagem; CL-1, CL-2; CL-3: clones independentes (***) $p < 0,0001$ – one-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnet*).

Estes resultados demonstraram a eficiência de deleção de *kharon1* em *L. infantum*, sendo possível obter a deleção completa do gene com apenas um ciclo de transfecção quando utilizado dois marcadores diferentes de seleção como DNAs doadores e o uso concomitante dos antibióticos correspondentes. Apesar de serem derivados da mesma transfecção, a utilização de apenas um antibiótico na cultura em seleção não garante a deleção completa de todas as cópias do gene.

De acordo com a experiência a partir da deleção em *L. infantum*, a estratégia em *L. mexicana* foi em utilizar a seleção direta com adição dos dois antibióticos. Para este fim, foram utilizados os RNAs guias 5' e 3' complementares a *kharon1* em *L. mexicana* com 144 pb e como DNAs doadores foram utilizados a blasticidina (BSD) com 1700 pb e puomicina (PAC) com 1800 pb (Figura 16A-B). De forma análoga a estratégia utilizada anteriormente, a validação se deu por meio de diferentes combinações dos iniciadores nas culturas pré-estabelecidas: (i) iniciador correspondentes a região 5' UTR de *kh1* (senso) com o iniciador antisense da região interna do gene gerando um produto de 611 pb; (ii) 5' UTR de *kh1* com o iniciador antisense de BSD com 1033 pb; e (iii) 5' UTR de *kh1* com o iniciador antisense de NEO com 1163 pb (Figura 16C-D). A qPCR também foi aplicada para avaliação dos níveis de dosagem gênica (Figura 16E). Como controle foi utilizada a linhagem selvagem de *L. mexicana* (WT).

Figura 16: Deleção de *kharon1* em *L. mexicana*.

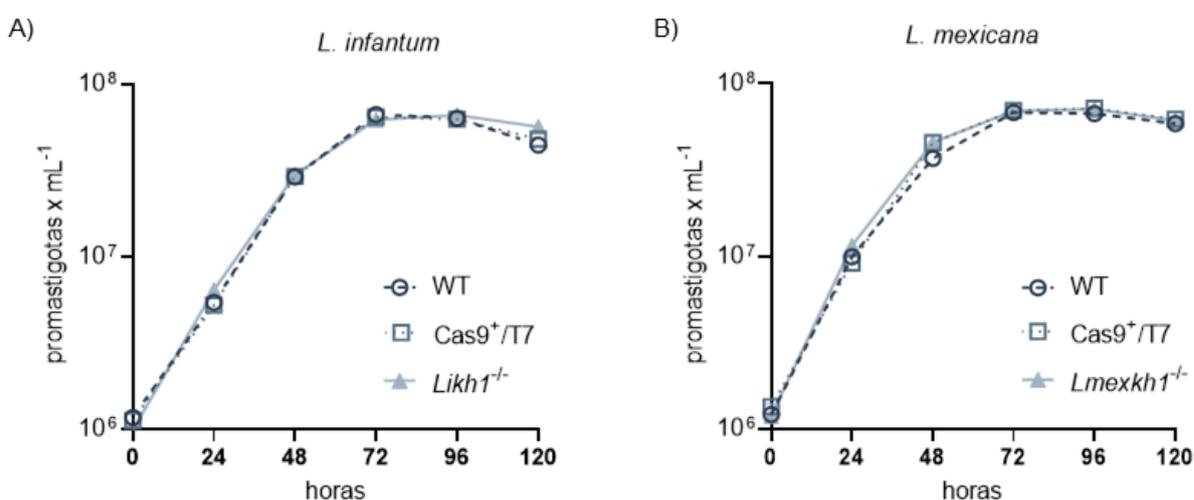


A) Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos destinados à transcrição *in vivo* pela RNAP T7 dos sgRNAs guias 5' e 3'. B) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos DNAs doadores ligados com aproximadamente 30 nt que flanqueiam o gene *kh1*. Os fragmentos de recombinação homóloga (HR) foram amplificados utilizando como molde os plasmídeos que conferem resistência a Blasticidina (BSD) e Puomicina (PAC) (Tabela 1). C) Estratégia de ampliações utilizados na PCR para confirmação da deleção e inserção dos DNAs doadores. D) As imagens das bandas mostram que em *L. mexicana* ocorreu a deleção correta do *kharon1* e integração dos DNAs doadores, tanto para a população como para os clones selecionados por diluição limitante. (E) Nível de DNA relativo de *kh1*^{-/-} BSD/PAC em relação ao controle. Para análise foi utilizado o gene interno *GAPDH* como normalizador. WT: Célula selvagem; POP: População de células transfectadas; -/- BSD/PAC: células selecionadas com BSD e PAC. CTRL: Controle; CL-1, CL-2: clones independentes 1 e 2. (***) $p < 0,0001$ – one-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnet*).

5.2 Crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* e *L. mexicana*

Com o objetivo de avaliar se a deleção de *kharon1* altera o crescimento nas formas promastigotas em cultura quando comparados aos controles selvagem (WT) e o *LiCas9⁺/T7*, foi realizado uma curva de crescimento *in vitro* dos mutantes *Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}*. Para esta análise foi selecionado um clone celular, onde posteriormente foi utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho (Figura 17).

Figura 17: Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* e *L. mexicana* na presença ou ausência do gene *kh1*.



A concentração de parasitos foi determinada a cada 24 h por meio da contagem do número de parasitos. Os dados apresentados mostram a média de três experimentos independentes realizados em triplicata (*One-way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunnet*).

Podemos observar que não houve diferença entre os grupos, tanto para *L. infantum*, quanto para *L. mexicana*, mostrando que a ausência de *kharon1* em ambas as espécies, ou a presença do plasmídeo epissomal pTB007 (Tabela 1) não altera o crescimento das formas promastigotas quando cultivadas *in vitro*. Assim, pode-se concluir que *kharon1* não é um gene essencial para as formas promastigotas desses parasitos e que o plasmídeo correspondente a tradução da nuclease Cas9⁺ e da RNA polimerase T7 não afeta a sua viabilidade.

5.3 Caracterização fenotípica das vacinas vivas atenuadas

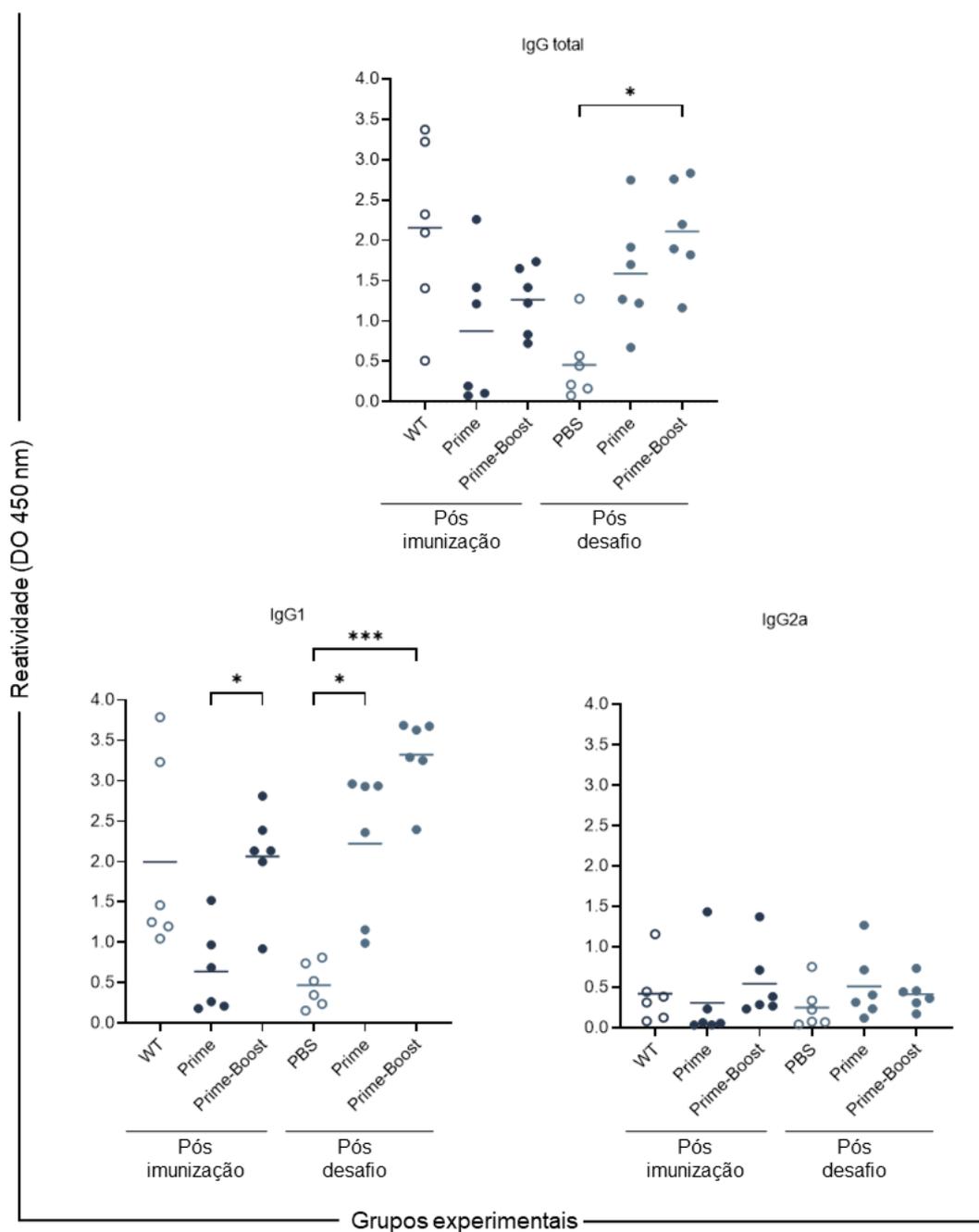
As espécies atenuadas geradas, foram avaliadas quanto a sua imunogenicidade, resposta imune frente o desafio virulento e proteção por meio da carga parasitária, utilizando modelos murinos BALB/c de acordo com duas abordagens de proteção: vacinação com *Likh1^{-/-}* e desafio com *LWT* (proteção homóloga) e vacinação com *Lmexkh1^{-/-}*, seguida do desafio com *LWT* (proteção heteróloga). As duas abordagens tiveram protocolos de imunização com uma e duas doses da vacina (esquemas *prime* e *prime-boost* respectivamente). Todos os ensaios tiveram um intervalo de 30 dias a partir de cada objetivo.

5.3.1 Proteção homóloga

5.3.1.1 Resposta imune humoral

A resposta humoral induzidas pela vacina *Likh1^{-/-}* foi avaliada pelos títulos de anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a nos soros dos camundongos pós-vacinação e pós-desafio, comparados com seus respectivos controles. Após a vacinação, não houve aumento de imunoglobulinas IgG total, IgG1 e IgG2a em relação ao controle; apenas foi observado um aumento de IgG1 com duas doses quando comparado com uma dose (Figura 18). Nos grupos imunizados e posteriormente desafiados, houve um aumento de IgG total no esquema de dose dupla e de IgG1 com uma e duas doses em relação ao controle (Figura 18).

Figura 18: Resposta humoral avaliada por meio da dosagem de imunoglobulinas murinas antileishmania na proteção homóloga.

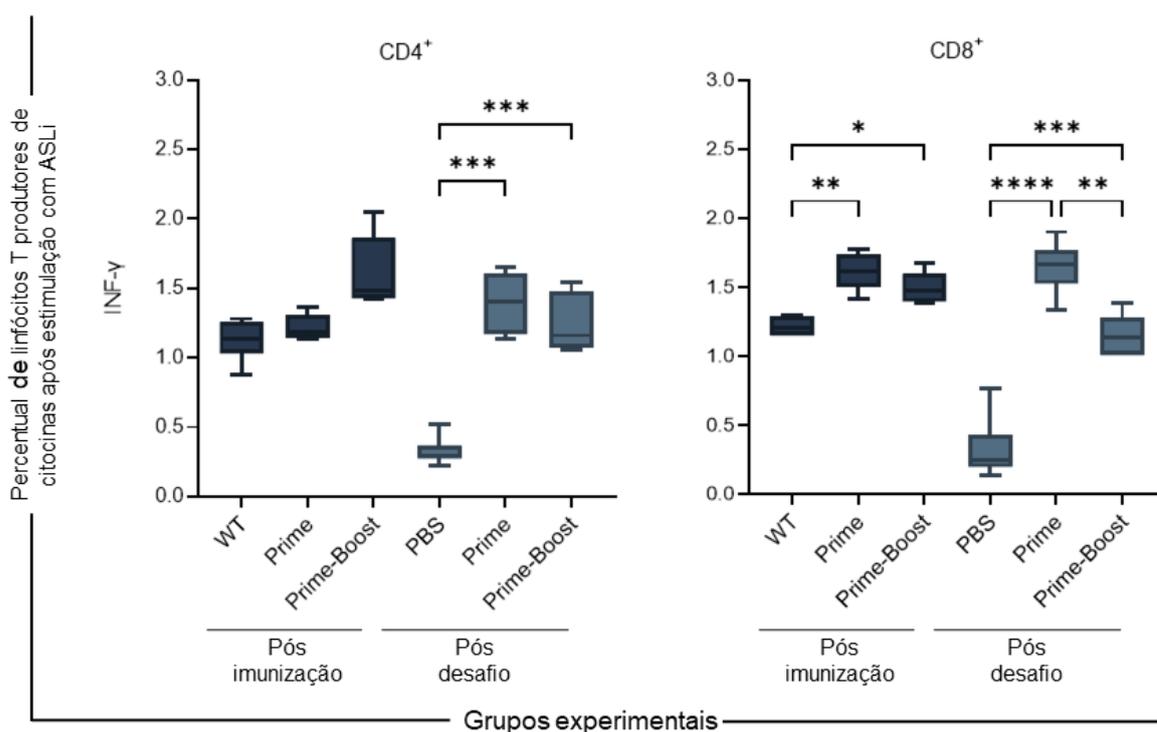


IgG total, IgG1 e IgG2a no soro de camundongos BALB/c nos grupos (i) apenas vacinados com *Likh1*^{-/-}; e (ii) vacinados com *Likh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores de absorvância em 450 nm são apresentados como a média da distribuição dos valores apresentados para cada ponto. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. infantum*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com o veículo PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnet).

5.3.1.2 Citocinas intracitoplasmáticas (resposta imune celular)

A citocina intracitoplasmática (CIC) produzida pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ das culturas de esplenócitos após a estimulação com *ASLi* estão apresentados na figura 19, e as estratégias de análises dos *gates* estão descritos conforme a figura 9. Podemos observar que nos animais apenas imunizados, houve um aumento de IFN- γ produzidos pelos linfócitos T CD8⁺ em ambos os protocolos (*prime* e *prime-boost*) em relação ao controle infectado. Já nos grupos vacinados e desafiados, houve aumento de IFN- γ tanto pelos linfócitos T CD4⁺ quanto pelos T CD8⁺ nos dois esquemas vacinais quando comparados com o controle PBS. Foi observado também que a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ foi maior com uma dose do que com duas doses no pós-desafio (Figura 19).

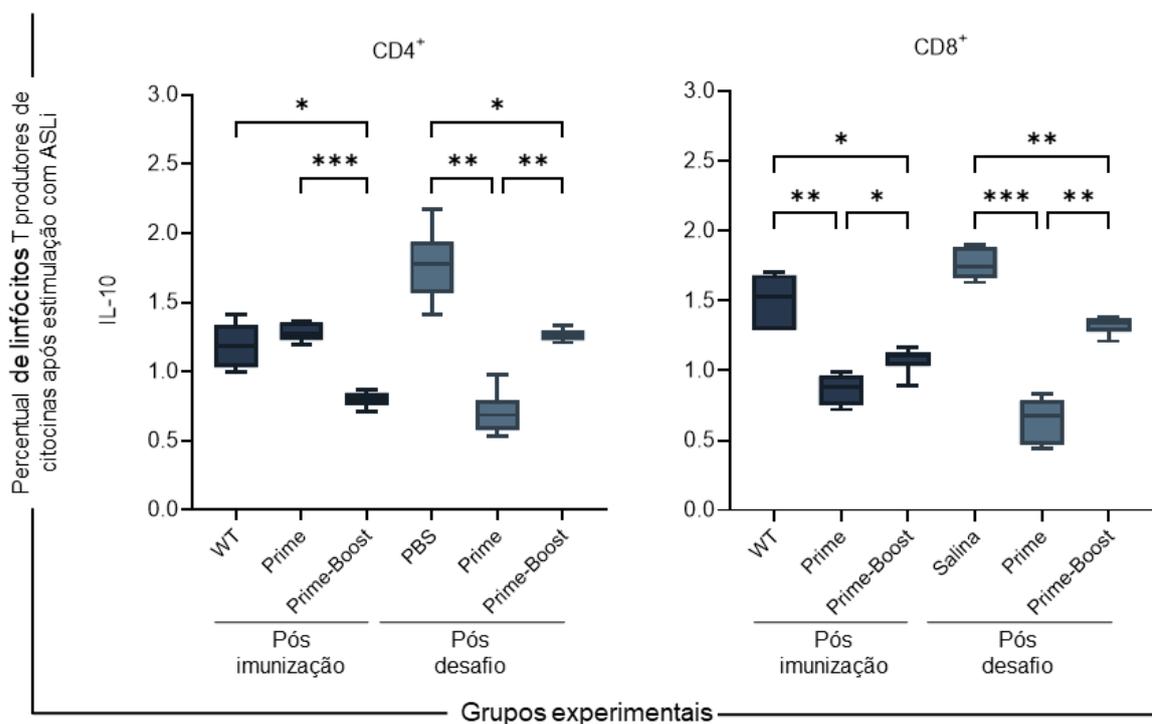
Figura 19: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IFN- γ) após estimulação *in vitro* com *ASLi*.



Esplenócitos de camundongos BALB/c dos grupos (i) vacinados com *Likh1*^{-/-}; e (ii) vacinados com *Likh1*^{+/+} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores dos *boxplots* são expressos em mediana \pm desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. infantum*; *Prime*: animais vacinados com uma dose; *Prime-Boost*: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com o veículo PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (*one-way ANOVA* seguida do teste de comparações múltiplas de *Dunnet*).

Também avaliamos a produção da citocina imunomoduladora IL-10 após estimulação com *ASLi*. Nos resultados, observa-se uma redução de IL-10 nos grupos imunizados em ambos os protocolos de imunização, tanto pelas células T CD4⁺ quanto pelas células T CD8⁺, com exceção da subpopulação T CD4⁺ com uma dose, no qual houve níveis de IL-10 semelhantes ao controle (Figura 20). Nos grupos após o desafio experimental, houve redução de IL-10 nas duas subpopulações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ com uma e duas doses em relação ao controle PBS, destacando os animais que receberam dose única, os quais apresentaram níveis de IL-10 ainda menores (Figura 20).

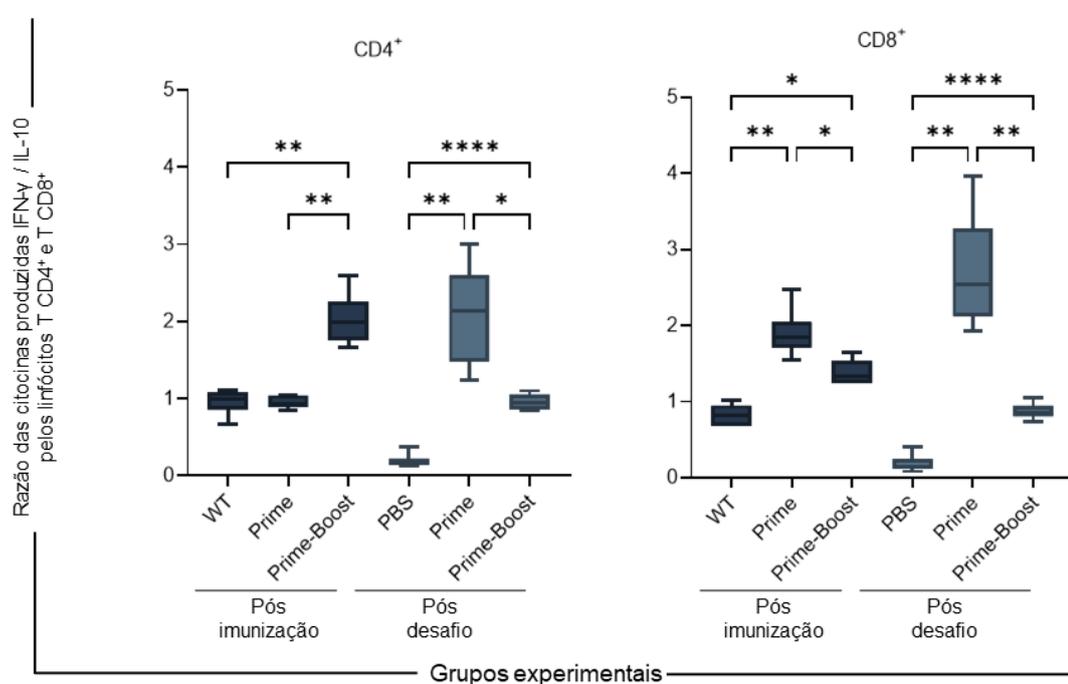
Figura 20: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IL-10) após estimulação *in vitro* com *ASLi*.



Esplenócitos de camundongos BALB/c dos grupos (i) vacinados com *Likh1*^{-/-}; e (ii) vacinados com *Likh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores dos *boxplots* são expressos em mediana \pm desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. infantum*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. As linhas conectoras os grupos comparados * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (*one-way* ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de *Dunnett*).

A razão das citocinas produzidas (IFN- γ /IL-10) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, apresentou um aumento em ambas as subpopulações, tanto nos animais que foram apenas vacinados quanto os animais que foram vacinados e posteriormente desafiados, exceto para subpopulação T CD4⁺ do pós-vacina com dose única, que manteve níveis semelhantes ao controle infectado *LWT*. Estes valores demonstraram ser ainda maiores nos grupos pós-desafio que receberam uma dose de vacina em relação ao controle PBS (Figura 21).

Figura 21: Razão das citocinas produzidas pelos linfócitos (IFN- γ /IL-10) na proteção homóloga.



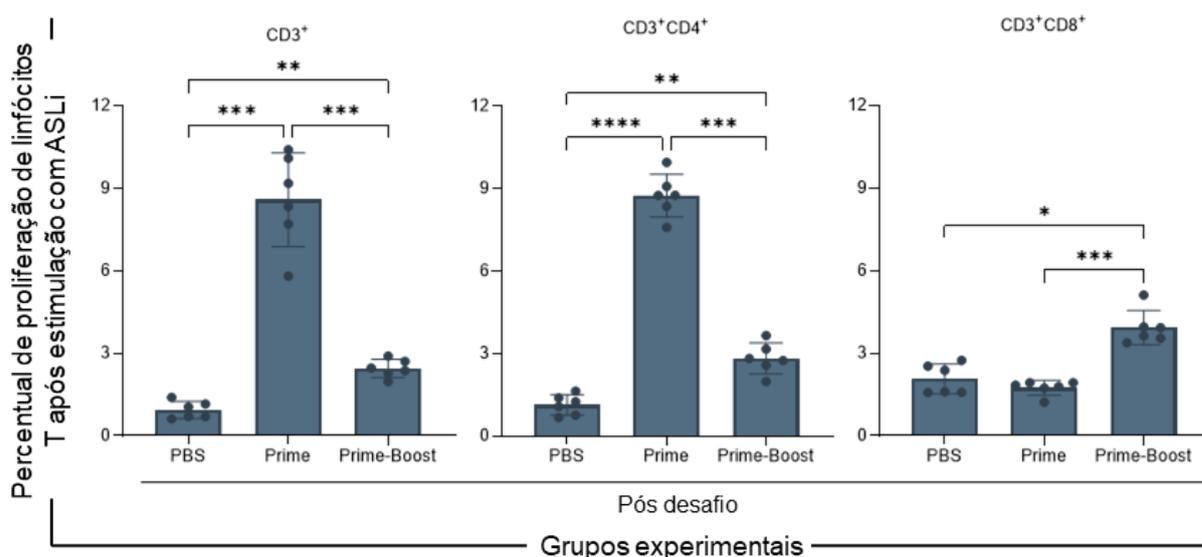
Razão da produção de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ após estimulação com o antígeno ASLi. Esplenócitos de camundongos BALB/c dos grupos (i) vacinados com *Likh1*^{-/-}; e (ii) vacinados com *Likh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores dos *boxplots* são expressos em mediana \pm desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. infantum*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett).

5.3.1.3 Proliferação celular nos grupos pós-desafiados

Após 120 h na presença do antígeno *ASLi*, nos grupos vacinados e posteriormente desafiados, observa-se um aumento da atividade proliferativa de linfócitos T CD3⁺ nos dois protocolos de vacinação em relação ao grupo PBS, destacando o grupo com uma dose de vacina, que apresentou uma proliferação ainda maior em relação ao protocolo de duas doses (Figura 22).

Nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, houve aumento de proliferação em ambos os protocolos, exceto nas células T CD8⁺ com uma dose de vacina, que mantiveram níveis semelhantes ao controle PBS. Destaca-se ainda a contribuição predominante da proliferação de linfócitos T CD4⁺ com dose única (Figura 22).

Figura 22: Percentual da proliferação de linfócitos T na proteção homóloga.



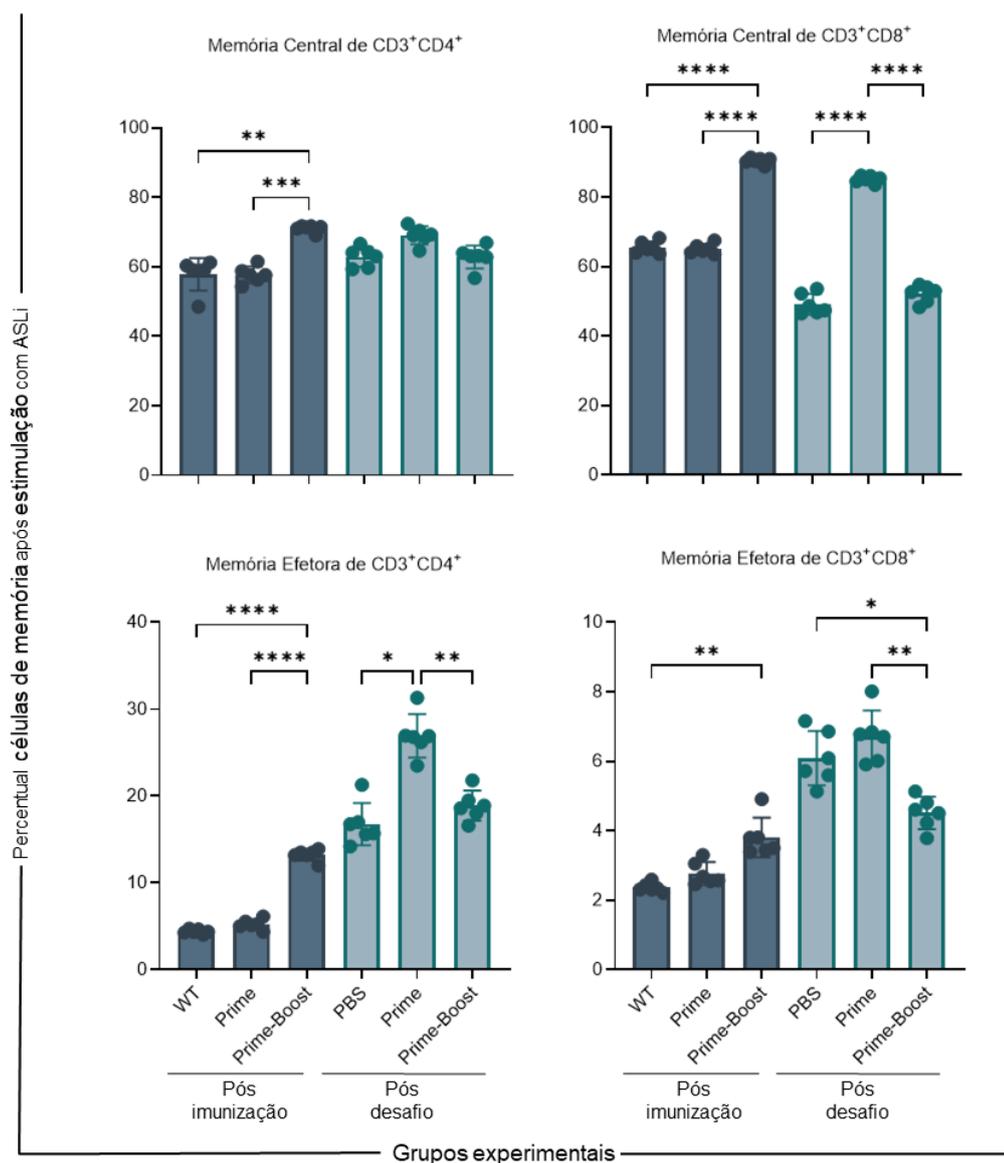
Linfócitos totais (CD3⁺) e suas subpopulações (CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺) após estimulação *in vitro* com *ASLi* em esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com *Likh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). As células do baço foram isoladas dos grupos pós-desafio e após o período de cinco dias com estimulação do antígeno *ASLi* seu perfil de proliferação foi analisado, os resultados de proliferação celular são então expressos na forma de cultura estimulada das células T CD3⁺; CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺. Os valores foram representados com a média ± desvio padrão. *Prime*: animais vacinados com uma dose e desafiados; *Prime-Boost*: animais vacinados com duas doses e desafiados; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001 (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de *Dunnet*).

5.3.1.4 Caracterização dos linfócitos T de memória central e efetora

As análises de memória central (MC) e memória efetora (ME) mostraram que ocorreu produção tanto de MC quanto ME mediadas pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺, destacando o aumento de MC no protocolo de duas doses dos grupos pós-vacinação de ambas as células e o aumento de MC pelas células T CD8⁺ nos grupos pós-desafio

administrados com uma dose. Na memória efetora, destaca-se aumento no protocolo de duas doses tanto pelas células T CD4⁺ quanto pelas T CD8⁺ nos grupos pós-imunização e aumento com uma dose no pós-desafio pelas células T CD4⁺ (Figura 23).

Figura 23: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória central (MC) e memória efetora (ME) na proteção homóloga.

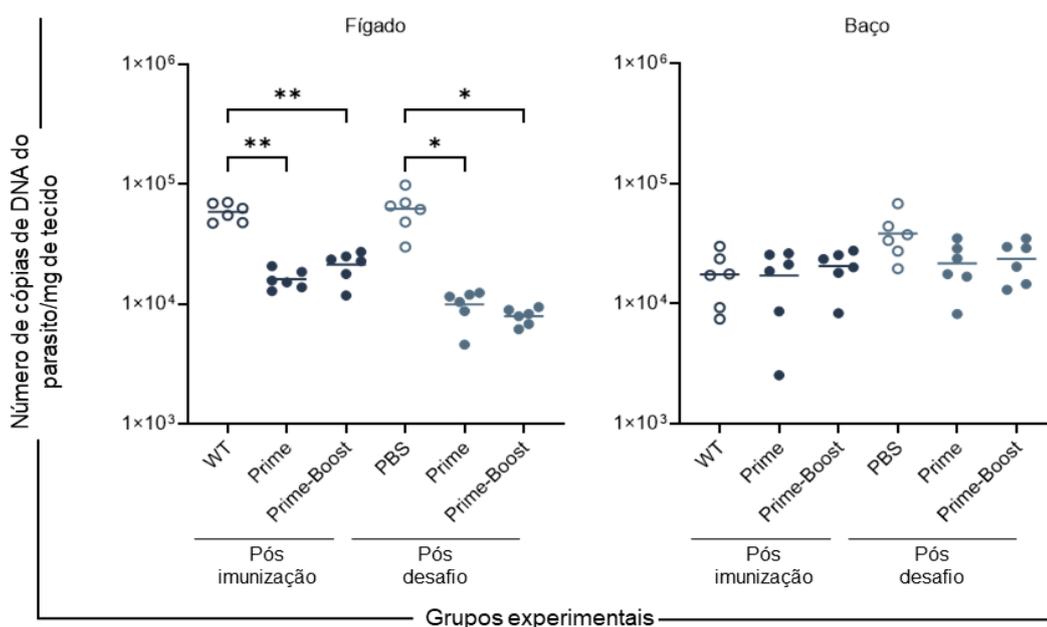


Percentual dos linfócitos de memória após estimulação *in vitro* com ASLi em esplenócitos de camundongos BALB/c dos grupos (i) vacinados com *Likh1*^{-/-}; e (ii) vacinados com *Likh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. infantum*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnet).

5.3.1.5 Eficácia da vacina viva atenuada *Likh1*^{-/-}

A eficácia vacinal utilizando a cepa viva atenuada *Likh1*^{-/-} foi mensurada pela carga parasitária no fígado e no baço dos camundongos BALB/c, sendo estes órgãos escolhidos por serem os principais órgãos acometidos pela LV. No fígado, os resultados pós-imunização mostraram uma diminuição da carga na ordem de 3,5 e 2,8 vezes, respectivamente, para os protocolos de uma e de duas doses, quando comparados com o controle *LWT* (Figura 24). Nos grupos pós-desafio, houve uma diminuição de 6,3 para uma dose e 7,9 vezes para duas doses, comparados com o controle PBS (Figura 24). Não foram detectadas reduções da carga parasitária no baço em nenhum dos grupos. No entanto, é de fundamental importância observar que a carga dos animais vacinados e desafiados não foi maior quando comparada com o grupo PBS. Ressaltamos que os animais vacinados receberam altas doses de parasitos vivos atenuados uma ou duas vezes em intervalos de 30 dias, mostrando que existe um controle da carga nesses órgãos. Espera-se que nesses grupos, a presença da carga seja proveniente dos parasitos vivos atenuados e não dos parasitos selvagens.

Figura 24: Carga parasitária no fígado e no baço dos camundongos BALB/c na proteção homóloga.



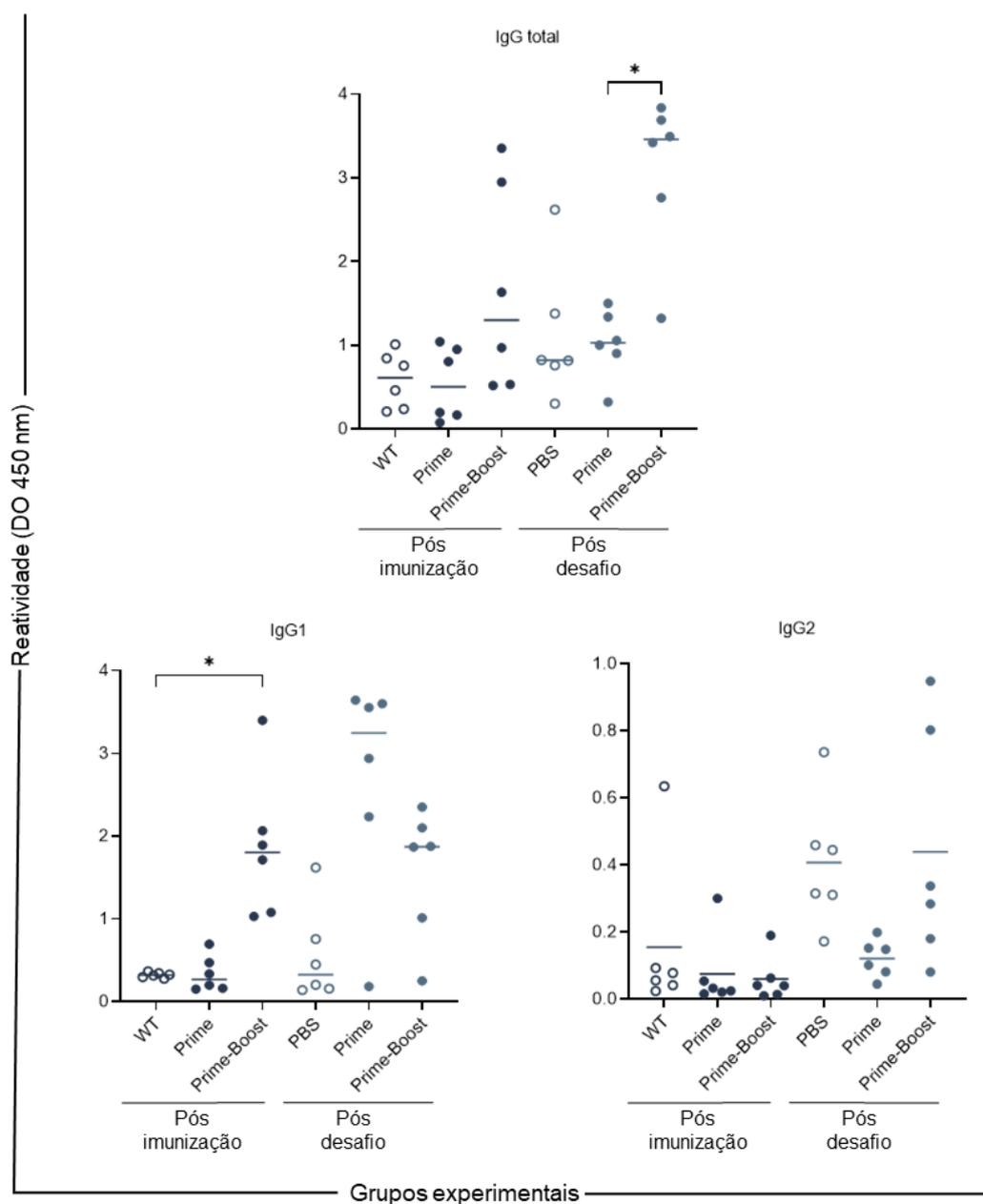
Camundongos BALB/c dos grupos (i) vacinados com *Likh1*^{-/-}; e (ii) vacinados com *Likh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores são expressos pela média com a distribuição dos valores apresentada para cada ponto. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. infantum*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett).

5.3.2 Proteção heteróloga

5.3.2.1 Resposta humoral

De forma análoga a proteção homóloga, na proteção heteróloga, primeiramente avaliamos as respostas humorais pelos títulos dos anticorpos anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a induzidos pela vacina de *Lmexkh1^{-/-}*. Podemos observar que após a imunização não houve aumento de IgG total e IgG2a; no entanto, houve aumento de IgG1 no grupo imunizado com duas doses em relação ao grupo *Lmex^{WT}* (Figura 25). Nos animais imunizados com *Lmexkh1^{-/-}* e desafiados com *L. infantum* WT, observa-se apenas o aumento de IgG total no protocolo com duas doses quando comparados com uma dose. Já em comparação ao controle PBS, nos grupos pós-desafio, não foi observado aumento de imunoglobulinas (Figura 25).

Figura 25: Resposta humoral avaliada por meio da dosagem de imunoglobulinas murinas antileishmania na proteção heteróloga.

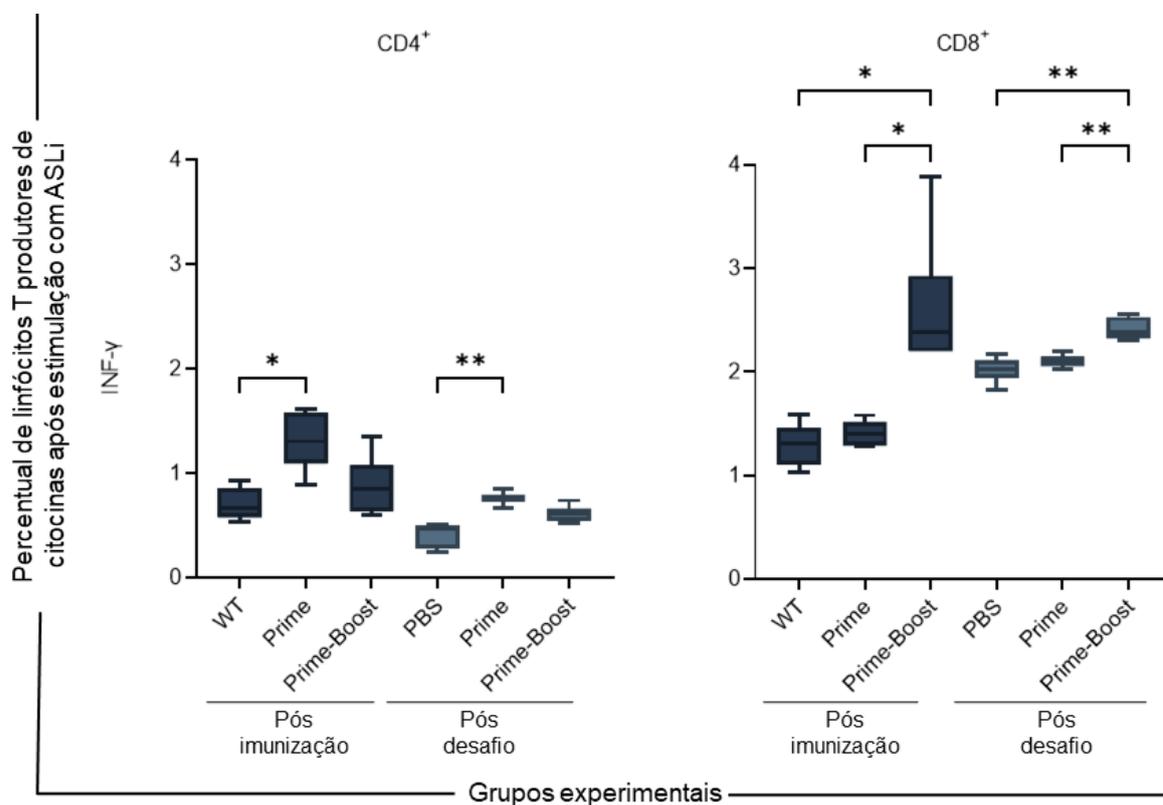


Análise de IgG total, IgG1 e IgG2 no soro de camundongos BALB/c dos grupos (i) vacinados com *Lmexkh1^{-/-}* e (ii) vacinados com *Lmexkh1^{-/-}* e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores de absorbância em 450 nm são descritos em termos de média com a distribuição dos valores apresentada para cada ponto. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. mexicana*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett).

5.3.2.2 Citocinas intracitoplasmáticas

A produção da citocina pró-inflamatória mediada pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos animais vacinados mostrou aumento de IFN- γ nas células T CD4⁺ com uma dose e nas células TCD8⁺ com duas doses (Figura 26). Nos grupos vacinados e posteriormente desafiados, observou-se aumento de IFN- γ pelas células T CD4⁺ com uma dose e pelas células T CD8⁺ com duas doses quando comparados ao controle PBS. Observa-se também aumento de IFN- γ pelas células T CD8⁺ com duas doses em relação a uma dose em ambos os grupos pós-imunização e pós-desafio (Figura 26).

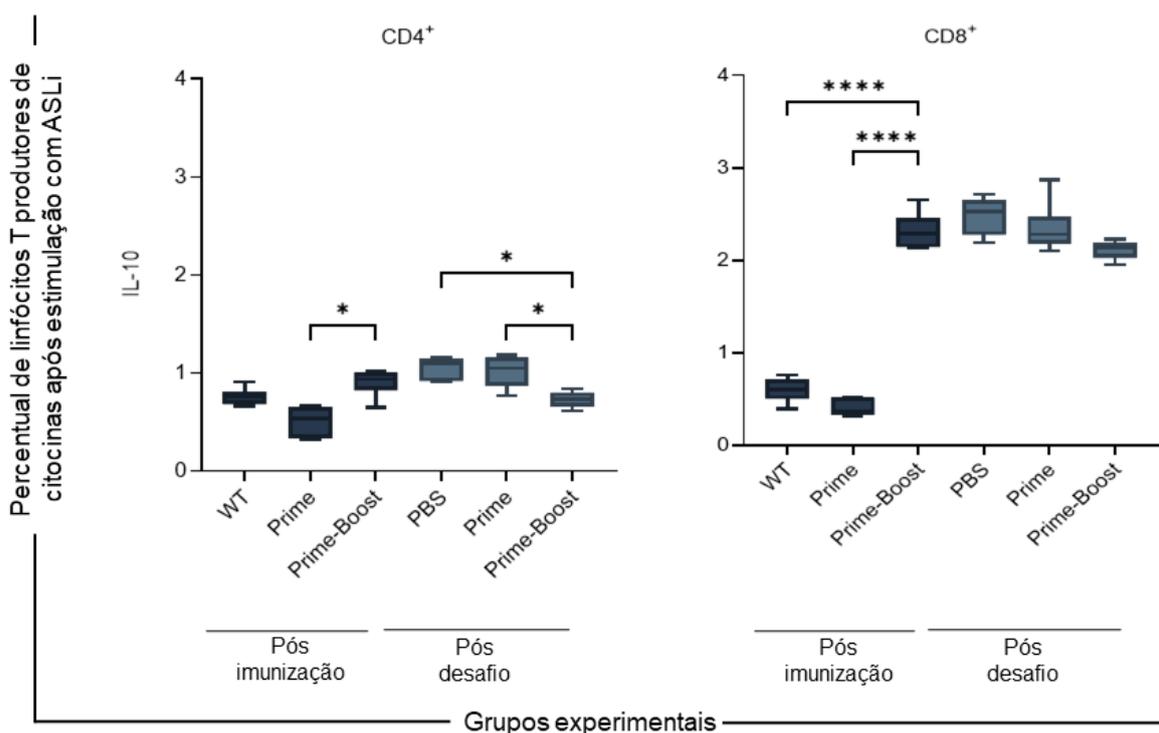
Figura 26: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IFN- γ) após estimulação *in vitro* com ASLi.



Esplenócitos de camundongos BALB/c dos grupos vacinados com (i) *Lmexkh1*^{-/-} e (ii) vacinados com *Lmexkh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores foram expressos em mediana \pm desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. mexicana*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (one-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett).

Os níveis de IL-10 produzidos pelos linfócitos T CD4⁺ não apresentaram redução nos grupos pós-imunização (Figura 27). Entretanto, não houve aumento significativo quando comparados com o controle de infecção *L. mexicana* WT, embora se observe um pequeno aumento de IL-10 com duas doses quando comparados com uma dose nos linfócitos T CD4⁺. Nos linfócitos T CD8⁺, houve aumento de IL-10 no protocolo de dose dupla em relação ao controle *Lmex*WT e ao protocolo de dose única (Figura 27). Já nos grupos imunizados e desafiados, observa-se uma redução de IL-10 nas células T CD4⁺ com duas doses e níveis semelhantes da citocina pelos linfócitos T CD8⁺ com ambos os protocolos vacinais quando comparados ao controle PBS (Figura 27).

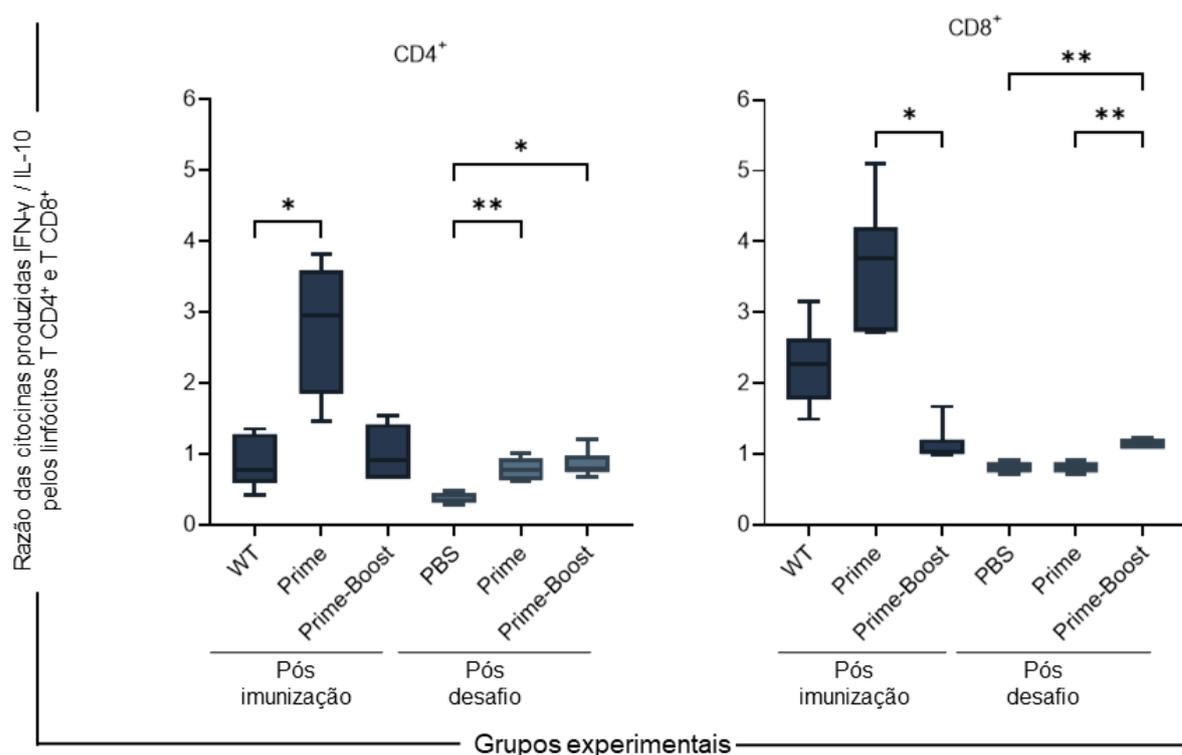
Figura 27: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de citocina intracitoplasmática (IL-10) após estimulação *in vitro* com ASLi.



Esplenócitos de camundongos BALB/c dos grupos vacinados com (i) *Lmexkh1*^{-/-} e (ii) vacinados com *Lmexkh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores foram expressos em mediana \pm desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. mexicana*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum* * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett).

Os parâmetros da razão IFN- γ /IL-10 no pós-imunização pelos linfócitos T CD4⁺ mostraram ser maiores para o grupo imunizado com uma dose. Já nos linfócitos T CD8⁺, observa-se uma tendência desse aumento quando comparados ao controle *Lmex*WT (Figura 28). Nos grupos pós-desafio, é possível observar que a razão IFN- γ /IL-10 em ambos os protocolos vacinas está aumentada nas células T CD4⁺, enquanto nas células T CD8⁺, houve aumento no protocolo de dose dupla (Figura 28).

Figura 28: Razão das citocinas produzidas pelos linfócitos (IFN- γ /IL-10) na proteção heteróloga.



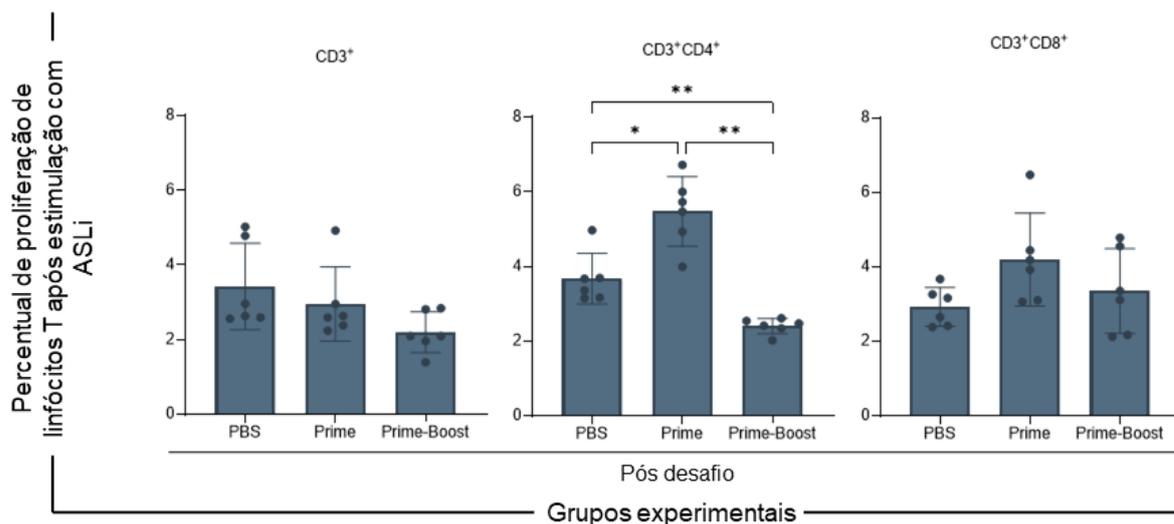
Razão da produção dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ após estimulação com o antígeno ASLi. Camundongos BALB/c vacinados com (i) *Lmexkh1*^{-/-} e (ii) vacinados com *Lmexkh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores foram expressos em mediana \pm desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. mexicana*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett).

5.3.2.3 Proliferação celular nos grupos pós-desafiados

Nenhuma alteração significativa foi encontrada na atividade proliferativa de linfócitos T CD3⁺ em ambos os protocolos de vacinação quando relacionados ao controle PBS (Figura 29). Nos linfócitos T CD4⁺, houve aumento de proliferação em relação às duas doses e ao controle PBS, além de uma menor taxa de proliferação no esquema de dose dupla em relação aos outros grupos (Figura 29). Nas

subpopulações T CD8⁺, os valores se mantiveram semelhantes entre todos os grupos (Figura 29).

Figura 29: Percentual da proliferação de linfócitos T na proteção heteróloga.

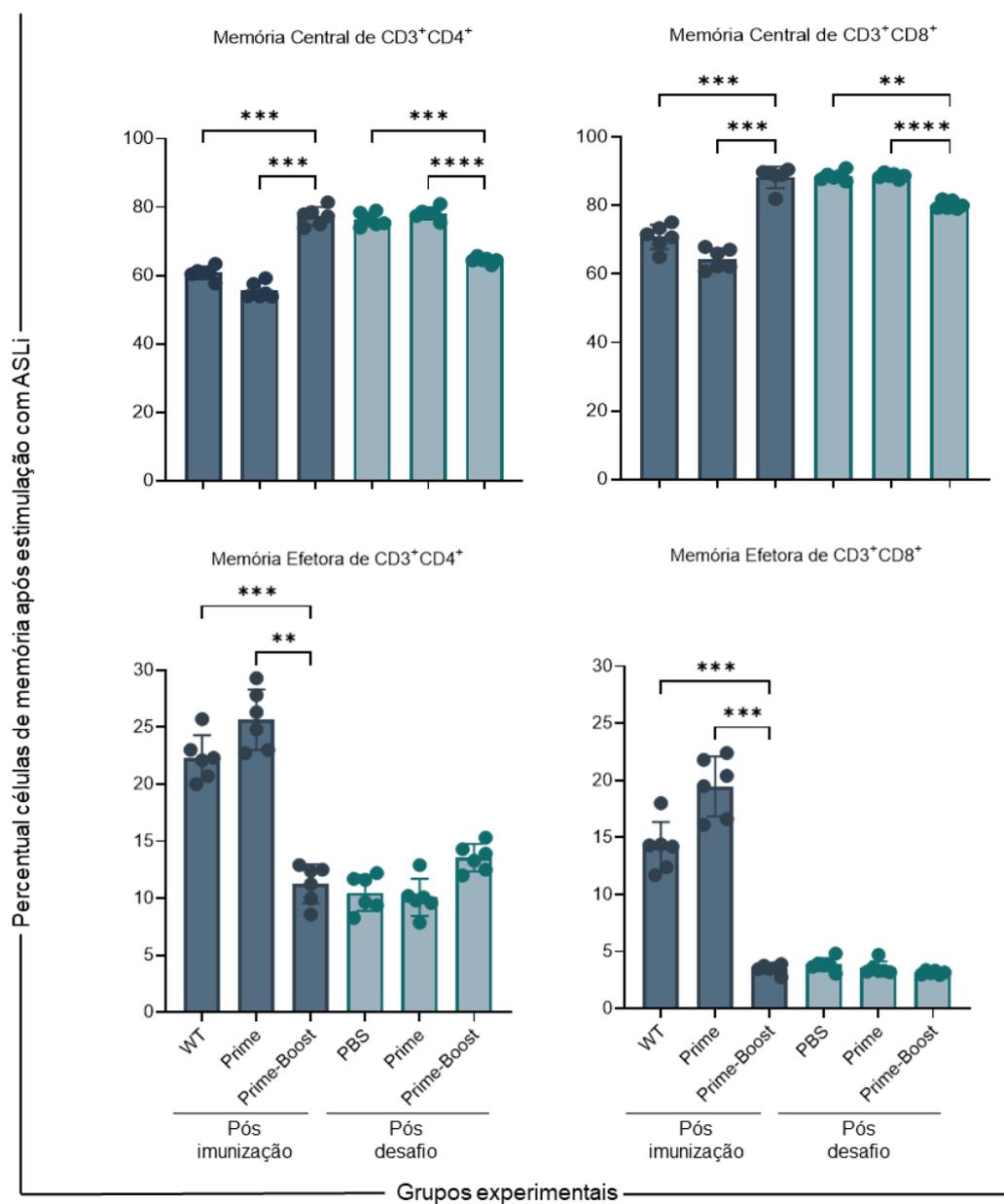


Linfócitos totais (CD3⁺) e suas subpopulações (CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺) após estimulação *in vitro* com ASLi em esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com *Lmexkh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores foram expressos com a média ± desvio padrão. *Prime*: animais vacinados com uma dose e desafiados; *Prime-Boost*: animais vacinados com duas doses e desafiados; *PBS*: animais vacinados com PBS e desafiados com *L. infantum* (WT). **p* < 0,05; ***p* < 0,01 (*one-way* ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de *Dunnet*).

5.3.2.4 Caracterização dos linfócitos T de memória central e efetora

As frequências de células de MC nos grupos pós-imunizados mostraram um aumento do fenótipo nos animais que receberam duas doses de vacina quando comparados aos que receberam uma dose e ao controle *LmexWT*, tanto nos linfócitos T CD4⁺ quanto nos linfócitos T CD8⁺ (Figura 30). No pós-desafio, observa-se uma menor taxa nos grupos que receberam duas doses de vacina em relação aos outros dois grupos (Figura 30). No que se refere à ME, os animais pós-imunizados apresentaram maiores frequências quando administrados com apenas uma dose de vacina, tanto nos linfócitos T CD4⁺ quanto nos linfócitos T CD8⁺, com uma baixa significativa com duas doses da vacina, comparados ao controle *LmexWT*. Não houve diferença de ME nos grupos pós-desafio (Figura 30).

Figura 30: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória central (MC) e memória efetora (ME) na proteção heteróloga.

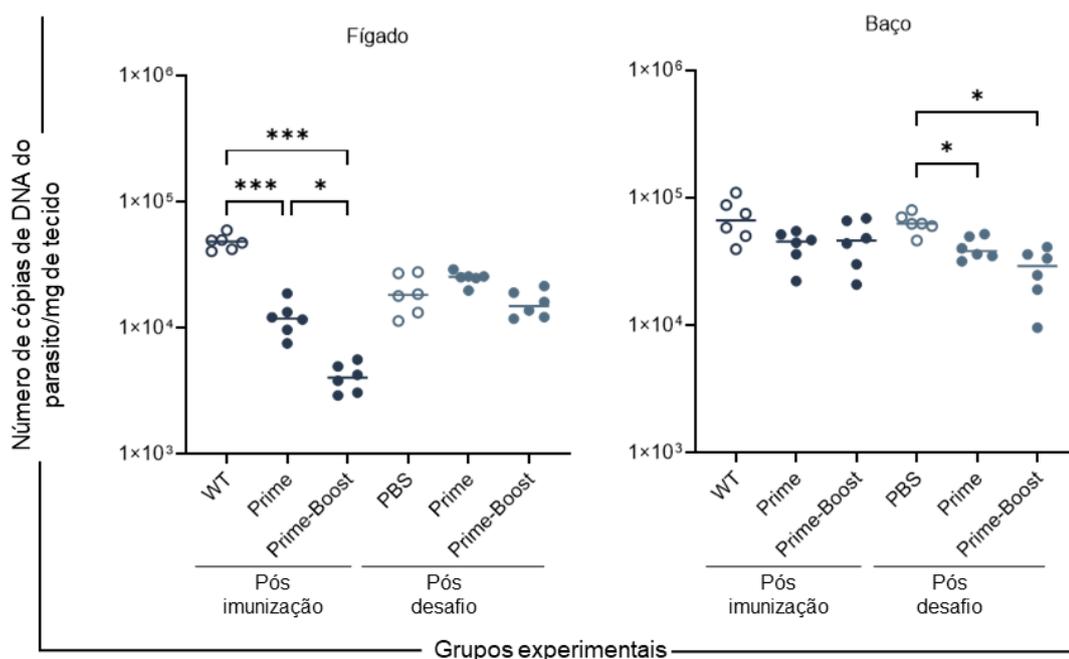


Percentual dos linfócitos após estimulação *in vitro* com ASLi em esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com (i) *Lmexkh1*^{-/-} e (ii) vacinados com *Lmexkh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores foram expressos em média ± desvio padrão. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. mexicana*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett).

5.3.2.5 Eficácia da vacina viva atenuada *Lmexkh1*^{-/-}

A carga parasitária no fígado nos grupos pós-imunização teve uma diminuição na ordem de 4 e 12 vezes nos animais vacinados com uma e com duas doses, respectivamente, em comparação ao controle *Lmex*WT, com uma diferença de 3 vezes em relação aos dois protocolos de vacinação (Figura 31). Não foi observada diferença significativa no baço entre os grupos apenas imunizados (Figura 31). Nos grupos pós-desafio, houve diminuição da carga apenas no baço na ordem de 1,5 e 2,3 para os animais vacinados com uma e com duas doses, respectivamente, comparados com o controle PBS (Figura 31).

Figura 31: Carga parasitária no fígado e no baço de camundongos BALB/c na proteção heteróloga.

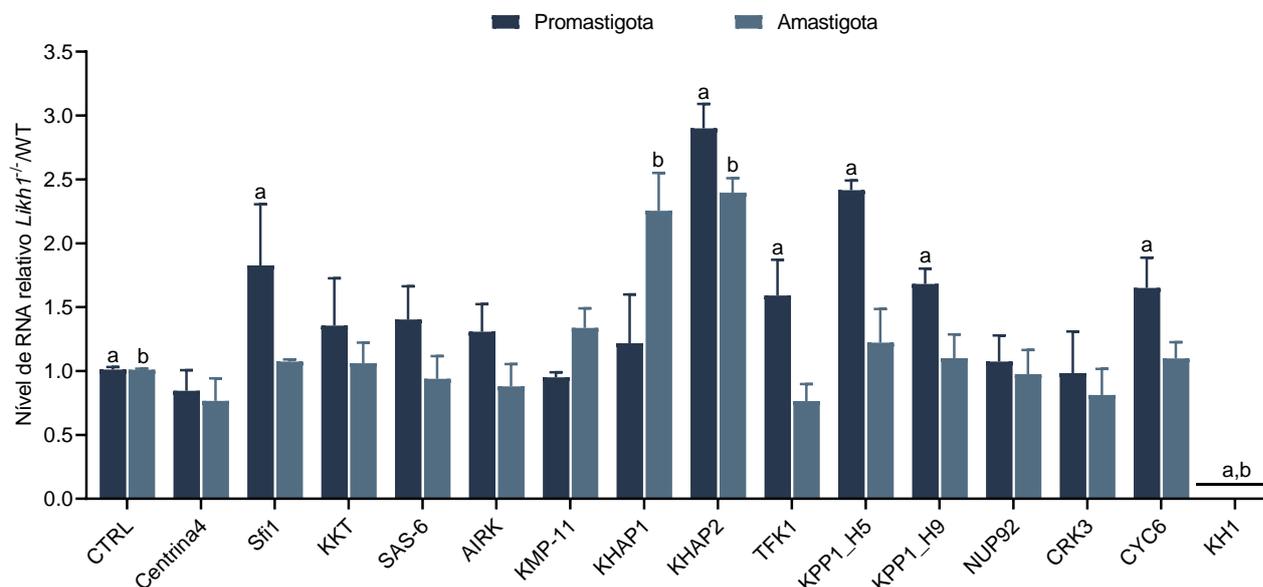


Camundongos BALB/c dos grupos vacinados com (i) *Lmexkh1*^{-/-} e (ii) vacinados com *Lmexkh1*^{-/-} e desafiados com *L. infantum* (WT). Os valores são expressos pela média com distribuição dos valores apresentada considerando cada ponto. WT: animais infectados pela via subcutânea com a cepa selvagem de *L. mexicana*; Prime: animais vacinados com uma dose; Prime-Boost: animais vacinados com duas doses; PBS: animais vacinados com PBS e desafiados pela via intravenosa com a cepa selvagem de *L. infantum*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (one-way ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnet).

5.4 Expressão gênica de transcritos para alvos associados à divisão celular e ao citoesqueleto em *Likh1*^{-/-}

Devido às diferentes localizações e características fenotípicas encontradas nas formas promastigotas e amastigotas em *Leishmania* sp., a proteína KHARON1 é considerada multifuncional, exercendo funções distintas de acordo com sua localização. Consequentemente, em diferentes regiões, podem existir diferentes complexos proteicos dos quais KHARON1 faz parte. Uma hipótese sobre uma das funções desconhecidas de KH1 é que ela auxilia na dinâmica da divisão celular, interagindo com diversas outras proteínas. Nesse contexto, realizamos uma busca na literatura e selecionamos 13 alvos associados a eventos como início da divisão, segregação cromossômica e citocinese, além de proteínas já descritas como parceiras de KHARON1. Como a regulação pode ser estágio específica, avaliamos os níveis de expressão gênica tanto nas formas promastigotas quanto em amastigotas de *Likh1*^{-/-} e comparamos aos da cepa parental. Nas formas promastigotas, observamos níveis aumentados de transcritos que codificam para as proteínas Sfi1 (1,8 x), KHAP2 (2,9 x), TFK1 (1,6 x), os homólogos KPP1_H5 e KPP2_H9 (com 2,4 e 1,7 x, respectivamente), além de CYC6 (1,7 x) (Figura 32). Já as formas amastigotas, observamos um aumento nos níveis de KHAP1 (2,2 x) e KHAP2 (2,4 x) (Figura 32). Estes resultados sugerem ações compensatórias desses alvos associados quando o gene de *kharon1* é deletado em *L. infantum*.

Figura 32: Análise dos níveis de transcritos que codificam para proteínas associadas à divisão celular e/ou ao citoesqueleto em promastigotas e amastigotas de *Likh1*^{-/-}.

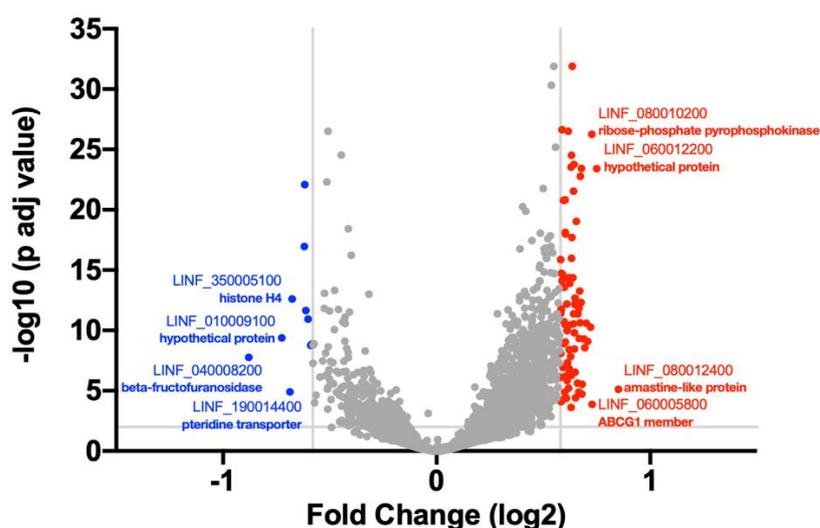


Os níveis dos transcritos foram avaliados utilizando o mutante *Likh1*^{-/-} em relação com o controle *LMT* tanto em formas promastigotas (azul escuro) quanto em amastigotas (azul claro). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média de três replicatas biológicas. Centrina4: Centrina-4; Sfi-1: Proteína do corpo do fuso; KMP-11: Proteína de membrana de cinetoplastídeo 11; AIRK: cinase relacionada à aurora; SAS-6: Proteína do corpo basal 6; KKT: Proteína do cinetocoro de cinetoplastídeo; KHAP1: Proteína associada à KHARON1 1; KHAP2: Proteína associada à KHARON1 2; KPP1_H5 e KPP1_H9: Proteína fosfatase 1 específica de cinetoplastídeos; TFK1: proteína de fibra de transição do corpo basal; NUP92: nucleoporina; CRK3: cinase relacionada ao cdc2; CYC6: ciclina dependente de cinase 6; KH1: Proteína KHARON1 (*a,b; $p < 0,05$ – teste t de Student).

5.5 Transcriptoma de *Likh1*^{-/-}

Estimulados pelos resultados da expressão diferencial dos alvos selecionados, decidimos investigar o transcriptoma das promastigotas de *Likh1*^{-/-} no intuito de prospectar novos alvos em potencial que sejam diferencialmente expressos. A análise de sequenciamento de cDNA permitiu a identificação de 8.290 transcritos codificadores de proteínas, dos quais foram identificados 81 transcritos (aproximadamente 1 %) diferencialmente expressos (DE), utilizando como critério de *p* valor ajustado <0,01 ou menos e com uma mudança de Log2 de pelo menos 0,5 (valor absoluto) (Figura 33). Desses transcritos DE, 9 foram regulados negativamente (*dowregulated*), indicados pelos pontos azuis, e 72 regulados positivamente (*upregulated*), indicados pelos pontos vermelhos (Figura 33).

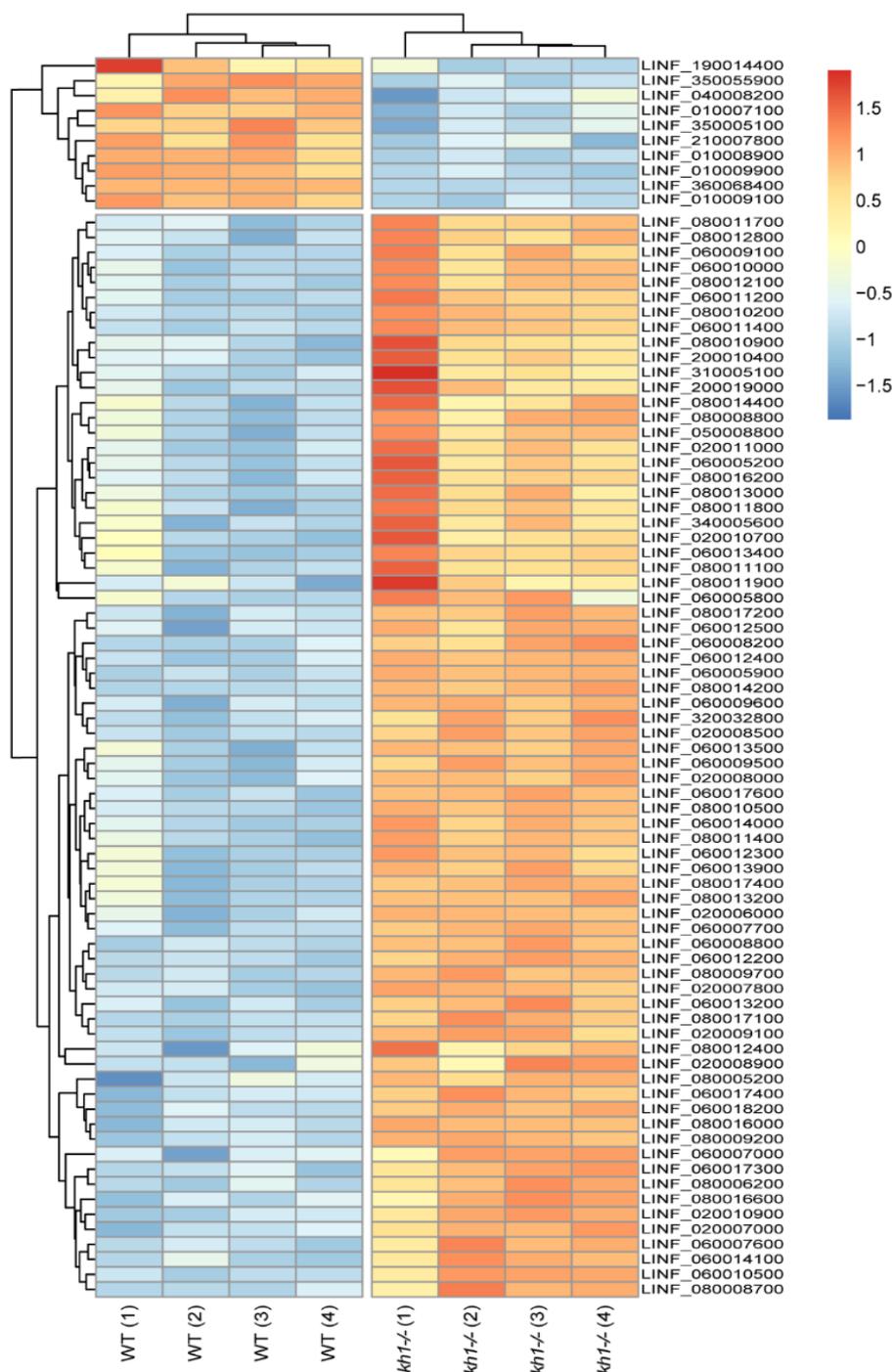
Figura 33: Gráfico de vulcão (*volcano plot*) indicando transcritos diferencialmente expressos nos mutantes *Likh1*^{-/-}/WT.



Os dados foram obtidos por sequenciamento de cDNA das promastigotas de *Likh1*^{-/-} e WT. Eixo Y: -log10 do *p* valor ajustado; eixo x: Log2Fold change de *Likh1*^{-/-}/WT.

Ao selecionar apenas os transcritos diferencialmente expressos, foi plotado um mapa de calor (*Heatmap*) representando os *dowregulated* (tons frios - azul) e *upregulated* (tons quentes - vermelho) dos *Likh1*^{-/-} em relação ao LWT (Figura 34). Os valores são representados como transcritos por milhão (TPM) de cada réplica biológica.

Figura 34: Representação em mapa de calor (*heatmap*) dos genes diferencialmente expressos.



WT (1-4) representam as réplicas biológicas das promastigotas de *L. infantum* selvagem; *Likh1*^{-/-} (1-4) representam as réplicas biológicas das promastigotas de *L. infantum* deficiente de *kharon1*. Os valores estão representados em transcritos por milhão (TPM).

Os valores de *Log2FoldChange* e *p* valor ajustado dos 81 transcritos DE estão descritos na tabela 13, junto com a descrição dos produtos de cada uma das ORFs.

Tabela 13: Genes diferencialmente expressos entre as promastigotas *Likh1*^{-/-} em relação a LWT.

Genes Regulados Negativamente			
*ID	Log2FoldChange	**padj	Produto
LINF_040008200	-0,879618473	1,68E-08	<i>beta-fructofuranosidase - putative</i>
LINF_010009100	-0,724718863	4,17E-10	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_190014400	-0,68663921	1,28E-05	<i>pteridine transporter (truncated)- putative</i>
LINF_350005100	-0,676478736	2,43E-13	<i>histone H4</i>
LINF_010009900	-0,61945003	1,09E-17	<i>beta eliminating lyase - putative</i>
LINF_010008900	-0,616735848	8,33E-23	<i>Dyggve-Melchior-Clausen syndrome protein - putative</i>
LINF_350055900	-0,612013058	2,30E-12	<i>polyadenylate-binding protein 1</i>
LINF_010007100	-0,602061832	1,16E-11	<i>cyclophilin 12 - putative</i>
LINF_210007800	-0,589488334	1,69E-09	<i>hexokinase - putative</i>
Genes Regulados Positivamente			
*ID	Log2FoldChange	**padj	Produto
LINF_080012400	0,851223124	7,59E-06	<i>amastin-like protein</i>
LINF_060012200	0,750117946	3,91E-24	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060005800	0,727526033	0,000137513	<i>ATP-binding cassette protein subfamily G - member 1 - putative</i>
LINF_080010200	0,726982238	5,57E-27	<i>ribose-phosphate pyrophosphokinase - putative</i>
LINF_080016200	0,72055239	5,40E-11	<i>phosphoribosylpyrophosphate synthetase</i>
LINF_080012800	0,707636521	8,24E-10	<i>amastin-like protein - putative</i>
LINF_050008800	0,701448663	2,57E-11	<i>microtubule-associated protein - putative</i>
LINF_060005200	0,693992713	2,76E-09	<i>WD domain - G-beta repeat - putative</i>
LINF_020011000	0,689509712	5,12E-10	<i>protein kinase - putative</i>
LINF_080011100	0,681765905	2,85E-06	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080010900	0,680002861	1,91E-05	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060009600	0,67856466	3,72E-24	<i>60S ribosomal protein L19 - putative</i>
LINF_080012100	0,675993821	4,85E-13	<i>Amastin surface glycoprotein - putative</i>
LINF_060005900	0,672763784	1,71E-23	<i>ATP-binding cassette protein subfamily G - member 1 - putative</i>
LINF_060012300	0,67164015	2,34E-11	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060009100	0,669850858	5,60E-14	<i>Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar) - putative</i>
LINF_080008700	0,667489926	4,69E-10	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_020008000	0,666959602	1,43E-12	<i>ATP-binding cassette subfamily A - member 1 - putative</i>
LINF_080014400	0,665630843	1,33E-05	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080013200	0,661986987	4,23E-12	<i>SET domain containing protein - putative</i>
LINF_060013900	0,659519902	2,34E-06	<i>Qb-SNARE protein - putative</i>
LINF_060014000	0,654579812	9,14E-20	<i>lipin - putative</i>
LINF_310005100	0,65068575	3,94E-05	<i>Aquaglyceroporin 1</i>
LINF_060010000	0,648221793	2,13E-13	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_320032800	0,647829378	2,91E-07	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060012400	0,647451646	7,05E-13	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060007600	0,645196365	3,53E-09	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060012500	0,645079171	1,63E-10	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080010500	0,64320217	1,75E-24	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060013500	0,642120401	4,23E-12	<i>hypothetical protein - conserved</i>

LINF_080011700	0,641423524	2,86E-11	<i>DnaJ domain containing protein - putative</i>
LINF_080014200	0,64101193	2,88E-22	<i>Protein of unknown function (DUF2453) - putative</i>
LINF_060018200	0,637694566	4,38E-15	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080009200	0,634581348	1,31E-32	<i>WD domain - G-beta repeat - putative</i>
LINF_080009700	0,633624451	2,01E-18	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080017200	0,631712356	1,03E-16	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060008800	0,631190419	3,04E-25	<i>NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase protein - putative</i>
LINF_060007000	0,6303439	5,47E-07	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080011900	0,630115827	0,000239377	<i>amastin-like protein</i>
LINF_080017100	0,629502926	2,87E-24	<i>Zinc finger - C3HC4 type (RING finger)/Ring</i>
LINF_080005200	0,627277056	1,46E-08	<i>Qc-SNARE protein - putative</i>
LINF_060017400	0,623239362	1,28E-14	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060017300	0,62282783	3,49E-11	<i>Domain of unknown function (DUF4379) - putative</i>
LINF_200010400	0,622423836	2,73E-07	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080006200	0,622073366	5,22E-15	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060010500	0,621438792	4,27E-15	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080013000	0,620991352	3,97E-09	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_020007800	0,620735368	1,44E-07	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_200019000	0,618530218	6,17E-06	<i>pumilio protein 9 - putative</i>
LINF_080016000	0,615659946	3,12E-27	<i>stress-induced protein sti1</i>
LINF_080008800	0,613169835	4,64E-08	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060013400	0,611120393	1,41E-06	<i>RNA-binding protein-like protein</i>
LINF_060014100	0,610547245	1,06E-10	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_020010900	0,610382489	6,37E-13	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_020008900	0,608386058	4,25E-05	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 - putative</i>
LINF_080011800	0,606232614	6,27E-07	<i>protein kinase - putative</i>
LINF_020007000	0,603683185	1,03E-18	<i>phosphoglycan beta 1 -3 galactosyltransferase</i>
LINF_060013200	0,603148293	3,42E-11	<i>Haemolysin-III related - putative</i>
LINF_060009500	0,60279669	9,37E-10	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_020008500	0,602613216	7,57E-19	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060017600	0,601518325	1,52E-21	<i>protein kinase - putative</i>
LINF_340005600	0,600874984	1,32E-05	<i>ascorbate peroxidase</i>
LINF_020006000	0,599567361	3,79E-15	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_020009100	0,597189068	2,74E-14	<i>Mitochondrial protein 81</i>
LINF_060008200	0,596689757	1,89E-11	<i>ribonuclease H1 - putative</i>
LINF_080017400	0,596323775	1,22E-09	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_020010700	0,596206416	5,06E-05	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060007700	0,594718551	1,67E-21	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_080016600	0,592716755	1,17E-07	<i>guide RNA binding protein - putative</i>
LINF_080011400	0,587670261	7,79E-15	<i>hypothetical protein - conserved</i>
LINF_060011400	0,586971841	2,35E-27	<i>60S ribosomal protein L23a - putative</i>
LINF_060011200	0,586841726	2,00E-15	<i>deoxyuridine triphosphatase - putative</i>

*ID (Identificação anotada no Tritydb); **padj (p valor ajustado).

Posteriormente, selecionamos quais desses alvos diferencialmente expressos podem estar envolvidos na divisão celular ou no citoesqueleto, utilizando a plataforma online *Tritydb* (<https://tritypdb.org>). Investigamos tanto alvos já descritos em tripanossomatídeos quanto alvos que codificam para proteínas descritas como hipotéticas. Selecionamos mais quatro alvos que tiveram níveis de transcritos regulados de forma positiva em *Likh1*^{-/-} (Tabela 14).

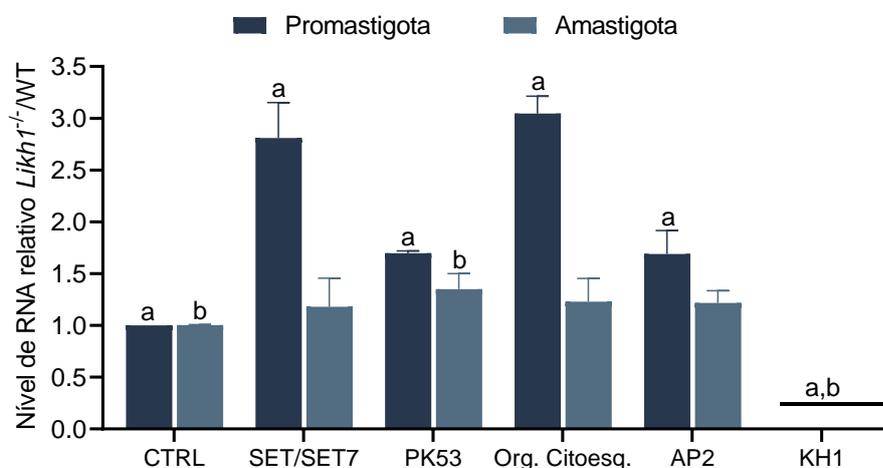
Tabela 14: Ortólogos de alvos proteicos em tripanossomatídeos associados ao citoesqueleto ou com função na divisão celular que foram diferencialmente expressos e *L. infantum kh1*^{-/-}.

ID	Log2FoldChange	*** <i>padj</i>	Descrição	Ortólogos	Organismo
LINF_020011000	0,689509712	5,12E-10	protein kinase - putative	STE/STE7 protein kinase, putative	<i>Trypanosoma brucei</i> Tb1125.2.2720
LINF_060017600	0,601518325	1,52E-21	protein kinase - putative	Nuclear Dbf2-related kinase (PK53)	<i>Leishmania braziliensis</i> LbrM.06.1160
LINF_080011400	0,587670261	7,79E-15	hypothetical protein - conserved	Hypothetical protein, conserved (GO function: cytoskeleton organization)	<i>Leishmania tarentolae</i> LtaP08.0600
LINF_060017400	0,623239362	1,28E-14	hypothetical protein - conserved	Anaphase promoting complex-associated Protein AP2	<i>Trypanosoma brucei</i> Tb1125.7.5750

*ID (Identificação anotada no *Tritydb*); ***padj* (p valor ajustado).

Os alvos selecionados, correspondentes à proteína cinase SET/SET7 (SET/SET7), à proteína cinase PK53 (PK53), à proteína descrita com função na participação da organização do citoesqueleto (Org.Citoesq) e à proteína associada ao promotor de anáfase (AP2), foram validados por RT-qPCR tanto em promastigotas quanto amastigotas (Figura 35). Em promastigotas, todos os transcritos apresentaram aumento de expressão em *Likh1*^{-/-}, SET/SET7 (2,8 x), PK53 (1,7 x), Org. Citoesqueleto (3 x) e AP2 (1,7 x) em comparação com *LWT* (Figura 35), como evidenciado no sequenciamento de cDNA. Nas amastigotas, apenas PK53 (1,5 x) apresentou expressão diferencial.

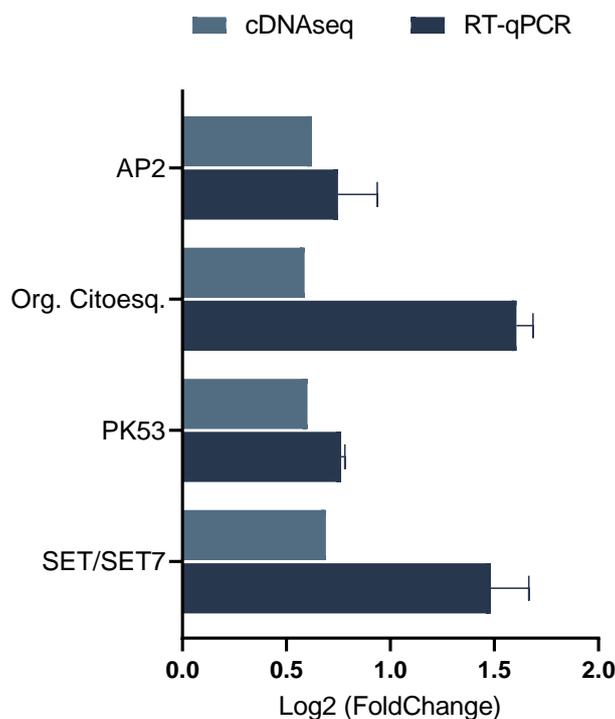
Figura 35: Níveis de transcritos que codificam para proteínas com função na divisão celular e no citoesqueleto selecionados a partir do sequenciamento do cDNA.



Os níveis de transcritos foram avaliados utilizando o mutante *Likh1^{-/-}* em relação ao controle selvagem (WT) tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas. As análises foram demonstradas pela de média \pm erro padrão da média de três réplicas biológicas. SET/SET7: Proteína cinase SET/SET7; PK53: Proteína cinase PK53; Org.Citoesq: Proteína com função organizadora do citoesqueleto; AP2: Proteína associada ao promotor de anáfase. (*a,b; $p < 0,05$ - teste t de Student).

Os níveis de transcritos dados em Log2 (FC) a partir do sequenciamento de cDNA e na RT-qPCR foram comparados e validados, mostrando uma concordância entre as duas metodologias (Figura 36).

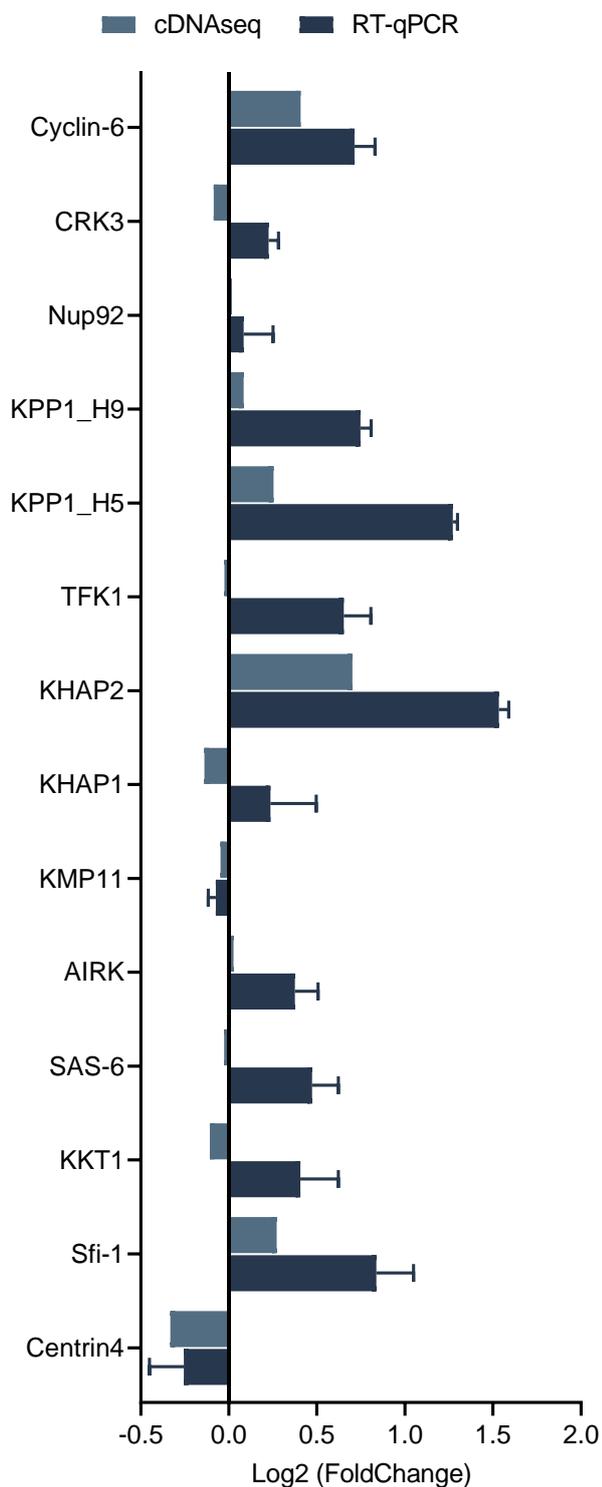
Figura 36: Comparação dos níveis de transcritos obtidos no sequenciamento de cDNA e na RT-qPCR.



Os valores estão expressos pelo $\text{Log}_2 \text{FoldChange}$ das médias obtidas. SET/SET7: Proteína cinase SET/SET7; PK53: Proteína cinase PK53; Org.Citoesq: Proteína com função organizadora do citoesqueleto; AP2: Proteína associada ao promotor de anáfase. Os valores estão apresentados como a média \pm erro padrão de três réplicas biológicas da RT-qPCR e média do cDNA-Seq de 4 réplicas biológicas.

Em paralelo, comparamos o Log_2 (FC) dos transcritos dos alvos selecionados inicialmente pela literatura com os níveis obtidos pelo sequenciamento de cDNA. Embora grandes variações estejam presentes em virtude da limitação de cada uma das técnicas, especialmente o transcriptoma, é possível observar uma concordância para a maior parte dos transcritos (Figura 37). Um bom exemplo é KHAP2, identificada com regulação positiva no cDNA-Seq e na RT-qPCR (Figura 37).

Figura 37: Comparação dos níveis de transcritos obtidos por meio do sequenciamento de cDNA e da RT-qPCR para os alvos previamente selecionados.



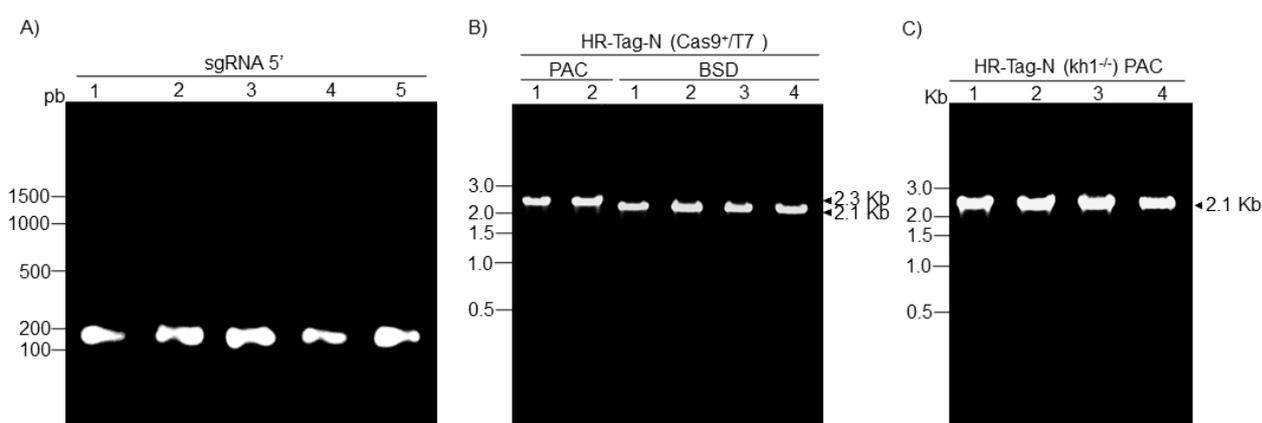
Centrin4: Centrina-4; Sfi-1: Proteína do corpo do fuso; KMP-11: Proteína de membrana de cinetoplastídeo 11; AIRK: cinase relacionada à aurora; SAS-6: Proteína do corpo basal 6; KKT: Proteína do cinetocoro de cinetoplastídeo; KHAP1: Proteína associada à KHARON1 1; KHAP2: Proteína associada à KHARON1 2; KPP1_H5 e KPP1_H9: Proteína fosfatase 1 específica de cinetoplastídeos; TFK1: proteína de fibra de transição do corpo basal; NUP92: nucleoporina; CRK3: cinase relacionada ao cdc2; CYC6: ciclina dependente de cinase 6. Os valores estão apresentados como a média \pm erro padrão de três réplicas biológicas da RT-qPCR e média do cDNA-Seq de 4 réplicas biológicas.

5.6 Localização subcelular de KHARON1, KHAP1 e KHAP2

Considerando que as proteínas KHAP1 e KHAP2 são descritas como proteínas associadas à KHARON1 em *L. mexicana* (KELLY et al., 2020). Nosso objetivo foi analisar as localizações subcelulares em ambos os *backgrounds* genéticos – presença e ausência de KHARON1. Para isso, marcamos as células com o repórter *mNeonGreen* (mNG) nas regiões N-terminais de suas proteínas, o que resultou na emissão de fluorescência quando esses alvos foram traduzidos. Em seguida, avalizamos a localização subcelular de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 nas linhagens selvagens de *LiCas9⁺/T7*, bem como KHAP1 e KHAP2 nos mutantes de *Likh1^{-/-}*, tanto em formas de promastigotas quanto de amastigotas.

Os produtos das PCRs correspondentes aos cassetes de DNAs doadores e sgRNAs para transfecção em *LiCas9⁺/T7* e *Likh1^{-/-}* estão descritos na figura 38. Os RNAs guias 5' contém 144 pb enquanto os DNAs doadores (HR) para BSD e PAC, têm 2100 e 2300 pb, respectivamente (Figura 38). O HR com resistência a PAC foi utilizado para marcar KHARON1 na *LiCas9⁺/T7* e KHAP1 ou KHAP2 nos mutantes de *Likh1^{-/-}*, enquanto o HR com resistência a BSD foi utilizado para marcar KHAP1 ou KHAP2 em *LiCas9⁺/T7*.

Figura 38: Cassetes de sgRNA5' e DNA doadores destinados à marcação com *mNeonGreen* em *Leishmania*.

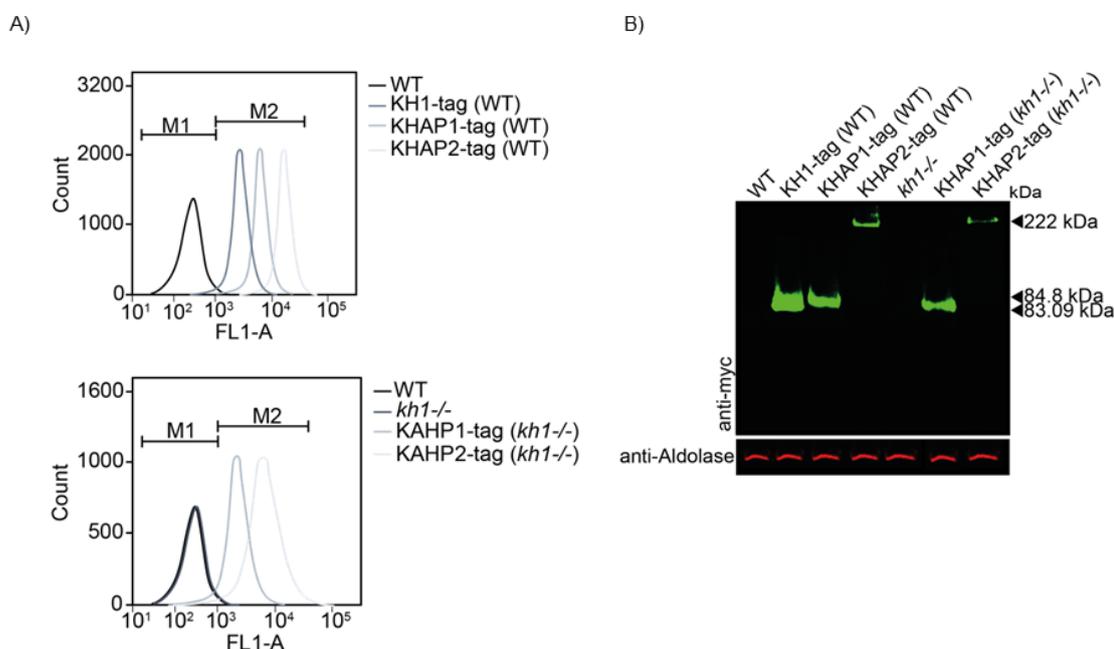


A) Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % destinados a transcrição *in vivo* pela T7 RNAP dos sgRNAs guias 5'. B e C) Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos DNAs doadores ligados a regiões de aproximadamente 30 nt que flanqueiam os genes *Kh1*, *khap1* e *khap2* em suas regiões 5' UTRs.

Após a seleção dos transfectantes, as linhagens fluorescentes “tagged” foram inicialmente confirmadas pela detecção da expressão da fluorescência da proteína fusionada ao alvo *mNeonGreen*, por citometria de fluxo (Figura 39A). Observamos que nas linhagens transfectadas que foram positivas apresentaram níveis de fluorescência superiores ao da linhagem parental, confirmando a obtenção dos mutantes (Figura 39A).

Para confirmar a fusão de *mNeonGreen* (26 kDa) com as proteínas, realizamos ensaios de *immunoblotting* com anticorpo anti-cMyc utilizando extratos totais de proteínas das linhagens transfectadas (KHARON1-tag-WT; KHAP1-tag-WT; KHAP2-tag-WT; KHAP1-tag-*Likh1*^{-/-}; KHAP2-tag-*Likh1*^{-/-}) e das linhagens parentais *LiCas9*^{+T7} e *Likh1*^{-/-}. Como esperado, detectamos a expressão das proteínas apenas nas linhagens transfectadas e nos tamanhos esperados de KHARON1 (83 kDa), KHAP1 (84,9 kDa) e KHAP2 (222 kDa), correspondente à soma da proteína alvo mais a proteína *mNeonGreen* (Figura 39B).

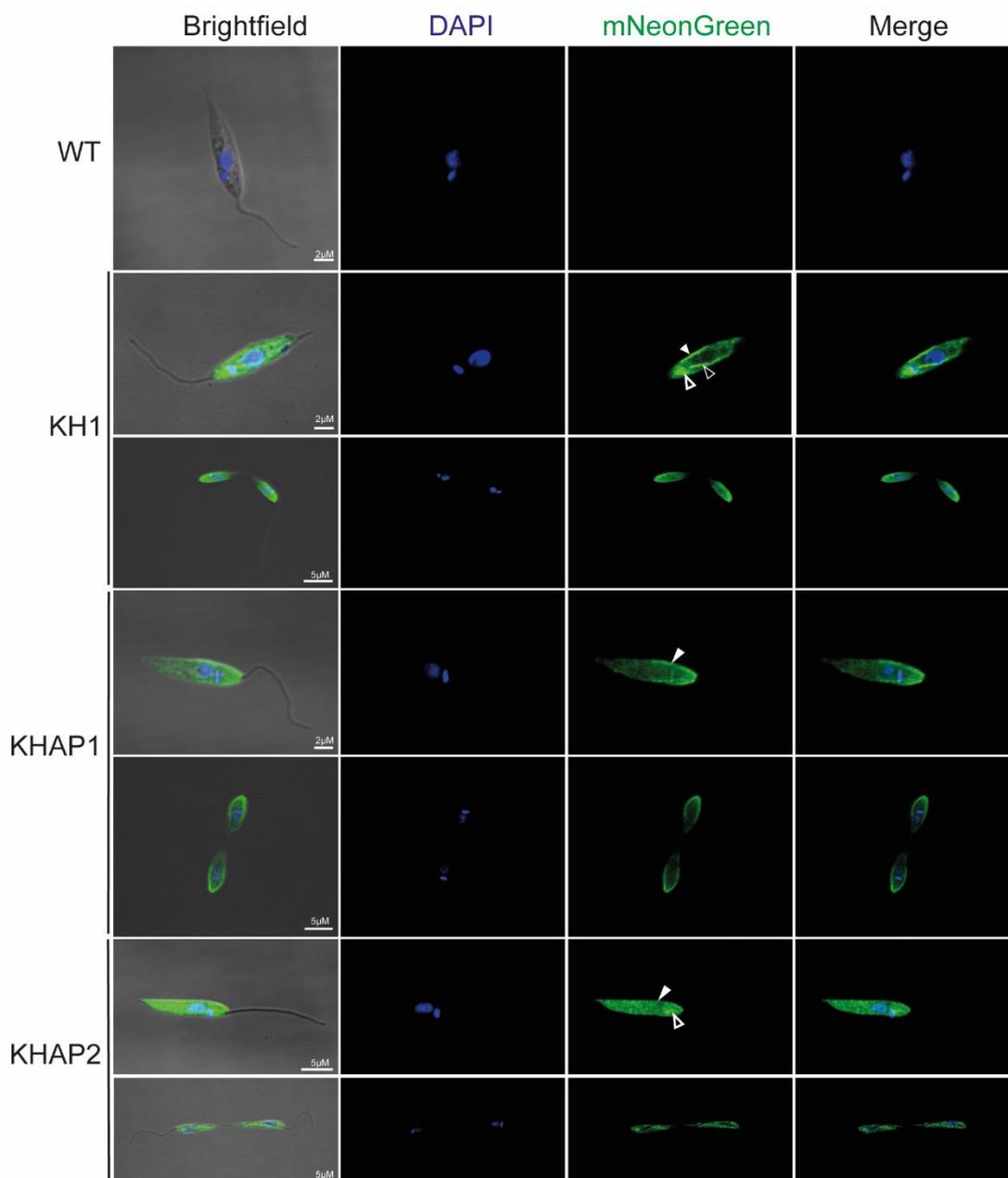
Figura 39: Confirmação das linhagens mutantes fluorescentes com *mNeonGreen*.



A) Citometria de fluxo das linhagens KHARON1-tag-WT; KHAP1-tag-WT; KHAP2-tag-WT; KHAP1-tag-*Likh1*^{-/-} e KHAP2-tag-*Likh1*^{-/-} comparadas com *L. infantum* Cas9^{+T7}(WT) e *LiKh1*^{-/-}. B) *Immunoblotting* dos extratos proteicos totais das linhagens transfectantes KHARON1-tag-WT; KHAP1-tag-WT; KHAP2-tag-WT; KHAP1-tag-*Likh1*^{-/-}, KHAP2-tag-*Likh1*^{-/-}, *L. infantum* Cas9^{+T7}(WT) e *LiKh1*^{-/-} com anti-c-Myc tag (verde). Aldolase foi utilizada como normalizador das amostras.

Após a validação, as células de *Leishmania* foram avaliadas em microscopia confocal nas formas promastigotas (Figura 40 e 41) e amastigotas (Figuras 42 e 43). Nas promastigotas selvagens, é possível observar a presença da proteína KHARON1 em três localizações: (i) na rede de microtúbulos subpeliculares (cabeça de seta preenchida), (ii) na base do flagelo, região que contém a bolsa flagelar (cabeça de seta com contorno espesso) e (iii) região que sugere presença na mitocôndria (cabeça de seta com contorno fino) (Figura 40). A proteína KHAP1, está disposta na região dos microtúbulos subpeliculares que se estendem pela periferia da célula (cabeça de seta) (Figura 40). Já a proteína KHAP2, ao contrário do padrão observado para KHARON1 e KHAP1, parece estar presente de forma mais difusa em diferentes partes do citoplasma, na periferia da célula (cabeça de seta preenchida) e na região da base do flagelo (cabeça de seta vazada) (Figura 40).

Figura 40: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em promastigotas de *L. infantum* WT.

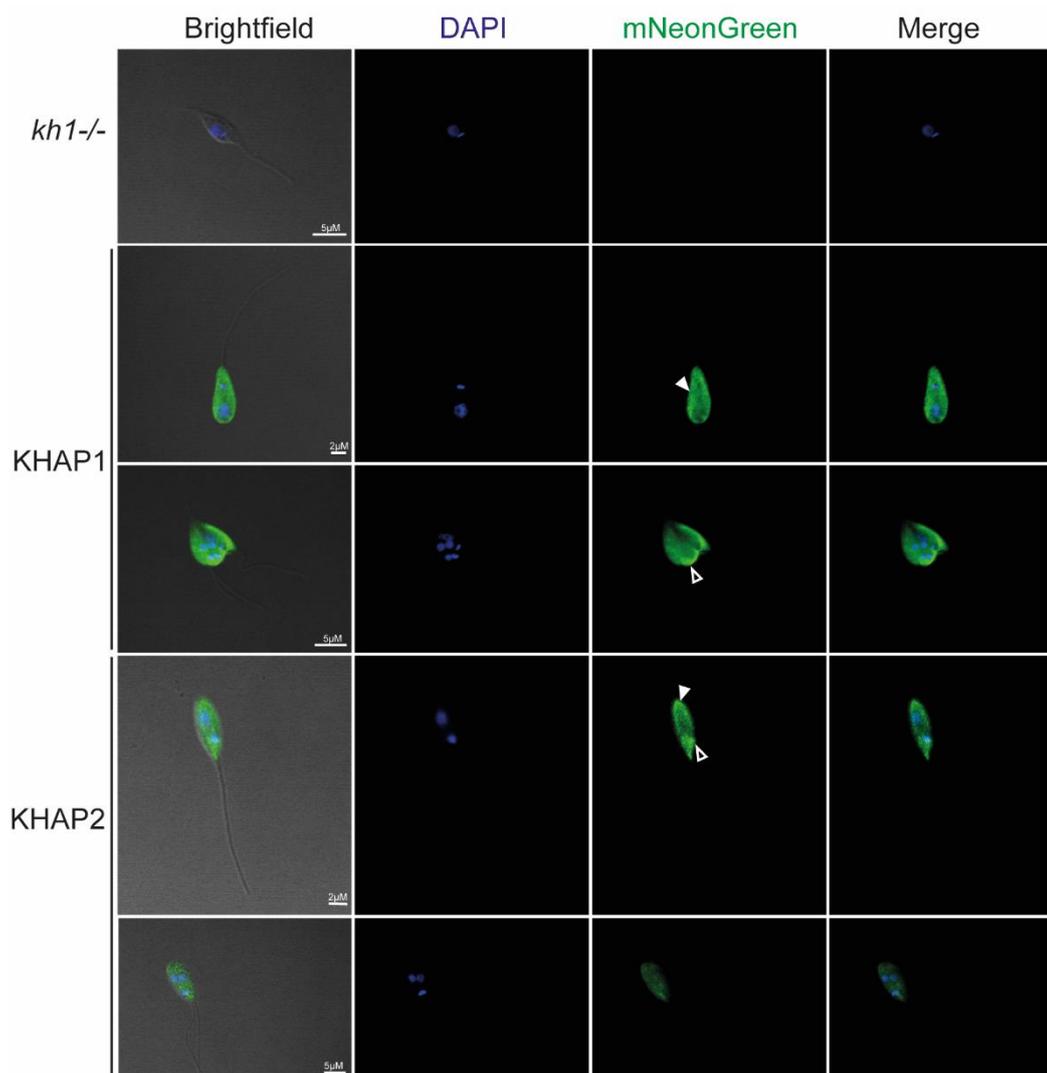


São apresentadas imagens em campo claro com sobreposição dos filtros (*Brightfield*); com filtro de emissão de fluorescência azul do núcleo e cinetoplasto (DAPI), com emissão da fluorescência verde (mNG) e sobreposição das emissões dos filtros (*Merge*). WT: *L. infantum* Cas9^{+/T7}; KH1: proteína KHARON1; KHAP1: proteína associada à KHARON1 1; KHAP2: proteína associada à KHARON1 2. Imagens obtidas no microscópio confocal LSM 510 META ZEISS com objetiva de 63x.

Nas promastigotas mutantes *Likh1*^{-/-} observamos algumas alterações de KHAP1 e KHAP2, sugerindo presença de KHAP1 com maior distribuição por toda periferia da célula (cabeça de seta preenchida). No entanto, durante a divisão, observamos uma maior intensidade de fluorescência correspondente à proteína na região anterior das células, próxima ao flagelo (cabeça de seta com contorno espesso)

(Figura 41). A localização de KHAP2 ainda está distribuída por todo citoplasma, no entanto, em *Likh1^{-/-}*, observamos uma intensidade de fluorescência maior nas regiões anterior (cabeça de seta com contorno espesso) e posterior (cabeça de seta preenchida) das células.

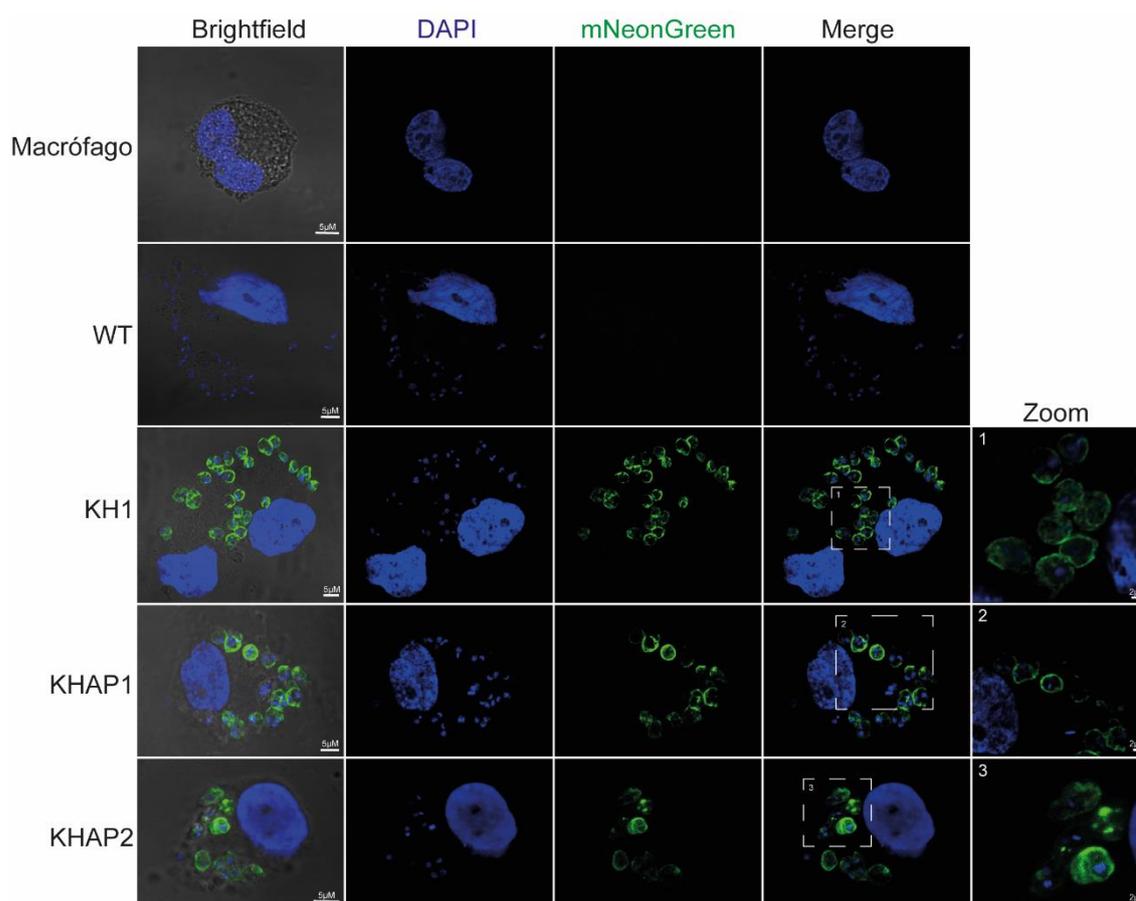
Figura 41: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em promastigotas de *Likh1^{-/-}*.



São apresentadas as imagens em campo claro com sobreposição dos filtros (*Brightfield*); com filtro de emissão de fluorescência azul do núcleo e cinetoplasto (DAPI), com emissão da fluorescência verde (mNG) e sobreposição das emissões dos filtros (*Merge*). *Kh1^{-/-}*: *L. infantum kh1^{-/-}*; KH1: proteína KHARON1; KHAP1: proteína associada à KHARON1 1; KHAP2: proteína associada à KHARON1 2. Imagens obtidas no microscópio confocal LSM 510 META ZEISS com objetiva de 63x.

Nas formas de amastigotas intracelulares de *L. infantum*, observamos claramente a presença das proteínas KHARON1, KHAP1 e KHAP2 por toda periferia do parasito (Figura 42).

Figura 42: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em amastigotas intracelulares de *L. infantum* WT

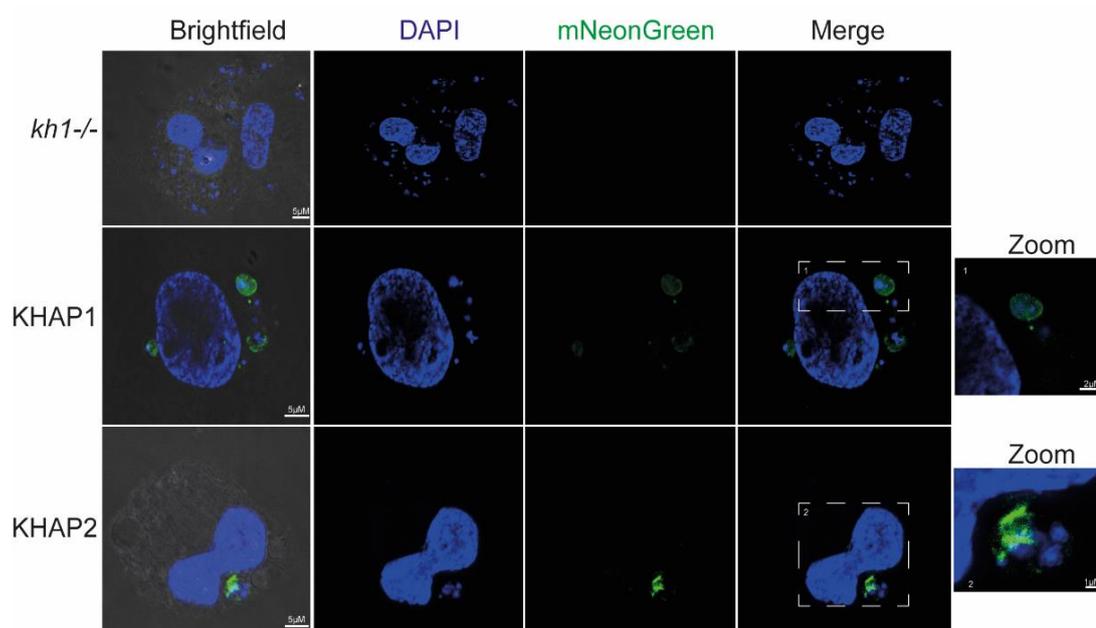


São apresentadas as imagens em campo claro com sobreposição dos filtros (*Brightfield*); com filtro de emissão de fluorescência azul do núcleo e cinetoplasto (DAPI), com emissão da fluorescência verde (mNG) e sobreposição das emissões dos filtros (*Merge*). WT: *L. infantum* Cas9^{+/T7}; KH1: proteína KHARON1; KHAP1: proteína associada à KHARON1 1; KHAP2: proteína associada à KHARON1 2. Imagens obtidas no microscópio confocal LSM 510 META ZEISS com objetiva de 63000x. Os números 1, 2 e 3 mostram o zoom óptico das regiões tracejadas.

Nas amastigotas deficientes de *kharon1* (*Likh1*^{-/-}), curiosamente percebe-se uma redução da intensidade do sinal fluorescência, mesmo mantendo os parâmetros de aquisição utilizados para as amastigotas intracelulares em *LMT* (Figura 43). Isso pode sugerir que em ambas as proteínas não está sendo expressas com a mesma intensidade que nas amastigotas *LMT*, apesar dos níveis dos transcritos correspondentes às proteínas estarem aumentados nessas células, como demonstrado anteriormente (Figura 43). Apesar de ser possível detectar KHAP1 na

periferia das amastigotas, seu padrão parece mais difuso e não exatamente igual ao que foi registrado para *Likh1*^{-/-} (Figura 44). Quanto a KHAP2, diferente do observado para o tipo selvagem, é possível observar apenas uma concentração de fluorescência em uma pequena região das amastigotas, bem diferente do que é observado em *LWT* (Figura 43). Na ausência de KH1, é possível que KHAP2 assuma diferentes funções ou que sua sublocalização celular seja afetada em função de KH1. É importante ressaltar que as amastigotas registradas em KHAP2 já estão multinucleadas, uma característica dos mutantes de KHARON1 em amastigotas intracelulares (Figura 43).

Figura 43: Microscopia confocal de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em amastigotas intracelulares de *Likh1*^{-/-}.



São apresentadas as imagens em campo claro com sobreposição dos filtros (*Brightfield*); com filtro de emissão de fluorescência azul do núcleo e cinetoplasto (DAPI), com emissão da fluorescência verde (mNG) e sobreposição das emissões dos filtros (*Merge*). *Kh1*^{-/-}: *L. infantum kh1*^{-/-}; KH1: proteína KHARON1; KHAP1: proteína associada à KHARON1 1; KHAP2: proteína associada à KHARON1 2. Imagens obtidas no microscópio confocal *LSM 510 META ZEISS* com objetiva de 63x. Os números 1, 2 e 3 mostram o zoom óptico das regiões tracejadas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Imunogenicidade e eficácia da vacina viva atenuada

Até o momento, ainda não existe vacina segura e eficaz para uso em humanos contra as leishmanioses, onde a vacinação continua sendo a melhor estratégia, seja para prevenção (profilaxia) ou em associação com os medicamentos já existentes (terapêutica), podendo prevenir os indivíduos contra doenças primárias ou sequelas secundárias (MALVOLTI et al., 2021).

Nos últimos anos, a vacinação com promastigotas de *Leishmania* geneticamente atenuados está sendo contemplada como uma alternativa promissora à leishmanização, superando os desafios ao uso de parasitos não atenuados (MOREIRA; NOGUEIRA; MONTE-NETO, 2023). A capacidade de manipular o genoma do parasito e eliminar genes essenciais para a virulência, abre caminho para o ressurgimento do potencial das vacinas atenuadas. Essa abordagem representa uma oportunidade significativa para o desenvolvimento de vacinas de nova geração contra as leishmanioses (SILVESTRE; CORDEIRO-DA-SILVA; OUAISSI, 2008).

Mais recentemente, a possibilidade de editar genomas de uma forma simples, rápida e econômica utilizando o sistema CRISPR/Cas9, foi transformadora na história da biologia moderna. A recente adaptação da tecnologia de CRISPR mediada pela nuclease Cas9 a diversos modelos protistas está tendo e terá cada vez mais um papel fundamental no estudo funcional de proteínas, vias metabólicas, bem como o entendimento de sua biologia, o que facilitará a busca de novos alvos quimioterápicos e na obtenção de parasitos vivos atenuados que podem ser utilizados em novas vacinas (LANDER; CHIURILLO; DOCAMPO, 2016; ZHANG et al., 2020).

Em busca de um alvo candidato a vacina viva atenuada, selecionamos parasitos de *L. infantum* e *L. mexicana* deficientes no gene *kharon1* (*Likh1*^{-/-} e *Lmexkh1*^{-/-}, respectivamente). A proteína KHARON1 foi selecionada devido às características de atenuação encontradas em trabalhos utilizando *L. mexicana* (TRAN et al., 2015), e mais recentemente pelo nosso grupo de pesquisa utilizando *L. infantum* (*Likh1*^{-/-}) (SANTI et al., 2018). Essas características fenotípicas são resultado de uma falha na citocinese das amastigotas intracelulares durante o processo de divisão celular, ocorrendo multiplicação de suas organelas, aumento celular, duplicação do seu material genético e eventual parada do ciclo no estágio G2/M com consequência de morte celular programada (SANTI et al., 2018). Acreditamos que a atenuação

geneticamente direcionada e definida reduz o risco de reversão à virulência, uma preocupação geralmente levantada para organismos atenuados que são criados por mutações genômicas aleatórias. Os mutantes de *Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}* atenuam especificamente o estágio de amastigota intracelular, não tendo efeito no crescimento de formas promastigotas (SANTI et al., 2018; TRAN et al., 2015), o que é vantajoso, pois é possível cultivar grandes quantidades de parasitos para testes vacinais, facilitando a utilização como vacina. A ausência de efeito sobre formas promastigotas se confirma na curva de crescimento *in vitro* dos mutantes obtidos neste trabalho (Figura 17).

Inicialmente, propomos avaliar a imunogenicidade das possíveis candidatas a vacinas vivas atenuadas (*Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}*) por meio de testes de proteção homóloga e proteção heteróloga em modelos de camundongos BALB/c utilizados como hospedeiro. Essas avaliações foram realizadas em intervalos de 30 dias (4 semanas) entre cada ensaio. Além disso, examinamos se uma possível dose de reforço é capaz de potencializar uma resposta imunológica mais eficaz.

Uma resposta imune protetora contra leishmanioses é caracterizada pela ativação de fagócitos, como macrófagos e células dendríticas (DCs), que secretam IL-12, induzindo a diferenciação de Th0 em Th1, com posterior secreção de INF- γ , sendo crucial para a resistência do hospedeiro contra infecção (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2018). Em contrapartida, a resposta do tipo Th2, caracterizada pela liberação de IL-10 e IL-4, favorece a sobrevivência do parasito e a suscetibilidade a doença (BUXBAUM; SCOTT, 2005; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Portanto, um dos pilares a serem alcançados para o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose é elicitar uma resposta predominantemente protetora do tipo Th1 (GURUNATHAN et al., 1998).

Embora os anticorpos normalmente não desempenhem um papel protetor na leishmaniose (BUXBAUM, 2008), uma predominância de Ig2a em relação a IgG1 tem sido associada à imunidade protetora em camundongos Balb/c (ROSTAMIAN et al., 2017). No presente estudo, observamos aumentos de IgG total e de IgG1 em alguns grupos após o período avaliado, com manutenção de IgG2a, não sendo observado aumento dessa subclasse período proposto, o que provavelmente não seja suficiente para observar mudança de classe de IgG1 para IgG2a, exigindo intervalos maiores que possam auxiliar a elucidar esse parâmetro. Títulos mais elevados de mudança de

subclasse de IgG1 para IgG2a foram mais bem elucidados em proteção de longo prazo, com períodos de 8 a 12 semanas após a imunização, correlacionando melhor grau de proteção (SOLANA et al., 2017). Anticorpos obtidos no soro de camundongos na fase inicial da doença tiveram baixos níveis contra proteína do parasito, sendo possível observar um aumento de subclasses específicas (IgG2a) na fase crônica (SOLANA et al., 2017). Embora se saiba que IgG1 e IgG2a são indicativos de uma resposta Th2 e Th1, respectivamente, pesquisas mostraram que citocinas associadas ao perfil Th1 também podem induzir IgG3 e outros isotipos de IgG2, enquanto citocinas ligadas ao perfil Th2 podem promover IgE. Assim, a análise isolada de IgG1 e IgG2a pode não refletir completamente a indução das respostas Th1 e Th2 (MESTAS; HUGHES, 2004; UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004).

Para entender melhor a natureza da resposta imune elicitada por *Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}*, comparamos os níveis da citocina IFN- γ secretada pelos esplenócitos dos camundongos após a imunização e após o desafio utilizando estimulação *in vitro* com antígeno *ASLi*. A produção de IFN- γ dependentes de parasitos no baço é essencial para a geração de granulomas hepáticos (SOLANA et al., 2020; SQUIRES et al., 1989) e tem papel fundamental na ativação dos macrófagos para combater os patógenos e proteger a célula hospedeira contra infecções, prevenindo a progressão da doença (BOEHM et al., 1997). Na proteção homóloga, houve aumento de IFN- γ por T CD4⁺ após o desafio e de T CD8⁺ após a vacina e após o desafio. Em contrapartida, na resposta heteróloga, teve aumento de IFN- γ por ambas as células T CD4⁺ e T CD8⁺ após a imunização e após o desafio. No entanto, é importante ressaltar que apesar da produção de IFN- γ não terem sido maiores em alguns grupos, eles também não foram inferiores estatisticamente quando comparados aos controles. Ambas as células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram induzidas para produzir essa citocina, e que após o desafio, os animais vacinados montaram uma resposta contra o parasito de forma rápida, o que possivelmente pode ter sido mediada por IFN- γ . Semelhante aos resultados encontrados por Solana e colaboradores (2020) utilizando *L. infantum* deficiente do gene *hsp70* do tipo II, que foi capaz de gerar uma resposta protetora na fase inicial da doença, e tendo essa citocina como principal mediadora (SOLANA et al., 2020).

Em contraste, a expressão de IL-10, uma importante citocina reguladora tem papel crucial na progressão da doença, inibindo o desenvolvimento da resposta Th1

e bloqueando a ativação dos macrófagos que produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (KARMAKAR et al., 2021; UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004). Ambas as vacinas foram capazes de regular a produção de IL-10 mediadas pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ mesmo após o desafio com apenas uma dose da vacina. No entanto, na proteção heteróloga, os valores com uma dose foram semelhantes aos controles. Parâmetro também foi relato em *L. mexicana* atenuada para o gene centrina (KARMAKAR et al., 2022). Petritus e colaboradores (2012), demonstraram que o bloqueio da interação de IL-10 com seu receptor, levou a um aumento do recrutamento de monócitos em lesões de orelha de camundongos induzidas por *L. mexicana*, e conseqüentemente, houve maior produção de óxido nítrico e de IFN- γ (PETRITUS et al., 2012). Portanto, para uma vacina eficaz contra a leishmaniose, é primordial ter uma regulação negativa de citocinas anti-inflamatórias como IL-10. Entretanto, a IL-10 também protege a indução de citocinas inflamatórias em excesso, ou seja, ela é capaz de estimular uma resposta predominante do tipo Th2 quando em maiores quantidades que IFN- γ , mas em menores quantidades se faz necessária para proteger o hospedeiro dos danos teciduais (MEGE et al., 2006).

A proporção de IFN- γ para IL-10 serve como um correlato adicional de proteção imunológica (SELVAPANDIYAN et al., 2009). Em nossos dados, observamos que ambas as células T CD4⁺ ou T CD8⁺ tiveram aumento desse parâmetro tendendo para IFN- γ , o que leva o balanço para a resposta pró-inflamatória, tanto no pós-vacina quanto no pós-desafio, e reforçando a indução da proteção contra a LV. Resultados semelhantes aos encontrados em *L. infantum* viva atenuada deficiente em sirtuína 2 (*LiSIR2^{+/-}*), demonstrando aumento da proporção de IFN- γ para IL-10 em sobrenadantes de esplenócitos após o desafio com *L. infantum* virulenta (SILVESTRE et al., 2007). A razão entre IFN- γ /IL-10 representa um equilíbrio fisiológico entre as respostas Th1 e Th2, que determinam o desfecho da doença e podem fazer diferença entre resistência e suscetibilidade à infecção (VOLPEDO et al., 2022). Também destacamos que na proteção heteróloga, apesar dos níveis de IL-10 estarem semelhantes ao controle com uma dose, ao analisar a razão, observa-se a tendência da proporção para IFN- γ , indicando que a proteção contra a LV ao utilizar uma vacina atenuada de *L. mexicana* é viável, pois ela é capaz de gerar a resposta imune tendendo ao tipo Th1. Tomados em conjunto, esses dados sugerem de que *Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}* podem estar facilitando um equilíbrio desejável na resposta imune,

permitindo uma persistência dos parasitos nos órgãos, devido a uma provável resposta mista pró e anti-inflamatória, o que pode sugerir uma proteção facilitada sem causar danos ao hospedeiro.

A LV é caracterizada pela diminuição acentuada de respostas das células T, comprometendo a proliferação dessas células e ausência na produção de IFN- γ pelos linfócitos (RODRIGUES et al., 2014). Notavelmente, a proliferação das células T em resposta a antígenos de *Leishmania* é um importante biomarcador da imunogenicidade de uma vacina em camundongos (GIUNCHETTI et al., 2008). Consistente com esses relatos, nossos dados mostraram que a vacinação com parasitos *Likh1^{-/-}* e *Lmexkh1^{-/-}* e posteriormente desafiados, foram capazes de induzir uma maior proliferação de linfócitos T (tanto CD4⁺ quanto CD8⁺) após estimulação com antígeno de *Leishmania* principalmente com apenas uma dose de vacina.

Uma das características fundamentais ao se utilizar parasitos vivos atenuados como vacina, é a capacidade de gerar memória de longo prazo. Uma vacina eficaz, portanto, deve ser capaz de induzir uma resposta imune robusta, seguida da geração de populações de células T de memória, algumas das quais requerem persistência antigênica para serem mantidas (GLENNIE; SCOTT, 2016; ZAPH et al., 2004). Um parasito vivo atenuado será capaz de persistir por mais tempo do que outros tipos de vacinas, promovendo uma exposição sustentada de antígenos de *Leishmania*, necessários para manter o *pool* de células efectoras e de memória, garantindo proteção duradoura (PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021), principalmente células de memória central, que se dirigem aos gânglios linfáticos e demonstraram mediar a imunidade de longo prazo (GLENNIE; SCOTT, 2016; ZAPH et al., 2004).

A eficácia da vacina pode ser mensurada através da quantificação da carga parasitária nos principais órgãos viscerais acometidos pela LV (fígado e baço). Nos animais utilizados, foi possível observar que houve uma redução acentuada da carga no fígado e se mantendo estável no baço na resposta homóloga tanto no pós-vacina quanto no pós-desafio. Já na proteção heteróloga teve uma resolução inicial no fígado nos animais apenas vacinados, com estabilidade da carga no baço. No baços os valores foram mantidos semelhantes aos controles. Em *L. donovani* deficiente de centrina (*LdCen1^{-/-}*), foi observado a presença dos parasitos durante pelo menos 5 semanas, onde a carga foi reduzida significativamente no baço com ausência no fígado com 10 semanas após o desafio (SELVAPANDIYAN et al., 2009). Portanto,

uma das limitações encontradas em nosso trabalho foi determinar a carga após intervalos maiores. Apesar disso, é possível observar uma tendência dessa redução com 4 semanas.

Em nosso trabalho, a presença da carga nos órgãos pode estar relacionada com a produção de células T de memória provenientes do baço após a vacina, sendo cruciais para a proteção contra *Leishmania* (GLENNIE; SCOTT, 2016; PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021; ZAPH et al., 2004). Resultados que se mostraram condizentes com trabalho envolvendo infecção por *L. major*, no qual a memória central mediadas por células T CD4⁺ desempenha um papel na manutenção da proteção (ZAPH et al., 2004). Além disso, as células T CD8⁺ também podem contribuir para a redução da carga parasitária durante a infecção por *L. infantum* por meio de atividades citolíticas no combate dos macrófagos ao parasito (STÄGER; RAFATI, 2012). Além disso, o controle da carga após o desafio pode estar associado a uma resposta rápida de IFN- γ mediada por células T CD4⁺ e T CD8⁺ efetoras no baço, como descritos a camundongos vacinados com parasitos atenuados de *HSP70-II* em *L. major* (SOLANA et al., 2017) sendo protegidos contra o desafio virulento de espécies causadora da LV (ROMANO et al., 2015). É importante observar que a carga no fígado proveniente da segunda dose em alguns grupos foi tão baixa quanto quando administrados com uma única dose. Uma hipótese é que, ao receber a segunda dose, os animais já tiveram a produção de células T de memória central provenientes da primeira dose e podem estar agindo de forma mais rápida na eliminação dos parasitos relacionados a segunda dose e do desafio. Outra hipótese é de que esses animais ficaram mais tempo expostos aos parasitos atenuados, com intervalo de 8 semanas correspondentes a administração de duas doses, e de acordo com as características fenotípicas encontradas em nossas cepas atenuadas, tanto *Likh1*^{-/-} quanto *Lmexkh1*^{-/-} começaram a serem eliminados por completo a partir de 4 semanas. Portanto, os parasitos persistentes no protocolo de dose dupla no pós-vacina podem ser correspondentes apenas à segunda dose, enquanto aqueles relacionados à primeira dose já estariam completamente eliminados em oito semanas.

Possíveis explicações para a proteção provenientes da vacinação utilizando os parasitos atenuados *Likh1*^{-/-} e *Lmexkh1*^{-/-} incluem a presença da carga residual, o que permitiria a presença contínua de células efetoras específicas de *Leishmania* e manteria a imunidade antileishmania. Além disso, a vacinação pode induzir a

produção de células T de memória central, quem podem evoluir para memória efetora após uma infecção com *Leishmania* selvagem, garantindo proteção. Estes mecanismos combinados podem contribuir para eficácia da vacinação com os parasitos atenuados.

Neste contexto, a utilização de parasitos vivos atenuados como candidatos a vacina é um campo de investigação promissor. As vacinas vivas podem induzir respostas imunes adaptativas relevantes para a proteção, imitando a infecção natural, sem os efeitos adversos da leishmanização com parasitos virulentos (SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014). Além disso, a persistência de parasitos vivos nos principais órgãos por períodos maiores é obrigatoriamente necessária para a manutenção da proteção a longo prazo (SOLANA et al., 2017).

As características de proteção encontradas aqui sugerem uma indução a resposta do tipo Th1. No entanto, para confirmar essa hipótese, são necessários estudos mais aprofundados com as outras citocinas envolvidas na resposta imune, como TNF α , IL-12 e IL-4, além de determinar os mecanismos de combate aos parasitos, como a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, a fim de entender melhor a dinâmica da resposta imune mediadas pela vacinação de *Likh1*^{-/-} e *Lmexkh1*^{-/-}. Além disso, vale ressaltar que apesar de termos utilizados uma dose de reforço, a administração de uma única dose de *Leishmania* viva atenuada é suficiente para gerar a resposta imune e combater contra uma posterior infecção de *L. infantum* virulenta. Também é possível obter uma vacina atenuada utilizando espécies dermatrópicas para proteger indivíduos de espécies viscerais.

Em resumo, demonstramos que parasitos deficientes de *kharon1* em *L. infantum* e *L. mexicana* induziram resposta imune protetora em modelos de camundongos BALB/c contra infecções por *L. infantum* do tipo selvagem, tanto em proteção homóloga quanto em proteção heteróloga. As vacinas foram capazes de regular negativamente IL-10 e de aumentar IFN- γ , resultando em razões IFN- γ /IL-10 mais altas em comparação com os grupos não imunizados. A imunização também resultou na atividade proliferativa de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e na geração de células de memória efetora e central, indicativas de proteção duradoura. Como consequência, houve redução rápida da carga no fígado e controle da carga no baço.

6.2 Alvos associados a divisão celular e ao citoesqueleto no contexto de KHARON1

Em promastigotas de *Leishmania*, a proteína KHARON1 tem como principal função carrear o transportador de glicose GT1 da bolsa flagelar para a membrana do flagelo (TRAN et al., 2013). Nas amastigotas, a proteína KHARON1 parece estar envolvida em outro processo, principalmente pelo fato da proteína GT1 não ser expressa nessa forma evolutiva (MARIC; EPTING; ENGMAN, 2010). Assim, a interrupção da divisão celular de amastigotas deficientes em *kh1* não pode ser atribuída à falha em direcionar GT1 ao flagelo (TRAN et al., 2013).

O citoesqueleto de *Leishmania* consiste em múltiplas estruturas baseadas em microtúbulos, incluindo o axonema flagelar, rede de microtúbulos subpeliculares e o fuso mitótico. Sendo que a divisão celular requer que uma rede de proteínas interaja formando complexos para ocorra de forma satisfatória, na qual acredita-se que a proteína KHARON1 possa estar envolvida em alguma etapa desse processo (KELLY et al., 2020; KELLY; SANCHEZ; LANDFEAR, 2020). Portanto, entender como e quais proteínas podem estar interagindo com KH1 durante este processo ajudará a compreender melhor os mecanismos moleculares que orquestram a divisão celular em *Leishmania*, além de servirem para a identificação de potenciais alvos farmacológicos. Trabalhos envolvendo mutantes nulos do gene *kharon1* em *L. mexicana* (TRAN et al., 2013) e com RNA de interferência (RNAi) em *T. brucei* (SANCHEZ et al., 2016), demonstraram ser uma proteína com múltiplas funções e com localizações celulares distintas, importante para a viabilidade dos parasitos intracelulares e para a citocinese, além das funções associadas ao transporte de proteínas para a membrana flagelar nas formas promastigotas (SANCHEZ et al., 2016; TRAN et al., 2015). Um postulado da investigação atual, foi que KH1 está associada a várias proteínas parceiras, algumas das quais podem ser exclusivas de locais específicos (KELLY et al., 2020). Assim, baseado nesta máxima, a identificação da localização subcelular de KH1 em *L. infantum* além de entender como está a modulação de outros alvos que codificam para diferentes proteínas, poderá também auxiliar no melhor entendimento de como ela se comporta nas diferentes formas do ciclo de vida do parasito.

Inicialmente, observamos níveis diferentes de transcritos por RT-qPCR que codificam para as proteínas Sfi1 (proteína do corpo do fuso), KHAP2 (proteína

associada a KHARON1 2), TFK1 (proteína de fibra de transição do corpo basal), KPP1 (proteína fosfatase específica de cinetoplastídeos 1) e CYC6 (ciclina dependente de cinase 6). Estes alvos tiveram regulações positivas nas formas promastigotas quando *kharon1* está deletado em *L. infantum* (*Likh1^{-/-}*). Nas amastigotas intracelulares, houve aumento dos níveis de transcritos de KHAP1 (proteína associada à KHARON1 1) e KHAP2 (Figura 32).

Uma vez que menos de 50 % dos alvos previamente selecionados pela literatura apresentaram expressão diferencial em *Likh1^{-/-}*, propusemos avaliar o transcriptoma deste mutante por meio do sequenciamento de cDNA (cDNA-Seq). No total, 9 transcritos foram regulados de forma negativa, enquanto 72 transcritos foram regulados de forma positiva. Dos 81 transcritos diferencialmente expressos, 32 estão anotados tanto em *Leishmania* sp. quanto em seus ortólogos, como proteínas hipotéticas na plataforma TriTrypDB. Estes alvos precisam ser mais bem estudados para melhor compreensão. Quatro deles parecem ter funções associadas com a divisão celular e com o citoesqueleto: SET/SET7 (proteína cinase SET/SET7), PK53 (proteína cinase PK53), proteína com função da organização do citoesqueleto e AP2 (proteína associada ao promotor de anáfase). Destacamos a proteína PK53, que teve diferença no nível de transcrito também em amastigota, ao validarmos por RT-qPCR. Ainda não se sabe a função exata dessas proteínas no contexto de KHARON1, mas suas funções distintas já foram descritas em outros tripanossomatídeos ou em organismos superiores.

A proteína Sfi1, descrita inicialmente como uma proteína parceira de centrina, tem como função redirecionar os centríolos alterando a estrutura do centrosoma (SALISBURY, 2004), sendo necessário para a montagem do ciclo celular. Sua deleção em leveduras resultou na parada do ciclo celular na fase G2/M (KILMARTIN, 2003; MARTINEZ-SANZ; ASSAIRI, 2016).

Em *Trypanosoma brucei*, TFK1 é proteína da fibra de transição que conecta a base do flagelo à membrana da bolsa flagelar, seu silenciamento mediado por RNAi nas formas tripomastigotas induziu o deslocamento incorreto dos corpos basais, levando à morte celular do parasito, sendo uma proteína essencial para o correto posicionamento do corpo basal e como regulador chave da citocinese nessa etapa do ciclo de vida (RAMANANTSALAMA et al., 2022).

O posicionamento, fixação e alongamento adequados do flagelo depende fielmente da duplicação e segregação das estruturas do citoesqueleto associadas ao flagelo, onde a proteína fosfatase KPP1 tem papel essencial em *T. brucei* através da desfosforilação da cinase *TbPLK*, no qual o seu silenciamento gerou uma falha na citocinese, interrupção da segregação do corpo basal, resultando em células multinucleadas (AN; HU; LI, 2021; ZHOU; DONG; LI, 2018).

A *CYC6* é uma ciclina dependente da atividade de CDK (proteínas cinase dependentes de ciclina) que durante a divisão estão envolvidas nas etapas da formação do fuso mitótico (PARSONS et al., 2005). O silenciamento de *CYC6* nas formas procíclicas de *T. brucei*, leva à parada do crescimento com acúmulo de células na fase G2/M; situação na qual é possível detectar células com múltiplos cinetoplastos, devido à falha na formação dos microtúbulos (para formação do fuso mitótico) em consequência da atividade comprometida de CDK (HAYASHI; AKIYOSHI, 2018).

Dentre os membros da família de proteínas cinases relacionadas ao núcleo (DBF-2), a proteína cinase *PK53* faz parte de uma rede de componentes essenciais nas vias de sinalização que controlam diversos processos celulares em vários organismos, estes incluem, morfogênese, saída da mitose, citocinese, proliferação, diferenciação e apoptose (HERGOVICH et al., 2006). O silenciamento de *PK53* em *T. brucei* mostrou rápido acúmulo de células com dois núcleos e dois cinetoplastos, indicando que a citocinese foi especificamente inibida com formação de células multinucleadas, levando a morte celular do parasito (MA et al., 2010).

A proteína *AP2* faz parte de uma rede de proteínas formando o complexo promotor de anáfase denominado APC. O silenciamento de *AP2* levou a um acúmulo de células na fase G2/M em *T. brucei*, resultando em um bloqueio na transição da metáfase para anáfase (BESSAT et al., 2013).

Ainda não se sabe se essas proteínas atuam direta ou indiretamente em associação com *KHARON1*. Uma vez que *KHARON1* é considerada uma proteína multifuncional, é possível que haja algum tipo de ação compensatória desses alvos em sua ausência. Isto pode ser parte de um mecanismo para manter a célula viável. Esta hipótese pode apontar para a identificação de novos alvos a serem avaliados quanto a sua essencialidade na seleção de cepas vivas atenuadas. Em amastigota, a ausência de *KHARON1* está associada com a falha na citocinese, ou etapas finais da

divisão celular em *Leishmania*, uma vez que, mesmo em *Likh1^{-/-}* é possível observar a divisão dos cinetoplastos e núcleos – processos iniciais da divisão. Esta hipótese pode ser sustentada pelo fato de KHARON1 apresentar um domínio de ligação à actina (SANTI et al., 2018) e as evidências de localização subcelular sempre apontarem para regiões intimamente associadas ao citoesqueleto. Portanto, após a identificação desses alvos, nossas próximas etapas serão em demonstrar se elas estão ou não fazendo parte dos mesmos complexos proteicos e buscar em entender como é a função dessas proteínas nas etapas de divisão células em *Leishmania*.

As proteínas KHAP1 e KHAP2 já são descritas associadas à KHARON1 em diferentes localizações subcelulares (KELLY et al., 2020). KHAP1 está localizada na rede de microtúbulos subpeliculares se estendendo pela periferia da célula, e KHAP2 além da localização dos microtúbulos, apresenta também localização na base do flagelo, perto da região do cinetoplasto. Essas localizações podem sugerir funções distintas atribuídas à KHARON1. Quando avaliados os níveis de mRNA de KHAP1 e KHAP2 nas formas promastigotas, apenas KHAP2 apresentou diferença na expressão em *Likh1^{-/-}*. Uma vez que é possível destacar certa concentração da marcação de KHAP2 na base do flagelo, coincidente com a localização de KHARON1, a proteína KHAP2 em *Likh1^{-/-}* de alguma forma pode estar associada com a manutenção da viabilidade dos parasitos, já que também está localizada na base no flagelo. No entanto, ela não apresenta função de auxiliar no tráfego de GT1 para membrana do flagelo (KELLY et al., 2020). Em *T. brucei*, KHAP2 é ortóloga da proteína associada a microtúbulos MARP-1 (AFFOLTER et al., 1994; HEMPHILL; AFFOLTER; SEEBECK, 1992).

Em amastigotas selvagem, os transcritos tanto de KHAP1, quanto de KHAP2 tiveram níveis alterados, além disso, as proteínas KHARON1, KHAP1 e KHAP2 apresentam sublocalizações celulares semelhantes, fato que suporta a hipótese de estarem atuando como parceiras nesse estágio evolutivo. No entanto, a deleção de *kharon1* resulta na formação de amastigotas multinucleadas com defeitos na citocinese (SANTI et al., 2018; TRAN et al., 2013). Apesar de apresentar menor intensidade, KHAP1 em *Likh1^{-/-}* mantém a localização na região periférica das amastigotas, ao passo que KHAP2 muda completamente seu perfil, concentrando-se numa região específica da célula. Este é o primeiro registro de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em formas amastigotas intracelulares tanto em *L. infantum* WT como em

Likh1^{-/-}. Uma possibilidade é que essas proteínas estejam tentando compensar KHARON1 devido ao aumento de seus transcritos, mas não sejam suficientes para progredir com a divisão e compensar a citocinese. Outra hipótese é que essas proteínas possam estar atuando em conjunto e que a deleção de qualquer uma delas possa levar a um defeito na citocinese, visto que, quando os genes de *khap1* e *khap2* são deletados individualmente, geram fenótipo semelhantes ao que ocorre em *kh1*^{-/-} (KELLY et al., 2020). Este fenótipo inclui: falha na citocinese e formação de células multinucleadas, não sendo capazes de sustentar a infecção como amastigotas intracelulares (KELLY et al., 2020).

Em resumo, observamos que KHARON1 está envolvida diretamente na divisão celular em *Leishmania*. Entender como e quais proteínas podem estar envolvidas durante esse processo poderá auxiliar na melhor compreensão de como ocorre a divisão nesses organismos, um campo ainda pouco explorado. Mais do que isso, ainda não é compreendido como é orquestrada a segregação cromossômica em parasitos do gênero *Leishmania*, os quais apresentam alta plasticidade genômica, onde numa mesma população de células pode ocorrer mosaicismos aneuploide (FRANSSEN et al., 2020; LAFFITTE et al., 2016; PATINO et al., 2020). A habilidade desses parasitos em manter este mosaico com variações no número de cópias cromossômicas é resultado de uma adaptação de milhões de anos e está associada ao sucesso evolutivo dos tripanossomatídeos.

Os dados apresentados nesse trabalho ampliam o espectro de conhecimentos acerca de vacinas vivas atenuadas, contribuindo para melhor compreensão das estratégias na busca por alternativas vacinais contra as leishmanioses. Além disso, os alvos explorados abrem caminhos para a seleção de novos mutantes vivos atenuados, bem como podem contribuir para a elucidação de alvos terapêuticos contra as leishmanioses, auxiliando a busca por novos fármacos. Com relação à biologia básica, este trabalho iniciou uma nova linha de pesquisa visando entender mecanismos associados à divisão celular em *Leishmania*. Dessa forma, o trabalho buscou não apenas responder perguntas fundamentais como se enquadra na interface da ciência translacional em busca de soluções para o controle das leishmanioses, uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas no mundo.

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, é possível tirar as seguintes conclusões acerca das diferentes abordagens metodológicas empregadas: (i) confirmamos a não essencialidade de *kharon1* para formas promastigotas em *L. infantum* e *L. mexicana*; (ii) as características fenotípicas encontradas na resposta imune e na eficácia vacinal, apontam para o esquema de dose única como mais viável, tanto na proteção homóloga quanto na heteróloga; (iii) a vacina viva atenuada obtida pela deleção de *kharon1* é promissora, pois sugere uma resposta tendendo para o tipo Th1, com a indução na produção de células de memória a longo prazo e atividade proliferativa; resultando na redução e manutenção da carga nos principais órgãos acometidos pela leishmaniose visceral; (iv) *Likh1^{-/-}* pode ser um bom modelo para se estudar fases tardias da divisão celular em *Leishmania*, com alteração nos níveis de outros transcritos; (v) diante dos transcritos diferencialmente expressos, novos alvos podem ser considerados para o desenvolvimento de mutantes vivos atenuados; (vi) a avaliação das localizações subcelulares em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de KHAP2 pode ser sugestivas de funções distintas em *Leishmania*; (vii) este estudo mostra pela primeira vez a localização de KHARON1, KHAP1 e KHAP2 em formas amastigotas intracelulares, bem como a possível evidência de KHARON1 na mitocôndria de formas promastigotas.

8 PERSPECTIVAS

- Obter mutantes deficientes de *kharon1* sem marcadores de resistência a antibióticos no intuito de cumprir com exigências regulatórias para o desenvolvimento de uma vacina para humanos;

- Reavaliar a carga parasitária de forma que seja possível diferenciar quais parasitos são oriundos da vacina (cepa atenuada) daqueles cujo sinal é proveniente do desafio;

- Ampliar o painel da resposta imune com marcadores TNF- α ; IL-4; etc.;

- Avaliar a eficácia da vacina em modelo murino utilizando cepas luminescentes para investigação da proteção contra desafio secundário (desenvolvimento de lesão cutânea);

- Avaliar a eficácia vacinal em modelos de hamster com intervalos maiores de tempo. Trabalho que já vem sendo desenvolvido pelo aluno Gabriel José Moreira na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP);

- Caracterizar e validar os alvos encontrados e descritos como hipotéticos em *Leishmania* sp.;

- Investir na análise funcional dos alvos que foram diferencialmente expressos no intuito de propor um modelo que evidencie o papel de KHARON1 na divisão celular de *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

ABDIAN, N. et al. Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 627–636, mar. 2011.

AFFOLTER, M. et al. The repetitive microtubule-associated proteins MARP-1 and MARP-2 of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Structural Biology**, v. 112, n. 3, p. 241–251, 1994.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112 Pt 18, p. 2993–3002, set. 1999.

ALMEIDA, A. P. M. M. et al. New Vaccine Formulations Containing a Modified Version of the Amastigote 2 Antigen and the Non-Virulent *Trypanosoma cruzi* CL-14 Strain Are Highly Antigenic and Protective against *Leishmania infantum* Challenge. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 465, 15 mar. 2018.

ALPIZAR-SOSA, E. A. et al. Genome deletions to overcome the directed loss of gene function in *Leishmania*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 988688, 2022.

ALVAR, J. et al. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31 Suppl 2, p. B244-249, 18 abr. 2013.

ALVES, F. et al. Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00048-18, out. 2018.

ALVES-SILVA, M. V. et al. A Chimera Containing CD4+ and CD8+ T-Cell Epitopes of the *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase (NH36) Optimizes Cross-Protection against *Leishmania amazonensis* Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 100, 2017.

AMBIT, A. et al. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1429–1438, nov. 2011.

AN, T.; HU, H.; LI, Z. The kinetoplastid-specific phosphatase KPP1 attenuates PLK activity to facilitate flagellum inheritance in *Trypanosoma brucei*. **Science Signaling**, v. 14, n. 669, p. eabc6435, 9 fev. 2021.

ANAND, S.; MADHUBALA, R. Genetically Engineered Ascorbic acid-deficient Live Mutants of *Leishmania donovani* induce long lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10706, 2 jun. 2015.

AOKI, V. et al. Some Good and Some Bad: Sand Fly Salivary Proteins in the Control of Leishmaniasis and in Autoimmunity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 839932, 2022.

ARAÚJO, M. S. S. et al. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 141, n. 1–2, p. 64–75, 15 maio 2011.

ASSIS, R. R. et al. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1543, 2012.

ATO, M. et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1185–1191, dez. 2002.

AZAB, M.; ABDEL MAWLA, M. Evidence-based insights on *Leishmania* replication and cytokinesis. **Parasitologists United Journal**, v. 11, n. 3, p. 134–140, 1 dez. 2018.

BANERJEE, A. et al. Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin Gene-Deleted Parasites Induce IL-23-Dependent IL-17-Protective Immune Response against Visceral Leishmaniasis in a Murine Model. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 200, n. 1, p. 163–176, 1 jan. 2018.

BENEKE, T. et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 5, p. 170095, maio 2017.

BENEKE, T.; GLUENZ, E. LeishGEdit: A Method for Rapid Gene Knockout and Tagging Using CRISPR-Cas9. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1971, p. 189–210, 2019.

BERTHOLET, S. et al. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. **Vaccine**, v. 27, n. 50, p. 7036–7045, 23 nov. 2009.

BESSAT, M. et al. A minimal anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59258, 2013.

BHATTACHARYYA, S. et al. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1499–1507, mar. 2001.

BLACK, J. A. et al. Life in plastic, it's fantastic! How *Leishmania* exploit genome instability to shape gene expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1102462, 2023.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749–795, 1997.

BOGDAN, C. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, p. 100041, dez. 2020.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 set. 2018.

BUXBAUM, L. U. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection. **Immunologic Research**, v. 42, n. 1–3, p. 197–209, 2008.

BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2101–2108, abr. 2005.

CAPECCHI, M. R. Altering the genome by homologous recombination. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, n. 4910, p. 1288–1292, 16 jun. 1989.

CATTA-PRETA, C. M. C. et al. HOP1 and HAP2 are conserved components of the meiosis-related machinery required for successful mating in *Leishmania*. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 7159, 7 nov. 2023.

CHANG, K. P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 499–529, 1990.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, nov. 2007.

CHHAJER, R. et al. *Leishmania donovani* Aurora kinase: A promising therapeutic target against visceral leishmaniasis. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1860, n. 9, p. 1973–1988, set. 2016.

CONTRERAS, I. et al. Impact of *Leishmania mexicana* infection on dendritic cell signaling and functions. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3202, set. 2014.

COSTA, C. H. N. et al. From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 969, jul. 2023.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022.

COTA, G. et al. Inequalities of visceral leishmaniasis case-fatality in Brazil: A multilevel modeling considering space, time, individual and contextual factors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 7, p. e0009567, 1 jul. 2021.

CRUZ, A.; BEVERLEY, S. M. Gene replacement in parasitic protozoa. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 171–173, 8 nov. 1990.

CRUZ, A.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 16, p. 7170–7174, 15 ago. 1991.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 53–59, jun. 2003.

DELTCHEVA, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602–607, 31 mar. 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.

DEY, R. et al. Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 190, n. 5, p. 2138–2149, 1 mar. 2013.

DIRO, E. et al. Atypical manifestations of visceral leishmaniasis in patients with HIV in north Ethiopia: a gap in guidelines for the management of opportunistic infections in resource poor settings. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 122–129, jan. 2015.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 276, 3 dez. 2012.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 28 nov. 2014.

DUBIE, T.; MOHAMMED, Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, p. 2496713, 2020.

DUNCAN, S. M.; JONES, N. G.; MOTTRAM, J. C. Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 216, p. 30–38, set. 2017.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 13 ago. 2014.

ERSFELD, K.; GULL, K. Partitioning of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5312, p. 611–614, 25 abr. 1997.

ERSFELD, K.; MELVILLE, S. E.; GULL, K. Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, v. 15, n. 2, p. 58–63, fev. 1999.

FERREIRA, J. R. S. et al. American visceral leishmaniasis in a state of northeastern Brazil: clinical, epidemiological and laboratory aspects. **Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia**, v. 82, p. e238383, 2021.

FRANSSEN, S. U. et al. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. **eLife**, v. 9, p. e51243, 25 mar. 2020.

FURTADO, R. R. et al. Visceral Leishmaniasis Urbanization in the Brazilian Amazon Is Supported by Significantly Higher Infection Transmission Rates Than in Rural Area. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2188, 4 nov. 2022.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GILLESPIE, P. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992–2995, 3 jun. 2016.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 1, p. 106–112, ago. 2008.

GLENNIE, N. D.; SCOTT, P. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 50–54, nov. 2016.

GLOVER, L.; JUN, J.; HORN, D. Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 4, p. 1372–1380, mar. 2011.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, abr. 2010.

GURUNATHAN, S. et al. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. **Nature Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1409–1415, dez. 1998.

HALLIDAY, C. et al. Cellular landmarks of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 230, p. 24–36, jun. 2019.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, abr. 2001.

HAVENS, C. G. et al. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 223–236, out. 2000.

HAYASHI, H.; AKIYOSHI, B. Degradation of cyclin B is critical for nuclear division in *Trypanosoma brucei*. **Biology Open**, v. 7, n. 3, p. bio031609, 23 mar. 2018.

HAYDOCK, A. et al. RNA-seq approaches for determining mRNA abundance in *Leishmania*. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1201, p. 207–219, 2015.

HEMPHILL, A.; AFFOLTER, M.; SEEBECK, T. A novel microtubule-binding motif identified in a high molecular weight microtubule-associated protein from *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Cell Biology**, v. 117, n. 1, p. 95–103, abr. 1992.

HERGOVICH, A. et al. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 4, p. 253–264, abr. 2006.

HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 161, n. 2, p. 179–183, out. 2014.

ISMAIL, N. et al. Immunization with Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin-/Parasites Is Efficacious in Asymptomatic Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1788, 2017.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6096, p. 816–821, 17 ago. 2012.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 15 jan. 2001.

KARMAKAR, S. et al. Preclinical validation of a live attenuated dermatropic *Leishmania* vaccine against vector transmitted fatal visceral leishmaniasis. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 929, 30 jul. 2021.

KARMAKAR, S. et al. Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against Old World visceral leishmaniasis. **NPJ vaccines**, v. 7, n. 1, p. 157, 3 dez. 2022.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 jul. 2011.

KELLY, F. D. et al. A cytoskeletal protein complex is essential for division of intracellular amastigotes of *Leishmania mexicana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 13106–13122, 11 set. 2020.

KELLY, F. D.; SANCHEZ, M. A.; LANDFEAR, S. M. Touching the Surface: Diverse Roles for the Flagellar Membrane in Kinetoplastid Parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 2, p. 10.1128/mubr.00079-19, abr. 2020.

KILMARTIN, J. V. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 7, p. 1211–1221, 29 set. 2003.

KYU, H. H. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1859–1922, 10 nov. 2018.

LA RUSSA, M. F.; QI, L. S. The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 22, p. 3800–3809, nov. 2015.

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

LANDER, N.; CHIURILLO, M. A.; DOCAMPO, R. Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 679–690, set. 2016.

LI, Z.; WANG, C. C. KMP-11, a basal body and flagellar protein, is required for cell division in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 11, p. 1941–1950, nov. 2008.

LIN, F. L.; SPERLE, K.; STERNBERG, N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 5, p. 1391–1395, mar. 1985.

LOURADOUR, I. et al. Stress conditions promote *Leishmania* hybridization in vitro marked by expression of the ancestral gamete fusogen HAP2 as revealed by single-cell RNA-seq. **eLife**, v. 11, p. e73488, 7 jan. 2022.

MA, J. et al. Nuclear DBF-2-related kinases are essential regulators of cytokinesis in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 20, p. 15356–15368, 14 maio 2010.

MA, Y.; ZHANG, L.; HUANG, X. Genome modification by CRISPR/Cas9. **The FEBS journal**, v. 281, n. 23, p. 5186–5193, dez. 2014.

MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 15 fev. 2013.

MALVOLTI, S. et al. Human leishmaniasis vaccines: Use cases, target population and potential global demand. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009742, set. 2021.

MAPA. **Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contraleishmaniose-apos-fiscalizacao>>. Acesso em: 3 jul. 2023.

MARIC, D.; EPTING, C. L.; ENGMAN, D. M. Composition and sensory function of the trypanosome flagellar membrane. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 466–472, ago. 2010.

MARINHO, D. S. et al. Health economic evaluations of visceral leishmaniasis treatments: a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003527, fev. 2015.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M. et al. *Leishmania* Hijacks Myeloid Cells for Immune Escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 883, 2018.

MARTINEZ-SANZ, J.; ASSAIRI, L. New insights into the interaction of centrin with Sfi1. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1864, n. 4, p. 319–330, abr. 2016.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, set. 2016.

MCKEAN, P. G. Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 600–607, dez. 2003.

MEGE, J.-L. et al. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 557–569, set. 2006.

MESTAS, J.; HUGHES, C. C. W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 172, n. 5, p. 2731–2738, 1 mar. 2004.

MINOCHA, N. et al. Kinetoplast morphology and segregation pattern as a marker for cell cycle progression in *Leishmania donovani*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 249–253, 2011.

MOAFI, M. et al. Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 10, p. 95, 2019.

MOREIRA, N. DAS D. et al. Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 418–424, 15 abr. 2009.

MOREIRA, P. O. L.; NOGUEIRA, P. M.; MONTE-NETO, R. L. Next-Generation Leishmanization: Revisiting Molecular Targets for Selecting Genetically Engineered Live-Attenuated *Leishmania*. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1043, abr. 2023.

MÜLLER, I. et al. T-cell responses and immunity to experimental infection with *leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 561–578, 1989.

MURRAY, H. W. Kala-azar--progress against a neglected disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1793–1794, 28 nov. 2002.

MUTISO, J. M. et al. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. **Journal of Biomedical Research**, v. 27, n. 2, p. 85–102, mar. 2013.

NAGAOKA, S. I.; HASSOLD, T. J.; HUNT, P. A. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 7, p. 493–504, 18 jun. 2012.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464–1488, out. 2011.

NEGREIRA, G. H. et al. The adaptive roles of aneuploidy and polyclonality in *Leishmania* in response to environmental stress. **EMBO reports**, v. 24, n. 9, p. e57413, 6 set. 2023.

NEPOMUCENO-MEJÍA, T.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S. Nucleolar Division in the Promastigote Stage of *Leishmania major* Parasite: A Nop56 Point of View. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1641839, 2018.

NOGUEIRA, P. M. et al. Immunomodulatory Properties of *Leishmania* Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: Differential Activation of TLRs and NF-κB

Translocation by Dermotropic and Viscerotropic Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 380, 2020.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, set. 2007.

OGBADOYI, E. et al. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. **Chromosoma**, v. 108, n. 8, p. 501–513, mar. 2000.

OLIVEIRA, F.; DE CARVALHO, A. M.; DE OLIVEIRA, C. I. Sand-fly saliva-leishmania-man: the trigger trio. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 375, 19 nov. 2013.

OLIVIER, M.; ZAMBONI, D. S. Leishmania Viannia guyanensis, LRV1 virus and extracellular vesicles: a dangerous trio influencing the faith of immune response during muco-cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 66, p. 108–113, out. 2020.

OMARI, H. E. et al. Impact of Urbanization and Socioeconomic Factors on the Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Center of Morocco. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2020, 2020.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

PACHECO-FERNANDEZ, T. et al. Revival of Leishmanization and Leishmanin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 639801, 2021.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 69, 2012.

PARSONS, M. et al. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC genomics**, v. 6, p. 127, 15 set. 2005.

PASSOS-SILVA, D. G. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, p. 840768, 4 out. 2010.

PATINO, L. H. et al. Genomic Diversification, Structural Plasticity, and Hybridization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 582192, 2020.

PETRITUS, P. M. et al. *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, p. e1858, 2012.

RAMANANTSALAMA, M. R. et al. TFK1, a basal body transition fibre protein that is essential for cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 135, n. 11, p. jcs259893, 1 jun. 2022.

RAMÍREZ, J. D. et al. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28266, 22 jun. 2016.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, nov. 2013.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2948–2952, dez. 2008.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 3 maio 2014.

REDMAN, M. et al. What is CRISPR/Cas9? **Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition**, v. 101, n. 4, p. 213–215, ago. 2016.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341–349, jul. 2010.

REIS, L. E. S. et al. Mixed Formulation of Conventional and Pegylated Meglumine Antimoniate-Containing Liposomes Reduces Inflammatory Process and Parasite Burden in *Leishmania infantum*-Infected BALB/c Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. e00962-17, nov. 2017.

RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 73–88, 2003.

RIVIER, D. et al. Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 9, p. 461–473, set. 1999.

ROATT, B. M. et al. A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 217, 2017.

ROBINSON, D. R. et al. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. **Journal of cell biology**, v. 128, n. 6, 1995.

RODRIGUES, V. et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2567, fev. 2014.

RODRIGUES, V. et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 118, 1 mar. 2016.

ROMANO, A. et al. Cutaneous Infection with *Leishmania major* Mediates Heterologous Protection against Visceral Infection with *Leishmania infantum*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 195, n. 8, p. 3816–3827, 15 out. 2015.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 29 ago. 2014.

ROSTAMIAN, M. et al. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against Leishmania tropica infection in BALB/c mice. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi**, v. 50, n. 2, p. 160–166, abr. 2017.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, nov. 2002.

SAFAVI, M.; ESHAGHI, H.; HAJIHASSANI, Z. Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. **Diagnostic Cytopathology**, v. 49, n. 3, p. 446–448, 2021.

SALISBURY, J. L. Centrosomes: Sfi1p and centrin unravel a structural riddle. **Current biology: CB**, v. 14, n. 1, p. R27-29, 6 jan. 2004.

SALJOUGHIAN, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 134, 2014.

SANCHEZ, M. A. et al. KHARON Is an Essential Cytoskeletal Protein Involved in the Trafficking of Flagellar Membrane Proteins and Cell Division in African Trypanosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 38, p. 19760–19773, 16 set. 2016.

SANTI, A. M. M. et al. Growth arrested live-attenuated Leishmania infantum KHARON1 null mutants display cytokinesis defect and protective immunity in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11627, 2 ago. 2018.

SCARPINI, S. et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, out. 2022.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, set. 2016.

SEDER, R. A.; HILL, A. V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 793–798, 17 ago. 2000.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Centrin1 is required for organelle segregation and cytokinesis in Trypanosoma brucei. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 9, p. 3290–3301, set. 2007.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Intracellular replication-deficient Leishmania donovani induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 183, n. 3, p. 1813–1820, 1 ago. 2009.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 631460, 2012.

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548–555, maio 2018.

SHAIK, J. S. et al. *Leishmania* Sexual Reproductive Strategies as Resolved through Computational Methods Designed for Aneuploid Genomes. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 167, 26 jan. 2021.

SHALEM, O. et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, n. 6166, p. 84–87, 3 jan. 2014.

SILVESTRE, R. et al. SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 179, n. 5, p. 3161–3170, 1 set. 2007.

SILVESTRE, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OUAISSI, A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 56, n. 2, p. 123–126, 2008.

SIMPSON, L. Effect of acriflavin on the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. Mode of action and physiological correlates of the loss of kinetoplast DNA. **The Journal of cell biology**, v. 37, n. 3, p. 660–682, 1 jun. 1968.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, 6 jun. 2012.

SINGH, O. P. et al. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 58, n. 10, p. 1424–1429, maio 2014.

SMITHIES, O. et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. **Nature**, v. 317, n. 6034, p. 230–234, 19 set. 1985.

SOLANA, J. C. et al. Vaccination with a *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant confers long-term protective immunity against *Leishmania major* infection in two mice models. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 5, p. e0005644, maio 2017.

SOLANA, J. C. et al. Subcutaneous Immunization of *Leishmania* HSP70-II Null Mutant Line Reduces the Severity of the Experimental Visceral Leishmaniasis in BALB/c Mice. **Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 141, 23 mar. 2020.

SQUIRES, K. E. et al. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 12, p. 4244–4249, 15 dez. 1989.

STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8(+) T cells in leishmania infections: friends or foes? **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 5, 2012.

SUNDAR, S.; SINGH, B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 22, n. 6, p. 467–486, jun. 2018.

TAGWERKER, C. et al. A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 5, n. 4, p. 737–748, abr. 2006.

TAMMANA, T. V. S. et al. ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of Leishmania cell division. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. Pt 11, p. 1894–1901, 1 jun. 2010.

TRAN, K. D. et al. KHARON1 mediates flagellar targeting of a glucose transporter in Leishmania mexicana and is critical for viability of infectious intracellular amastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 31, p. 22721–22733, 2 ago. 2013.

TRAN, K. D. et al. Kharon1 null mutants of Leishmania mexicana are avirulent in mice and exhibit a cytokinesis defect within macrophages. **PloS One**, v. 10, n. 8, p. e0134432, 2015.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335–344, ago. 2012.

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. Low dose Leishmania major promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 11, p. 1559–1566, 7 jun. 2004.

VAN BREUGEL, M. et al. Structure of the SAS-6 cartwheel hub from Leishmania major. **eLife**, v. 3, p. e01812, 1 jan. 2014.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, jun. 2012.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79–99, mar. 2019.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. **Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, n. 3, p. 78–82, set. 2010.

VOLPEDO, G. et al. Centrin-deficient Leishmania mexicana confers protection against New World cutaneous leishmaniasis. **NPJ vaccines**, v. 7, n. 1, p. 32, 2 mar. 2022.

VOULDOUKIS, I. et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of Leishmania infantum and Leishmania major by human macrophages by decreasing

nitric oxide generation. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 4, p. 860–865, 1997.

WAGNER, V. et al. Innovative Solutions for the Control of Leishmaniasis: Nanoscale Drug Delivery Systems. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 14, p. 1582–1592, 2019.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, fev. 2011.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 1 maio. 2023.

YAMEY, G.; TORRELE, E. The world's most neglected diseases. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 325, n. 7357, p. 176–177, 27 jul. 2002.

YANG, X. Applications of CRISPR-Cas9 mediated genome engineering. **Military Medical Research**, v. 2, n. 1, p. 11, 9 mai. 2015.

ZAPH, C. et al. Central memory T cells mediate long-term immunity to Leishmania major in the absence of persistent parasites. **Nature Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1104–1110, out. 2004.

ZHANG, W.-W. et al. A second generation leishmanization vaccine with a markerless attenuated Leishmania major strain using CRISPR gene editing. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3461, 10 jul. 2020.

ZHANG, W.-W.; LYPACZEWSKI, P.; MATLASHEWSKI, G. Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for Leishmania and Its Use To Target a Multigene Family, Induce Chromosomal Translocation, and Study DNA Break Repair Mechanisms. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00340-16, 2017.

ZHOU, Q.; DONG, G.; LI, Z. Flagellum inheritance in Trypanosoma brucei requires a kinetoplastid-specific protein phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 22, p. 8508–8520, 1 jun. 2018.

ZORGI, N. E. et al. Leishmania infantum transfected with toxic plasmid induces protection in mice infected with wild type L. infantum or L. amazonensis. **Molecular Immunology**, v. 127, p. 95–106, nov. 2020.

APÊNDICES

Apêndice I – Tipagem para definição de espécie de *Leishmania*

Métodos e resultados

Amplificação por PCR do gene que codifica para aquagliceroporina (AQP1) de *Leishmania*, seguido de sequenciamento por Sanger, após extração e purificação dos produtos obtidos.

Iniciadores utilizados:

Leishmania infantum

Senso: 5' ATGAACTCTCCTACAAGCACACCT 3'

Antisenso: 5' CTAGAAGTTGGGTGGAATGATGAAAA 3'

Leishmania mexicana

Senso: 5' ATGAACTCTCCTACAAGCAT 3'

Antisenso: 5' CTAGAAATTGGGCGGAATGA 3'

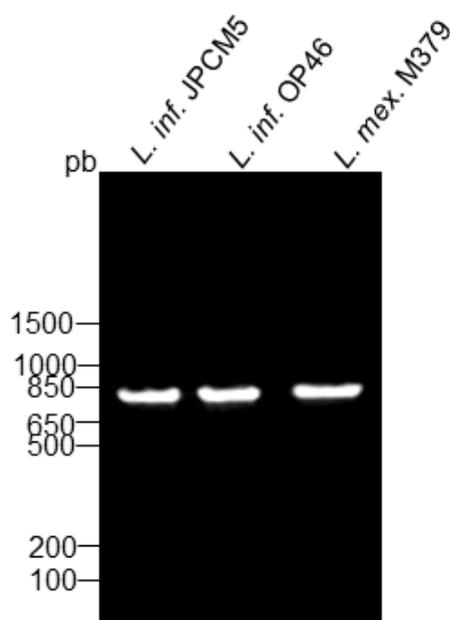


Figura S1 - Migração do produto da PCR em gel de agarose 1,5% revelando a presença da uma banda única. A mesma foi extraída e purificada utilizando o kit 'Gel extraction kit (QUIAGEN) e enviada para sequenciamento.

Após a amplificação, com um auxílio de um bisturi a banda foi extraída e purificada utilizando o Kit 'Gel extraction kit' (QIAGEN) que posteriormente foi enviada para o sequenciamento de Sanger na plataforma de sequenciamento do Instituto René Rachou, Fiocruz-MG. Os resultados gerados, foram posteriormente utilizadas para a formação das sequências consensos de cada espécie, utilizando o software 'BioEdit'.

L. infantum JPCM5 – 488 pb

CCGGCGTCATTGCTACCACTGTCTTTACGCCGGTAACGCTGCAAGCTACCAGTCCAACCTCCAG
CTACATGGCCATCACCTTTGGCTGGGGGTTTGGGCTCACTATCGGCCTTTTCCTGAGCATGGCG
GTGTCCGGTGGTACCTGAACCCAGCTGTGACGCTCGCGAACTGTGTCTTTGGTGCCTTTCCCT
GGATTAAGCTACCCGGCTATTTTCTCGCCAAATTTCTCGGAGGCTTGGTTGGTGCCGCCAACACC
TACGGGCTCTTCAAATCGCACTTTGACGACGCCAAAAGGCCTTGCTTCCGAACGAGACGATGG
CGTCCAAGTACAGCGGAATCTTCGCCACATACCCTAATGTTGCAAACACCTACGCAGTGTGGAGT
GAGGTGTTCAACACCATGGCCCTCATGATGGGCATTCTCGCCATCACGGATCCTCGCATGACTC
CTGCCGTCAACTACAAGCCGGTGGCTATTGGACTACTG

L. infantum OP46 – 559 pb

TTCTTCGGCAGCTTTTTCTCGTCACCTTTGGAACCGGCGTCATTGCTACCACTGTCTTTACGCC
GGTAACGCTGGCAAGCTACCAGTCCAACCTCCAGCTACATGGCCATCACCTTTGGCTGGGGGTTT
GGGCTCACTATCGGCCTTTTCCTGAGCATGGCGGTGTCCGGTGGTACCTGAACCCAGCTGTGA
CGCTCGCGAACTGTGTCTTTGGTGCCTTTCCCTGGATTAAGCTACCCGGCTATTTTCTCGCCAA
TTTTCTCGGAGGCTTGGTTGGTGGCCGCAACACCTACGGGCTCTTCAAATCGCACTTTGACGACG
CCAAAAGGCCTTGCTTCCGAACGAGACGATGGCGTCCAAGTACAGCGGAATCTTCGCCACATA
CCCTAATGTTGCAAACACCTACGCAGTGTGGAGTGAGGTGTTCAACACCATGGCCCTCATGATGG
GCATTCTCGCCATCACGGATCCTCGCAATGACTCCATGCCGTCAACTACAAGCCGGTGGCTATTG
GACTACTGTTGTTTGTCAATTGGCATCACGACAGGCATCAAC

L. mexicana M379 - 732 pb

GAAATGCATCAGGAGGCGCACAGAGGAAGCGAGAGGAAGAGGAGCTTACGTTGGCAGGGCAAG
TGGCCCTTCTACAAATACCGATGGTTGGTACGCGAGTACGTTGCCGAGTTCTTCGGAACGTTTTT
TCTCGTCACCTTTGGAACCGGCGTCATTGCGACGACTGTGTTTACGCCGGTAACGCTGCCGTC
TATCAGTCCAACACGAGCTACATGGAAATCACCTTTGGCTGGGGCTTTGGGCTCACCATCGGCC
TTTTCTGAGCATGGCTGTGTCCGGTGGTACCTGAACCCGGCCGTGACGCTAGCGAACTGTGT
CTTTGGTGTCTTCCCTGGATTAAGCTACCAGGCTACTTTCTCGCCCAGTTTCTCGGAGCCTTGG
CTGGTGGCGCGAACACTTACCTGCTCTTCAAATCGCACTTTGACGTAGGCCAAAAGAATTGCTT
CAAACGAAACGATGGCATCCAAGTACAGCGGTATCTTCGCCACATACCCTAATGTTGCGAACAC
CTACGCGGCGTGGAGCGAGGTGTTCAACACCATGGCACTCATGATGGGGATTCTCGCCATCACG
GACCCTCGCATGACTCCCGCTGTCAACTTCAAGCCGGTGGCTATTGGGCTTCTCTTGTGTTGAT
TGGTATCACGTCAGGCATCAACTCTGCCTATGGCCTCAACCCCGCACGCGATTTTGCACCTCGG
GTGTTCCGCGCCATGCTTTGGGG

Posteriormente, as sequências foram alinhadas na plataforma BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com o intuito de identificar a espécie em questão.

Figura S2: Alinhamento das sequências consenso com as cepas de referência de cada espécie geradas pelo BLAST.

A) *L. infantum* JPCM5

Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 31
 Sequence ID: [FR796463.1](#) Length: 1468864 Number of Matches: 1

Range 1: 10713 to 11200 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
902 bits(488)	0.0	488/488(100%)	0/488(0%)	Plus/Minus
Query 1	CCGGCGTCATTGCTACCACTGTCTTTACGCCGGTAACGCTGCAAGCTACCAGTCCAAC	60		
Sbjct 11200	CCGGCGTCATTGCTACCACTGTCTTTACGCCGGTAACGCTGCAAGCTACCAGTCCAAC	11141		
Query 61	CCAGCTACATGGCCATCACCTTTGGCTGGGGTTTGGGCTCACATCGGCCTTTCTCGA	120		
Sbjct 11140	CCAGCTACATGGCCATCACCTTTGGCTGGGGTTTGGGCTCACATCGGCCTTTCTCGA	11081		
Query 121	GCATGGCGGTGTCGGGTGGTACCTGAACCCAGCTGTGACGCTCGCAACTGTGCTTTG	180		
Sbjct 11080	GCATGGCGGTGTCGGGTGGTACCTGAACCCAGCTGTGACGCTCGCAACTGTGCTTTG	11021		
Query 181	GTGCCTTCCCTGGATTAAGCTACCCGGCTATTTCTCGCCCAATTTCTCGGAGGCTTGG	240		
Sbjct 11020	GTGCCTTCCCTGGATTAAGCTACCCGGCTATTTCTCGCCCAATTTCTCGGAGGCTTGG	10961		
Query 241	TTGGTGGCCCAACACCTACGGGCTCTTCAATCGCACTTTGACGACGCCAAAAGGCT	300		
Sbjct 10960	TTGGTGGCCCAACACCTACGGGCTCTTCAATCGCACTTTGACGACGCCAAAAGGCT	10901		
Query 301	TGCTCCGAACGAGACGATGGCGTCAAGTACAGCGGAATCTTCCACATACCCAAATG	360		
Sbjct 10900	TGCTCCGAACGAGACGATGGCGTCAAGTACAGCGGAATCTTCCACATACCCAAATG	10841		
Query 361	TTGCAAAACACCTACGAGTGGAGTGAAGTGTTCACACCATGGCCCTCATGATGGCA	420		
Sbjct 10840	TTGCAAAACACCTACGAGTGGAGTGAAGTGTTCACACCATGGCCCTCATGATGGCA	10781		
Query 421	TTCTCGCCATCAGGATCCTCGCATGACTCTGCCGTCAACTACAAGCCGGTGGCTATTG	480		
Sbjct 10780	TTCTCGCCATCAGGATCCTCGCATGACTCTGCCGTCAACTACAAGCCGGTGGCTATTG	10721		
Query 481	GACTACTG 488			
Sbjct 10720	GACTACTG 10713			

B) *L. infantum* OP46

Leishmania infantum strain TR01 isolate Lin_TR01 chromosome 31, complete sequence
 Sequence ID: [CP027831.1](#) Length: 1472931 Number of Matches: 1

Range 1: 10699 to 11253 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1011 bits(547)	0.0	555/558(99%)	3/558(0%)	Plus/Minus
Query 2	TTCTTCGGCACGTTTTTCTCGTACCTTTGGAACCGGGTATTGCTACCACTGTCTTT	61		
Sbjct 11253	TTCTTCGGCACGTTTTTCTCGTACCTTTGGAACCGGGTATTGCTACCACTGTCTTT	11194		
Query 62	CACGCCGTAACGCTGGCAAGTACCAAGTCCAACTCCAGTACATGGCCATCACCTTTGG	121		
Sbjct 11193	CACGCCGTAACGCTGGCAAGTACCAAGTCCAACTCCAGTACATGGCCATCACCTTTGG	11135		
Query 122	CTGGGGTTTGGGCTCACTATCGGCCTTTTCTGAGCATGGCGGTGTCGGGTGGTCACT	181		
Sbjct 11134	CTGGGGTTTGGGCTCACTATCGGCCTTTTCTGAGCATGGCGGTGTCGGGTGGTCACT	11075		
Query 182	GAACCCAGCTGTGACGCTCGCAACTGTGCTTTGGTGCCTTTCCCTGGATTAAGTACC	241		
Sbjct 11074	GAACCCAGCTGTGACGCTCGCAACTGTGCTTTGGTGCCTTTCCCTGGATTAAGTACC	11015		
Query 242	CGGCTATTTCTCGCCCAATTTCTCGGAGGCTTGGTTGGTGGCCCAACACCTACGGGCT	301		
Sbjct 11014	CGGCTATTTCTCGCCCAATTTCTCGGAGGCTTGGTTGGTGGCCCAACACCTACGGGCT	10955		
Query 302	CTTCAATCGCACTTTGACGACGCCAAAAGGCTTGCTTCCGAACGAGACGATGGCGTC	361		
Sbjct 10954	CTTCAATCGCACTTTGACGACGCCAAAAGGCTTGCTTCCGAACGAGACGATGGCGTC	10895		
Query 362	CAAGTACAGCGGAATCTTCCACATACCCATATGTTGCAAAACACCTACGAGTGGAG	421		
Sbjct 10894	CAAGTACAGCGGAATCTTCCACATACCCATATGTTGCAAAACACCTACGAGTGGAG	10835		
Query 422	TGAGGTGTTCAACACCATGGCCCTCATGATGGGATTCTCGCCATCACGGATCCTCGAA	481		
Sbjct 10834	TGAGGTGTTCAACACCATGGCCCTCATGATGGGATTCTCGCCATCACGGATCCTCGAA-	10776		
Query 482	TGACTCCATGCCGTCAACTACAAGCCGGTGGCTATTGGACTACTGTTGTTGTCTTGGC	541		
Sbjct 10775	TGACTCC-TGCCGTCAACTACAAGCCGGTGGCTATTGGACTACTGTTGTTGTCTTGGC	10717		
Query 542	ATCACGACAGGCATCAAC 559			
Sbjct 10716	ATCACGACAGGCATCAAC 10699			

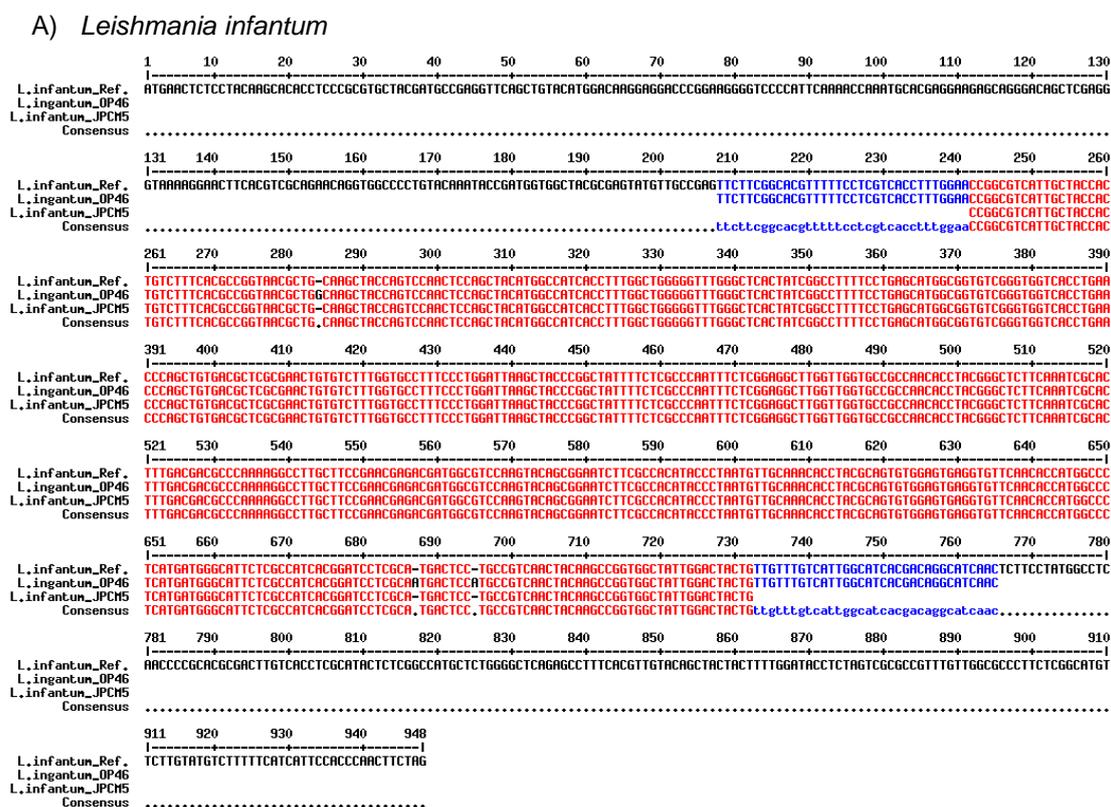
C) *L. mexicana* M379**Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 complete genome, chromosome 30**Sequence ID: [FR799583.1](#) Length: 1439542 Number of Matches: 1Range 1: 6422 to 7152 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1351 bits(731)	0.0	731/731(100%)	0/731(0%)	Plus/Minus
Query 1	GAAATGCATCAGGAGGCGCACAGAGGAAGCGAGAGGAAGAGGAGCTTCACGTGGCAGGGC	60		
Sbjct 7152	GAAATGCATCAGGAGGCGCACAGAGGAAGCGAGAGGAAGAGGAGCTTCACGTGGCAGGGC	7093		
Query 61	AAGTGGCCCTTCTACAAATACCGATGGTTGGTACGCGAGTACGTTGCCGAGTCTTCGGA	120		
Sbjct 7892	AAGTGGCCCTTCTACAAATACCGATGGTTGGTACGCGAGTACGTTGCCGAGTCTTCGGA	7833		
Query 121	ACGTTTTTCTCGTCACCTTTGGAACCGGCGTCATTGCGACGACTGTGTTTCACGCCGGT	180		
Sbjct 7832	ACGTTTTTCTCGTCACCTTTGGAACCGGCGTCATTGCGACGACTGTGTTTCACGCCGGT	6973		
Query 181	AACGCTGCCGCTATCAGTCCAACACGAGCTACATGGAAATCACCCTTGGCTGGGGCTTT	240		
Sbjct 6972	AACGCTGCCGCTATCAGTCCAACACGAGCTACATGGAAATCACCCTTGGCTGGGGCTTT	6913		
Query 241	GGGCTCACCATCGGCCCTTTTCTGAGCATGGCTGTGTCGGTGGTCACCTGAACCCGGCC	300		
Sbjct 6912	GGGCTCACCATCGGCCCTTTTCTGAGCATGGCTGTGTCGGTGGTCACCTGAACCCGGCC	6853		
Query 301	GTGACGCTAGCGAACGTGTCTTTGGTGTCTTCCCTGGATTAAGCTACCAGGCTACTTT	360		
Sbjct 6852	GTGACGCTAGCGAACGTGTCTTTGGTGTCTTCCCTGGATTAAGCTACCAGGCTACTTT	6793		
Query 361	CTCGCCAGTTCTCGGAGCCTTGGCTGGTCCGCGAACACTTACCTGCTCTTCAAATCG	420		
Sbjct 6792	CTCGCCAGTTCTCGGAGCCTTGGCTGGTCCGCGAACACTTACCTGCTCTTCAAATCG	6733		
Query 421	CACCTTGACGTAGGCCAAAAGAACTTGCTTCAAACGAAACGATGGCATCCAAGTACAGC	480		
Sbjct 6732	CACCTTGACGTAGGCCAAAAGAACTTGCTTCAAACGAAACGATGGCATCCAAGTACAGC	6673		
Query 481	GGTATCTTCGCCACATACCTAATGTTGCGAACACCTACGCGGCTGGAGCGAGGTGTT	540		
Sbjct 6672	GGTATCTTCGCCACATACCTAATGTTGCGAACACCTACGCGGCTGGAGCGAGGTGTT	6613		
Query 541	AACACCATGGCACTCATGATGGGGATTCTGCCATCACGGACCTCGCATGACTCCCCT	600		
Sbjct 6612	AACACCATGGCACTCATGATGGGGATTCTGCCATCACGGACCTCGCATGACTCCCCT	6553		
Query 601	GTCAACTTCAAGCCGGTGGCTATTGGGCTTCTCTGTTTGTGATTGGTATCACGTACAGC	660		
Sbjct 6552	GTCAACTTCAAGCCGGTGGCTATTGGGCTTCTCTGTTTGTGATTGGTATCACGTACAGC	6493		
Query 661	ATCAACTCTGCCTATGGCCTCAACCCCGCACGCGATTTGCACTCGGGTGTTCGCGGCC	720		
Sbjct 6492	ATCAACTCTGCCTATGGCCTCAACCCCGCACGCGATTTGCACTCGGGTGTTCGCGGCC	6433		
Query 721	ATGCTTTGGGG 731			
Sbjct 6432	ATGCTTTGGGG 6422			

As sequências foram alinhadas de acordo com as cepas de referência depositadas nos bancos de dados disponíveis. A plataforma BLAST mostra a porcentagem de identidade entre as sequências. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Posteriormente foi realizado o alinhamento da sequência de nucleotídeos gerados no sequenciamento com a sequência da cepa referência de cada espécie.

Figura S3: Alinhamento da sequência de nucleotídeos de *Leishmania* com a sequência consenso obtida a partir do sequenciamento.



B) *L. mexicana*

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
L.mexicana_Ref. ATGAACTCTCTACAGCATGCCGGTCCCCTGTCGCAAGCCGATGCTCAATGTGCATGGACAGGAGGACCCGGACGGGGTTGCCGTGGAAACGAAATGCATCAGGAGCCACAGGAGGACGAA
L.mexicana_M3T9 .....GAAATGCATCAGGAGCCACAGGAGGACGAA
Consensus .....GAAATGCATCAGGAGCCACAGGAGGACGAA

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
L.mexicana_Ref. GGAAGAGGAGCTTACGCTGGCAGGGCAGTGGCCCTTCTACAAATACCGATGGTTGGTACGCGAGTACGTTGCCGAGTTCTTCGGACGCTTTTCTCGTACCTTTGGAAACCGGCGTATTGGCAGCAG
L.mexicana_M3T9 .....GGAAGAGGAGCTTACGCTGGCAGGGCAGTGGCCCTTCTACAAATACCGATGGTTGGTACGCGAGTACGTTGCCGAGTTCTTCGGACGCTTTTCTCGTACCTTTGGAAACCGGCGTATTGGCAGCAG
Consensus .....GGAAGAGGAGCTTACGCTGGCAGGGCAGTGGCCCTTCTACAAATACCGATGGTTGGTACGCGAGTACGTTGCCGAGTTCTTCGGACGCTTTTCTCGTACCTTTGGAAACCGGCGTATTGGCAGCAG

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
L.mexicana_Ref. TGTGTTTACGCGCGTACGCTGCCGCTATCAGTCCAAACAGCAGCTACATGGAATCACCTTGGCTGGGGCTTTGGGCTCACCATCGGCTTTCTCGACATGGCTGTCCGGTGGTCACTGAC
L.mexicana_M3T9 .....TGTGTTTACGCGCGTACGCTGCCGCTATCAGTCCAAACAGCAGCTACATGGAATCACCTTGGCTGGGGCTTTGGGCTCACCATCGGCTTTCTCGACATGGCTGTCCGGTGGTCACTGAC
Consensus .....TGTGTTTACGCGCGTACGCTGCCGCTATCAGTCCAAACAGCAGCTACATGGAATCACCTTGGCTGGGGCTTTGGGCTCACCATCGGCTTTCTCGACATGGCTGTCCGGTGGTCACTGAC

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
L.mexicana_Ref. CCGCCGTGACGCTAGCGAAGTGTGCTTTGGTGTCTTCCCTGGATTAGCTACAGGCTACTTCTCGCCAGTTCTCGAGCCTTGGCTGGTGGCCGCAACACTTACTGCTTCAATCGCACT
L.mexicana_M3T9 .....CCGCCGTGACGCTAGCGAAGTGTGCTTTGGTGTCTTCCCTGGATTAGCTACAGGCTACTTCTCGCCAGTTCTCGAGCCTTGGCTGGTGGCCGCAACACTTACTGCTTCAATCGCACT
Consensus .....CCGCCGTGACGCTAGCGAAGTGTGCTTTGGTGTCTTCCCTGGATTAGCTACAGGCTACTTCTCGCCAGTTCTCGAGCCTTGGCTGGTGGCCGCAACACTTACTGCTTCAATCGCACT

521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650
L.mexicana_Ref. TTGACGTAGGCCAAAGAGACTTGTCCAAACGAAACGATGGCATCCAGTACAGCGGTATCTCGCCACATACCTTARTGTTGGAAACCTACGCGGCGTGGAGCGAGGTTTCAACACCATGGCACT
L.mexicana_M3T9 .....TTGACGTAGGCCAAAGAGACTTGTCCAAACGAAACGATGGCATCCAGTACAGCGGTATCTCGCCACATACCTTARTGTTGGAAACCTACGCGGCGTGGAGCGAGGTTTCAACACCATGGCACT
Consensus .....TTGACGTAGGCCAAAGAGACTTGTCCAAACGAAACGATGGCATCCAGTACAGCGGTATCTCGCCACATACCTTARTGTTGGAAACCTACGCGGCGTGGAGCGAGGTTTCAACACCATGGCACT

651     660     670     680     690     700     710     720     730     740     750     760     770     780
L.mexicana_Ref. CATGATGGGGATTTCCGCATCAGGACCTCGCATGACTCCCGCTGTCAACTTCAGGCCGGTGGCTATTGGGCTTCTCTTGTGTTGGATTGGATACGCTCAGGCATCACTTGCCTATGGCTCAAC
L.mexicana_M3T9 .....CATGATGGGGATTTCCGCATCAGGACCTCGCATGACTCCCGCTGTCAACTTCAGGCCGGTGGCTATTGGGCTTCTCTTGTGTTGGATTGGATACGCTCAGGCATCACTTGCCTATGGCTCAAC
Consensus .....CATGATGGGGATTTCCGCATCAGGACCTCGCATGACTCCCGCTGTCAACTTCAGGCCGGTGGCTATTGGGCTTCTCTTGTGTTGGATTGGATACGCTCAGGCATCACTTGCCTATGGCTCAAC

781     790     800     810     820     830     840     850     860     870     880     890     900     910
L.mexicana_Ref. CCCBACGCGATTTTGACCTCGGGTGTTCGCGCCATGCTTTGGGGCTCGAGGCTTTCACGATGCATGGTTCTACTTTTGGATACCTTTAATCGACCGTTATTGGCGCCCTTCTCGGCATGTTCT
L.mexicana_M3T9 .....CCCBACGCGATTTTGACCTCGGGTGTTCGCGCCATGCTTTGGGGCTCGAGGCTTTCACGATGCATGGTTCTACTTTTGGATACCTTTAATCGACCGTTATTGGCGCCCTTCTCGGCATGTTCT
Consensus .....CCCBACGCGATTTTGACCTCGGGTGTTCGCGCCATGCTTTGGGGCTCGAGGCTTTCACGATGCATGGTTCTACTTTTGGATACCTTTAATCGACCGTTATTGGCGCCCTTCTCGGCATGTTCT

911     920     930     940     945
L.mexicana_Ref. TTTACGCTTTTTTATCATCCGCCAATTTCTAG
L.mexicana_M3T9 .....
Consensus .....

```

Os alinhamentos foram realizados na plataforma *on-line* multalin. Disponível em:
<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

De acordo com os dados apresentados, podemos concluir que as espécies utilizadas no estudo, foram realmente *L. infantum* e *L. mexicana*.

Apêndice II – Tabela de eficiência dos *primers* da RT-qPCR

ALVOS	R ²	Eficiência (%)
Centrina	0,994	107,4
Sfi1	0,99	101,23
KKT1	0,995	106,4
SAS6	0,992	99
KMP-1	0,99	109,2
KHAP1	0,993	99,2
KHAP2	0,995	108,9
KPP1_H6	0,998	103,9
KPP1_H9	0,995	103,6
TFK1	0,99	105,7
NUP92	0,99	106
STE-STE7	0,992	106,2
PK53	0,992	109,5
Org. citoesq.	0,998	103,6
AP2	0,991	102,4
CRK3	0,99	105,2
CYC6	0,99	101,3
KH1	0,998	97,94
GAPDH	0,992	96,9
DNA polimerase	0,999	99,5

A curva foi realizada utilizando a concentração inicial de 20 ng totais de DNA até 0,078 com diluições de 2x. As corridas foram realizadas conforme as condições da tabela 6. Para este fim, foram utilizados os equipamentos *ViiA7 96 wells standard* e *QuantStudio 12k 96 wells standard* (*Thermo Fisher Scientific™*).

Apêndice III – Artigo de publicado relacionado a tese



Review

Next-Generation Leishmanization: Revisiting Molecular Targets for Selecting Genetically Engineered Live-Attenuated *Leishmania*

Paulo O. L. Moreira , Paula M. Nogueira and Rubens L. Monte-Neto *

Biotechnology Applied to Pathogens (BAP), Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Minas, Belo Horizonte 30190-009, Brazil; pmoreira@aluno.fiocruz.br (P.O.L.M.); paula.nogueira@fiocruz.br (P.M.N.)

* Correspondence: rubens.monte@fiocruz.br; Tel.: +55-31-9-3349-7786

Abstract: Despite decades of research devoted to finding a vaccine against leishmaniasis, we are still lacking a safe and effective vaccine for humans. Given this scenario, the search for a new prophylaxis alternative for controlling leishmaniasis should be a global priority. Inspired by leishmanization—a first generation vaccine strategy where live *L. major* parasites are inoculated in the skin to protect against reinfection—live-attenuated *Leishmania* vaccine candidates are promising alternatives due to their robust elicited protective immune response. In addition, they do not cause disease and could provide long-term protection upon challenge with a virulent strain. The discovery of a precise and easy way to perform CRISPR/Cas-based gene editing allowed the selection of safer null mutant live-attenuated *Leishmania* parasites obtained by gene disruption. Here, we revisited molecular targets associated with the selection of live-attenuated vaccinal strains, discussing their function, their limiting factors and the ideal candidate for the next generation of genetically engineered live-attenuated *Leishmania* vaccines to control leishmaniasis.

Keywords: live-attenuated *Leishmania*; vaccine; leishmanization; genetic manipulation; CRISPR/Cas



Citation: Moreira, P.O.L.; Nogueira, P.M.; Monte-Neto, R.L.

Next-Generation Leishmanization: Revisiting Molecular Targets for Selecting Genetically Engineered Live-Attenuated *Leishmania*. *Microorganisms* 2023, 11, 1043. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041043>

Academic Editor: María Teresa Gómez-Muñoz

Received: 18 March 2023
Revised: 7 April 2023
Accepted: 14 April 2023
Published: 16 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Present in 98 countries, threatening 350 million people at risk of infection, with 12 million infected people and 0.9 to 1.6 million new cases each year, leishmaniasis places among the global top ten neglected diseases, representing a serious worldwide public health problem [1]. It is noteworthy that these numbers could be under-reported, especially after the COVID-19 pandemic that affected the whole global primary health care system, interrupting the elimination program, and negatively impacting the diagnosis, treatment and control of the disease [2]. Transmitted by the bite of a female sand fly vector belonging to the Psychodidae family (*Phlebotomus* spp., *Lutzomyia* spp.), different species of *Leishmania* parasites can cause the diseases in humans, dogs and other mammals [3]. The spread of the disease and urban expansion is closely linked to poverty and environmental and climatological conditions. Leishmaniasis are considered as a disease spectrum, including a wide range of clinical manifestations that can evolve to a fatal outcome depending on the *Leishmania* species involved and the integrity of the host immune response. Clinically, leishmaniasis can be classified into different presentations, such as localized cutaneous leishmaniasis (CL), diffuse and disseminated CL, mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and visceral leishmaniasis (VL) [4]. Canine leishmaniasis can be closely related to human cases in urban areas, since domestic dogs represent the most important reservoirs for the parasites [5].

In the Americas, the Mediterranean basin and the Middle East, VL due to *L. infantum* is considered primarily as a zoonosis, while it can be classified as an anthroponosis in India, other Asian countries and Africa, caused by *L. donovani*. Visceral leishmaniasis is the most fatal form if left untreated, especially in immunosuppressed patients. The symptoms

Apêndice IV – Trabalhos publicados no período do doutorado



EXPERIMENTAL THERAPEUTICS



Therapeutic Efficacy of a Mixed Formulation of Conventional and PEGylated Liposomes Containing Meglumine Antimoniate, Combined with Allopurinol, in Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*

Cristiano C. P. dos Santos,^a Guilherme S. Ramos,^a Renata C. De Paula,^b Karen F. Faria,^b Paulo O. L. Moreira,^b Ramon A. Pereira,^d Maria N. Melo,^c Wagner L. Tafuri,^d Cynthia Demicheli,^e Raul R. Ribeiro,^f Eryl G. Azevedo,^g Rubens Do Monte-Neto,^h Sydnei M. Da Silva,^b Frédéric Frézard^a

^aDepartamento de Fisiologia e Biofísica-ICB, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^bInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^cDepartamento de Parasitologia-ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^dDepartamento de Patologia-ICB, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^eDepartamento de Química-CEX, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^fDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^gDepartamento de Farmácia, UFJF, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil

^hInstituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz–Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT The treatment of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* using meglumine antimoniate (MA) encapsulated in conventional liposomes (LC) in association with allopurinol has been previously reported to promote a marked reduction in the parasite burden in the main infection sites. Here, a new assay in naturally infected dogs was performed using a novel liposome formulation of MA consisting of a mixture of conventional and long-circulating (PEGylated) liposomes (LCP), with expected broader distribution among affected tissues of the mononuclear phagocyte system. Experimental groups of naturally infected dogs were as follows: LCP plus Allop, receiving LCP intravenously as 2 cycles of 6 doses (6.5 mg Sb/kg of body weight/dose) at 4-day intervals plus allopurinol at 30 mg/kg/12 h per os (p.o.) during 130 days (LCP+Allop); LC plus Allop, receiving LC intravenously as 2 cycles of 6 doses (6.5 mg Sb/kg/dose) plus allopurinol during 130 days (LC+Allop); Allop, treated with allopurinol only; and a nontreated control. Parasite loads were evaluated by quantitative PCR in liver, spleen, and bone marrow tissue and by immunohistochemistry in the ear skin, before treatment, just after treatment, and 4 months later. The LCP+Allop and LC+Allop groups, but not the Allop group, showed significant suppression of the parasites in the liver, spleen, and bone marrow 4 months after treatment compared to the pretreatment period or the control group. Only LCP+Allop group showed significantly lower parasite burden in the skin in comparison to the control group. On the basis of clinical staging and parasitological evaluations, the LCP formulation exhibited a more favorable therapeutic profile than the LC one, being therefore promising for the treatment of canine visceral leishmaniasis.

KEYWORDS PEG, allopurinol, antimony, dogs, drug delivery, drug resistance, liposomes, meglumine antimoniate, visceral leishmaniasis

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease caused by obligatory intracellular protozoa of the *Leishmania donovani* complex. It is fatal if left untreated in over 95% of cases. An estimated 50,000 to 90,000 new cases of VL occur worldwide each year. Most cases occur in Brazil, East Africa, and Southeast Asia. The parasite is

Citation dos Santos CCP, Ramos GS, De Paula RC, Faria KF, Moreira PO, Pereira RA, Melo MN, Tafuri WL, Demicheli C, Ribeiro RR, Azevedo EG, Do Monte-Neto R, Da Silva SM, Frézard F. 2020. Therapeutic efficacy of a mixed formulation of conventional and PEGylated liposomes containing meglumine antimoniate, combined with allopurinol, in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00234-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00234-20>

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Frédéric Frézard, frézard@icb.ufmg.br.

Received 4 February 2020

Returned for modification 23 February 2020

Accepted 8 April 2020

Accepted manuscript posted online 13 April 2020

Published 23 June 2020

Antileishmanial metallodrugs and the elucidation of new drug targets linked to post-translational modifications machinery: pitfalls and progress

Rubens Lima do Monte Neto^{1/+}, Paulo Otávio Lourenço Moreira¹, Alessandra Mara de Sousa¹, Miguel Antonio do Nascimento Garcia², Suellen Rodrigues Maran², Nilmar Silvio Moretti^{2/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto René Rachou, Grupo de Pesquisas em Biotecnologia Aplicada ao Estudo de Patógenos, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos, São Paulo, SP, Brasil

Despite the increasing number of manuscripts describing potential alternative antileishmanial compounds, little is advancing on translating these knowledges to new products to treat leishmaniasis. This is in part due to the lack of standardisations during pre-clinical drug discovery stage and also depends on the alignment of goals among universities/research centers, government and pharmaceutical industry. Inspired or not by drug repurposing, metal-based antileishmanial drugs represent a class that deserves more attention on its use for leishmaniasis chemotherapy. Together with new chemical entities, progresses have been made on the knowledge of parasite-specific drug targets specially after using CRISPR/Cas system for functional studies. In this regard, *Leishmania* parasites undergo post-translational modification as key regulators in several cellular processes, which represents an entire new field for drug target elucidation, once this is poorly explored. This perspective review describes the advances on antileishmanial metallodrugs and the elucidation of drug targets based on post-translational modifications, highlighting the limitations on the drug discovery/development process and suggesting standardisations focused on products addressed to who need it most.

Key words: *Leishmania* - metallodrugs - antileishmanial - target elucidation - post-translational modifications

Experimental Parasitology 242 (2022) 108367



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

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



Changes in antiparasitical activity of gold nanorods according to the chosen synthesis

Anna Carolina Pinheiro Lage^{a,b,*}, Luiz Orlando Ladeira^c, Paulo Henrique Fonseca do Camo^d, Juliana Mendes Amorim^a, Rubens Lima Monte-Neto^b, Daniel Assis Santos^d, Luiza Guimarães Tunes^b, Rachel Oliveira Castilho^a, Paulo Otávio Moreira^b, Daniele Cristina Ferreira^a, Diego Edison Lopez Silva^e, André Augusto Gomes Faraco^a

^a Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

^b Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz Minas, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte, 30190-009, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

^d Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

^e Laboratório de Caracterização e de Processamento de Nanomateriais, LCFWano, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Gold nanorods
Green synthesis
Polyphenols
Leishmaniasis
Dermatophytes

ABSTRACT

Gold nanorods (GNRs) are increasingly being studied for diagnostic and therapeutic purposes. Green synthesis based methods with natural compounds as additives stand out as a hope in terms of better synthesis methodology, with advantages of producing potentially less toxic and, perhaps, biologically active GNRs due to influence of natural additives used during synthesis. Exploring green chemistry using different natural phenolic compounds, the present work reveals different *in vitro* activity of GNRs evaluated against different parasites that causes skin infectious diseases compared to GNRs produced by conventional seed mediated method. This approach brings advantages in producing active GNRs, with ease calling, less cytotoxic and with a better selectivity index (SI) than GNRs synthesized by conventional seed mediated synthesis, opening new possibilities for therapies. Natural compounds used in green syntheses were gallic acid (GA), resveratrol (RSV) and a purified fraction of the hydroalcoholic extract of *Stypladenoson obovatum*. GNRs exhibited great activity against *Leishmania braziliensis*, and the dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale* and *Microporum gypseum*. The anti-Leishmaniasis and antidermatophytic activity of GNRs reinforce the applicability of GNRs in biomedical field and the influence of synthesis method in biological activity, showing benefits related to the seedless synthesis with natural compounds. In addition, these preliminary results indicate the possibility of exploring at maximum the physical and chemical properties of GNRs in addition to the biological activity itself, such as the development of topical antiparasitic formulations for association with phototherapy.



β -Carboline Glucoalkaloids from *Psychotria cupularis* and Evaluation of Their Antileishmanial Activity

Ivan Martins Barreto^{1,2} · Paulo Otávio Lourenço Moreira³ · Guadalupe Edilma Licona de Macedo⁴ · Daniela Nabak Bueno Maia² · Tânia Maria de Almeida Alves² · Djalma Menezes de Oliveira¹ · Betania Barros Cota²

Received: 13 August 2021 / Accepted: 17 September 2021 / Published online: 12 November 2021
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2021

Abstract

Purification of the crude ethanol extracts from leaves and stems of *Psychotria cupularis* (Müll.Arg.) Standl., Rubiaceae, resulted in the isolation of the known monoterpene indole alkaloids ophiorine B and lyalosidic and strictosidinic acids. The antileishmanial activity values found for the isolated compounds highlighted ophiorine B as the most active against *Leishmania (Viannia) braziliensis* (IC₅₀ 100.50 µg/ml or 196.1 µM) and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IC₅₀ 3.69 µg/ml or 7.2 µM) with a selectivity index of 108.6 to the human acute monocytic leukemia THP-1 cells. To the best of our knowledge, this is the first time that antileishmanial β -carboline glucoalkaloids were isolated from the studied material plant, contributing to the pharmacological potential of the genus.

Keywords Neglected tropical disease · Ophiorine alkaloids · Spectroscopic data · *Leishmania* · Intracellular amastigote assay · Cytotoxic assay

Leishmania amazonensis from distinct clinical forms/hosts has polymorphisms in Lipophosphoglycans, displays variations in immunomodulatory properties and, susceptibility to antileishmanial drugs

Felipe D. Rêgo¹ | Camila d. A. Cardoso¹ | Paulo Otávio L. Moreira¹ |
Paula M. Nogueira¹ | Márcio S. Araújo¹ | Valéria Matos Borges² | Márcia D. Laurenti³ |
Daniella C. Bartholomeu⁴ | Alexandre B. Reis⁵ | Rubens L. d. Monte-Neto¹ |
Rodrigo P. Soares¹ 

¹Biotechnology Applied to Pathogens (BAP), Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, MG, Brazil

²Laboratory of Inflammation and Bioarkers, Instituto Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brazil

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

⁴Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brazil

Correspondence

Felipe D. Rêgo and Rodrigo P. Soares, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, MG, Brazil.
Email: felipedutra04@hotmail.com and rodrigosoares28@hotmail.com

Funding Information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 155839/2018-7, 302972/2019-6, 308817/2021-4; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Grant/Award Number: PPM-XII 00202-18; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2020/05388-0, 2021/01243-0

Abstract

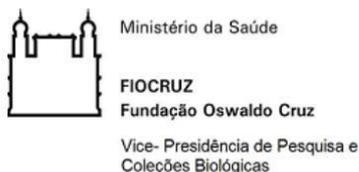
Lipophosphoglycan (LPG), the major *Leishmania* glycoconjugate, induces pro-inflammatory/immunosuppressive innate immune responses. Here, we evaluated functional/biochemical LPG properties from six *Leishmania amazonensis* strains from different hosts/clinical forms. LPGs from three strains (GV02, BA276, and LV79) had higher pro-inflammatory profiles for most of the mediators, including tumor necrosis factor alpha and interleukin 6. For this reason, glycoconjugates from all strains were biochemically characterized and had polymorphisms in their repeat units. They consisted of three types: type I, repeat units devoid of side chains; type II, containing galactosylated side chains; and type III, containing glucosylated side chains. No relationship was observed between LPG type and the pro-inflammatory properties. Finally, to evaluate the susceptibility against antileishmanial agents, two strains with high (GV02, BA276) and one with low (BA336) pro-inflammatory activity were selected for chemotherapeutic tests in THP-1 cells. All analyzed strains were susceptible to amphotericin B (AmB) but displayed various responses against miltefosine (MIL) and glucantime (GLU). The GV02 strain (canine visceral leishmaniasis) had the highest IC₅₀ for MIL (3.34 μM), whereas diffuse leishmaniasis strains (BA276 and BA336) had a higher IC₅₀ for GLU (6.87–12.19 mM). The highest IC₅₀ against MIL shown by the GV02 strain has an impact on clinical management. Miltefosine is the only drug approved for dog treatment in Brazil. Further studies into drug susceptibility of *L. amazonensis* strains are warranted, especially in areas where dog infection by this species overlaps with those caused by *Leishmania infantum*.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. Cell Biology International published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Federation of Cell Biology.

ANEXOS

Anexo I – Licença LW59/19



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-59/19

Certificamos que o protocolo (P-42/19-2), intitulado "Avaliação da eficácia da Leishmanização utilizando *Leishmania infantum* knock-out para o gene KHARON1 contra a Leishmaniose Visceral em hamster *Mesocricetus auratus*", sob a responsabilidade de RUBENS LIMA DO MONTE NETO, 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 exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 25/11/2021 e inclui o uso total de :

Mesocricetus auratus

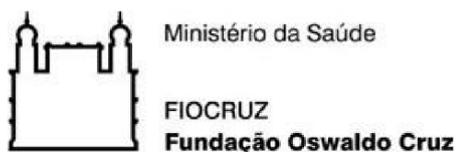
- 24 Machos de Golden, Idade: 2 Mes(es), Peso: 70,0000 Grama(s).
- 24 Fêmeas de Golden, Idade: 2 Mes(es), Peso: 70,0000 Grama(s).

Mesocricetus auratus

- 70 Machos de Golden, Idade: 2 Mes(es), Peso: 70,0000 Grama(s).
- 70 Fêmeas de Golden, Idade: 2 Mes(es), Peso: 70,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 25 de novembro de 2019

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA



Vice-Presidência de Pesquisa e
Coleções Biológicas - VPPCB



TERMO ADITIVO AO CERTIFICADO DA LICENÇA Nº LW-59/19 (P-42/19.2)

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Fiocruz, em atenção à solicitação do Dr. **RUBENS LIMA DO MONTE NETO** autoriza o presente aditivo, conforme solicitação do proponente, via e-mail, de 04 de outubro de 2021.

1. Prorrogação da licença pelo período de 12 meses;
2. Inclusão de 168 *Mus musculus* BALB/c.

Este aditivo tem validade até 25 de novembro de 2022.

Rio de Janeiro, 04 de outubro de 2021.



Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/Fiocruz

Anexo II – Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE
FEDERAL DE
OURO PRETO

UFOP

PROPP - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética
no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da eficácia da Leishmanização utilizando Leishmania infantum knock-out para o gene KHARON1 contra a Leishmaniose Visceral em hamster Mesocricetus auratus", protocolada sob o CEUA nº 5469240222 (ID 000723), sob a responsabilidade de **Bruno Mendes Roatt e equipe; GABRIEL JOSE LUCAS MOREIRA; Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso; Thais Lopes Valentim di Paschoale Ostolin; Miriã Rodrigues Gusmão; Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 18/03/2022.

We certify that the proposal "Evaluation of the effectiveness of Leishmanization using Leishmania infantum KHARON1 knock-out parasites against Visceral Leishmaniasis in hamster Mesocricetus auratus", utilizing 188 Hamsters (males and females), 168 Isogenics mice (168 females), protocol number CEUA 5469240222 (ID 000723), under the responsibility of **Bruno Mendes Roatt and team; GABRIEL JOSE LUCAS MOREIRA; Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso; Thais Lopes Valentim di Paschoale Ostolin; Miriã Rodrigues Gusmão; Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 03/18/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2022** a **10/2022**

Área: **Ciências Biológicas**

Origem:	Animais provenientes de outros projetos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 6 semanas	N:	188
Espécie:	Hamsters						
Linhagem:	Mesocricetus auratus				Peso:	40 a 60 g	
Origem:	Animais provenientes de outros projetos	sexo:	Fêmeas	idade:	4 a 8 semanas	N:	168
Espécie:	Camundongos isogênicos						
Linhagem:	Mus musculus BALB-C				Peso:	18 a 22 g	

Local do experimento: Laboratório de Imunopatologia (LIMP/UFOP).

Ouro Preto, 18 de março de 2022

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto