

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Gabrielle Ariadine Bento

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE FATORES DE VIRULÊNCIA
RELACIONADOS A N-GLICOSILAÇÃO EM *Leishmania*

Belo Horizonte

Março de 2023

Gabrielle Ariadine Bento

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE FATORES DE VIRULÊNCIA
RELACIONADOS A N-GLICOSILAÇÃO EM *Leishmania***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Parasitologia da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do título de
Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniella Castanheira
Bartholomeu

Coorientadora: Dr.^a Mariana Santos Cardoso

Belo Horizonte

Março de 2023

043

Bento, Gabrielle Ariadine.

Caracterização funcional de fatores de virulência relacionados a N-glicosilação em *Leishmania* [manuscrito] / Gabrielle Ariadine Bento. – 2023.
156 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniella Castanheira Bartholomeu. Coorientadora:
Dr.^a Mariana Santos Cardoso.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Leishmania*. 3. Glicosilação. 4. Fatores de Virulência. 5. Proteína 9 Associada à CRISPR. I. Bartholomeu, Daniella Castanheira. II. Cardoso, Mariana Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

TESE 341/2023/03

TÍTULO DA TESE: "CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS A N-GLICOSILAÇÃO EM LEISHMANIA"

ALUNA: GABRIELLE ARIADINE BENTO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **treze de março de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Jacqueline Araújo Fiúza

Membro externo - IRR/FIOCRUZ

Patrícia Flávia Quaresma

Membro externo - UFSC

Paula Monalisa Nogueira

Membro externo - IRR/FIOCRUZ

Thiago de Castro Gomes

Membro interno - UFMG

Mariana Santos Cardoso

Coorientadora - UFMG

Daniella Castanheira Bartholomeu

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 13 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Castanheira Bartholomeu, Professora do Magistério Superior**, em 15/03/2023, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Araujo Fiuza, Usuário Externo**, em 15/03/2023, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Monalisa Nogueira, Usuário Externo**, em 15/03/2023, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Flavia Quaresma, Usuária Externa**, em 16/03/2023, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Santos Cardoso, Professora do Magistério Superior**, em 16/03/2023, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago de Castro Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 20/03/2023, às 20:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2115170** e o código CRC **B8C4273B**.

Dedico este trabalho aos meus pais José
Raimundo Bento e Izabel Maria Bento

Agradecimentos:

Gostaria de iniciar agradecendo a oportunidade que me foi concedida de fazer parte do melhor Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Brasil, me orgulho muito desse título de Parasitologista e me vejo em todas as áreas de atuação, não só na minha área de concentração que é Protozoologia, mas também na Helminologia, na Entomologia e no campo. Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, agradeço de maneira muito sincera por todos esses anos, por receber um tratamento humanizado, cordial e afetuoso, sem distinção entre os membros, uma característica muito marcante do PPGPAR. Desenvolver um trabalho de doutorado nunca foi algo trivial, e menos ainda em tempos tão obscuros e de pandemia, sendo assim esse apoio se torna fundamental.

Ao suporte financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o curso de doutorado, por conceder a extensão da bolsa e do prazo de término do curso durante a pandemia.

Pelo suporte administrativo de Sibebe e Sumara, sempre muito importante para o correto andamento das atividades da pós-graduação.

Agradeço ainda a todos os que colaboraram de maneira direta ou indireta na realização deste trabalho em especial, a Dra. Luísa Magalhães, Dra. Viviane Silva, Dr. Lucas Lorenzon, Dra. Ângela Cruz, Dr. Fabrício Silva, Msc. Raquel Martins, Dr. Adalberto Filho, Msc. Laila Viana e Dr. Rodrigo Soares. Aos colegas e amigos do laboratório e da pós-graduação, à Michele Matos e à Vanessa Fraga pelo apoio técnico, sem o qual seria inviável o funcionamento do laboratório.

Às minhas orientadoras Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu e Dra. Mariana Santos Cardoso por tamanha compreensão, por estarem sempre dispostas a fazer o melhor para a realização deste trabalho, mesmo diante dos desafios, das atribuições do dia a dia, seguimos firmes. Muito obrigada por tudo, por todos os ensinamentos e orientação durante esses anos.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho e por todas as contribuições que vierem.

Por último, agradeço a minha família e amigos por todo carinho, apoio, por acreditarem em mim, por me ouvirem e estarem sempre ao meu lado.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, em breve estarás fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

Resumo

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que dependem da espécie de *Leishmania* causadora da doença e da resposta imune do hospedeiro. No entanto, a compreensão acerca das adaptações específicas das diferentes espécies de *Leishmania*, responsáveis pela virulência e tropismo dos parasitos, ainda é limitada. Vários estudos têm demonstrado que glicanos são importantes fatores que medeiam diversas interações *Leishmania*-hospedeiros, sendo, portanto, um interessante objeto de estudo para melhor compreensão da biologia do parasito. Análises de genômica comparativa entre as espécies de *Leishmania*, realizadas anteriormente em nosso grupo, revelaram que alguns genes envolvidos na biossíntese de glicanos estão ausentes em *L. tarentolae*, uma espécie não infecciosa para mamíferos. Análises de citometria de fluxo corroboraram esses achados *in silico*. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização funcional de dois genes associados ao processo de glicosilação em *Leishmania*. Dentre as espécies avaliadas na genômica comparativa, um gene foi selecionado por estar ausente apenas em *L. tarentolae* (LbrM2903_340062700), enquanto outro está ausente em *L. braziliensis* e *L. tarentolae* (LINF_120006700). Os níveis de expressão de mRNA desses genes foram quantificados por RT-qPCR em promastigotas e amastigotas axênicas e intracelulares de *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tarentolae*. O gene LbrM2903_340062700 apresentou maior nível de expressão nas formas promastigotas de *L. braziliensis* e, como esperado, nenhuma expressão foi detectada em *L. tarentolae*. Para LINF_120006700, os resultados de expressão confirmaram a ausência do gene em *L. braziliensis* e *L. tarentolae*, e revelaram maiores níveis de expressão em formas amastigotas de espécies viscerotrópicas. Foram gerados mutantes de *L. braziliensis* pela deleção do gene LbrM2903_340062700, usando a técnica de edição de genomas *CRISPR-Cas9*, e o *knock-in* do gene LINF_120006700. A obtenção dos parasitos mutantes foi confirmada por PCR convencional e por RT-qPCR. Dados obtidos através de citometria de fluxo e eletroforese de carboidratos marcados por fluoróforos (FACE) sugerem um possível fenótipo associado a vias alternativas de transferência de manose para a superfície do parasito nos clones *knockout*. As análises da expressão de mRNA de outros genes relacionados à via de *N*-glicosilação em parasitos mutantes e selvagens reforçam esta hipótese. Espera-se que este trabalho possa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de infecção de *Leishmania* e essas enzimas selecionadas possam ser bons candidatos a alvos terapêuticos.

Palavras-chave: *Leishmania*, glicosilação, *CRISPR-Cas9*, parasitos mutantes, fatores de virulência.

Abstract

Leishmaniasis presents a wide range of clinical manifestations depending on the *Leishmania* species that causes the disease and the host immune response. However, the understanding of the species-specific adaptations responsible for parasite virulence and tropism is still limited. Several studies have shown that glycans are important factors that mediate several *Leishmania*-host interactions, being, therefore, an interesting object of study for a better understanding of the biology of the parasite. Comparative genomic analysis among *Leishmania* species, previously performed by our group, revealed that some genes involved in glycan biosynthesis are absent in *L. tarentolae*, a non-infective species for mammals. Flow cytometric analysis corroborated these *in silico* findings. Thus, the aim of this work was to carry out the functional characterization of two genes associated with the glycosylation process in *Leishmania*. Among the species evaluated in comparative genomics, one gene was selected for being absent only in *L. tarentolae* (LbrM2903_340062700), while another is absent in *L. braziliensis* and *L. tarentolae* (LINF_120006700). The mRNA expression levels of these genes were quantified by RT-qPCR in promastigotes and axenic and intracellular amastigotes of *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum* and *L. tarentolae*. The gene LbrM2903_340062700 presented a higher expression level in the promastigotes in *L. braziliensis* and as expected, no expression was detected in *L. tarentolae*. For LINF_120006700, expression results confirmed the absence of the gene in *L. braziliensis* and *L. tarentolae*, revealed higher expression levels in amastigotes of the viscerotropic species. Mutants of *L. braziliensis* were generated by deleting the LbrM2903_340062700 gene, using CRISPR-Cas9 genome editing technique, and knock-in the LINF_120006700 gene. The mutant parasites were confirmed by conventional PCR and by RT-qPCR. Flow cytometry and fluorophore-labeled carbohydrate electrophoresis (FACE) assays suggest a possible phenotype associated with alternative pathways to transfer mannose residues to the parasite surface in knockout clones. Analyses of mRNA expression of other genes related to the *N*-glycosylation in mutant and wild-type parasites reinforce this hypothesis. We hope that this work can contribute to a better understanding of the mechanisms of *Leishmania* infection and that these enzymes may be good candidates for therapeutic interventions.

Keywords: *Leishmania*, glycosylation, CRISPR-Cas9, mutant parasites, virulence factors.

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida de espécies do gênero <i>Leishmania</i>. Fonte: (MULE et al., 2020).	20
Figura 2: Representação esquemática de glicoconjugados em <i>Leishmania</i> spp. Fonte: (MULE et al., 2020).	29
Figura 3: Via de biossíntese da <i>N</i>-glicosilação na membrana do retículo endoplasmático no eucarioto <i>S. cerevisiae</i>. Fonte: (LARKIN, IMPERIALI, 2011)...	34
Figura 4: Agrupamento hierárquico aglomerativo baseado na presença ou ausência de reações metabólicas em tripanossomatídeos.	65
Figura 5: Comparação de regiões genômicas de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> contendo genes codificadores de enzimas da via de biossíntese de glicanos. (MENDES, 2015).	67
Figura 6: Quantificação da fluorescência derivada da marcação de glicoproteínas de superfície de formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>Leishmania</i> com a lectina ConA. (MENDES, 2015).	70
Figura 7: Intensidade média de fluorescência de parasitos marcados com a lectina Concanavalina A de <i>Canavalia Ensiformes</i>. (MENDES, 2015).	71
Figura 8: Representação esquemática da via de <i>N</i>-glicosilação em parasitos do gênero <i>Leishmania</i>. Adaptado de Mule et al. (2020).	73
Figura 9: Análise da expressão diferencial de RNA dos genes α-1,2-manosiltransferase Alg11 e Alg9 em formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i>, <i>L. donovani</i>, <i>L. infantum</i> e <i>L. tarentolae</i>.	77
Figura 10: Geração de parasitos <i>knockouts</i> do gene LbrM2903_340062700 em <i>L. braziliensis</i>.	79
Figura 11: Geração de parasitos mutantes de <i>L. braziliensis knock-in</i> do gene LINF_120006700.	81
Figura 12: Análise dos níveis de expressão de mRNA dos genes LbrM2903_340062700 (Alg11) e LINF_120006700 (Alg9) em parasitos mutantes e <i>wild type</i> nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> M2903.	83
Figura 13: Curva de crescimento de <i>L. braziliensis</i> (M2903) Cas9⁺ e dos clones <i>knockout</i> para o gene LbrM2903_340062700.	84
Figura 14: Curva de crescimento de <i>L. braziliensis</i> M2903 <i>wild type</i> e dos clones <i>knock-in</i> do gene LINF_120006700.	85
Figura 15: Imagens representativas de células THP-1 infectadas com <i>L. braziliensis</i> M2903 CAS9⁺ e clones 1, 2 e 4 <i>knockouts</i> para o gene LbrM2903_340062700 (Alg11).	87

Figura 16: Avaliação da infectividade dos parasitos <i>knockout</i> para o gene LbrM2903_340062700 (Alg11)..	88
Figura 17: Imagens representativas de células THP-1 infectadas com <i>L. braziliensis</i> M2903 <i>wild type</i> e clones 1, 2 e 3 <i>knock-in</i> do gene LINF_120006700 (Alg9)..	89
Figura 18: Avaliação da infectividade dos parasitos <i>knock-in</i> do gene LINF_120006700 (Alg9)..	90
Figura 19: Quantificação da fluorescência derivada da marcação de glicoproteínas de superfície com a lectina ConA de formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. braziliensis knockout</i> para o gene Alg11..	92
Figura 20: Quantificação de carboidratos (resíduos de α -D-manose e α -D-glicose) na superfície dos parasitos <i>L. braziliensis Cas9+</i> e <i>knockout</i> para o gene LbrM2903_340062700..	93
Figura 21: Perfil de monossacarídeos (manose e galactose) de parasitos mutantes para o gene LbrM2903_340062700 e <i>L. braziliensis M2903 Cas9+</i> ..	94
Figura 22: Análise da expressão dos genes relacionados à via de N-glicosilação em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> ..	97
Figura 23: Análise da expressão dos genes relacionados à via de N-glicosilação em parasitos <i>knockouts</i> para o gene LbrM2903_340062700 (Alg11) e <i>L. braziliensis M2903 Cas9</i> ..	99
Figura 24: Análise da expressão dos genes relacionados à via de N-glicosilação em parasitos <i>knock-in</i> do gene LINF_120006700 (Alg9) e <i>L. braziliensis M2903 wild type</i> ..	101

Lista de tabelas

Tabela 1: Proteomas preditos baseados nos genomas de 17 espécies de tripanossomatídeos. Fonte: (MENDES, 2015)	44
Tabela 2: Iniciadores utilizados para avaliar a expressão gênica dos genes selecionados	52
Tabela 3: Iniciadores utilizados para <i>knockout</i> do gene LbrM2903.34_0062700 e confirmação do <i>knockout</i> em <i>L. braziliensis</i> M2903	54
Tabela 4: Iniciadores utilizados para o <i>knock-in</i> do gene LINF_120006700 e confirmação da integração da construção em <i>L. braziliensis</i> M2903.....	56
Tabela 5: Identificação <i>in silico</i> dos genes envolvidos na via de <i>N</i>-glicosilação de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	74

Lista de abreviaturas e siglas

A2	Proteína específica de formas amastigotas
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i>
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (<i>Biochemical oxygen demand</i>)
cas9	Proteína associada ao CRISPR 9
cDNA	DNA complementar
C3b	Produto da clivagem de C3
ConA	Concanavalina A
CRISPR Interespaçadas	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECAAC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GenBank	banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos publicamente disponíveis
GIPLs	Glicosilfosfatidilinositóis
GPIs	Glicoinositolfosfolipídios
gp63	Glicoproteína 63
<i>GS linker</i>	Ligante de domínios de proteínas glicina-serina
HA	Hemaglutinina do vírus influenza humano
Hsp100	Proteína de choque térmico 100
iNOS	Óxido nítrico sintase
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13

KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo difusa
LDPK	Leishmaniose dérmica pós-kalazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPGs	Lipofosfoglicanos
LV	Leishmaniose visceral
MATLAB	<i>MATrix LABoratory software</i>
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end joining</i>
mRNA	RNA mensageiro
NK	Células exterminadoras naturais
NO	<i>Nitric oxide</i> /Óxido nítrico
nt	Nucleotídeos
PBS	Phosphate buffered saline /Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase
PHYLIP	<i>PHYLogeny Inference Package</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPG	<i>Proteophosphoglycan</i> / Proteofosfoglicano
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RAVEN Toolbox	<i>Reconstruction, Analysis and Visualization of Metabolic Networks</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNA Pol I	RNA polimerase I
RNA Pol III	RNA polimerase III
RNA Pol T7	Polimerase de RNA do bacteriófago T7
sAPs	Fosfatases ácidas secretórias
SbIII	Antimonial trivalente

SbV	Antimonial pentavalente
sgRNA	RNA guia
STI1	Co-chaperona Sti1/Hop, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with 0.1% Tween® 20 detergent</i>
TGFβ1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
Th1	Linfócitos T CD4+ (T helper 1)
Th2	Linfócitos T CD4+ (T helper 2)
TrytripDB	<i>Kinetoplastid Informatics Resources</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Leishmanioses.....	19
1.2. Fatores de virulência do parasito.....	25
1.3. Mecanismos de glicosilação em <i>Leishmania</i>	32
1.4. Estudos da função gênica em <i>Leishmania</i>	36
2. JUSTIFICATIVA.....	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Seleção dos alvos.....	43
4.2. Análise <i>in silico</i> de genes da via de <i>N</i> -glicosilação de <i>Leishmania</i>	45
4.3. Cultura de parasitos.....	46
4.4. Citometria de fluxo de parasitos marcados com lectina	47
4.5. Extração de DNA.....	48
4.6. Extração de RNA.....	49
4.7. Tratamento do RNA com Dnase	50
4.8. Transcriptase reversa	51
4.9. RT-qPCR	51
4.10. Geração de parasitos <i>knockouts</i> e deleção gênica por edição de genoma pela técnica CRISPR/Cas9	53
4.11. Geração de <i>L. braziliensis</i> mutantes expressando a proteína LINf_120006700 (<i>Knock-in</i>).....	56
4.12. Purificação de formas promastigotas metacíclicas de <i>L. braziliensis</i> M2903.....	58
4.13. Ensaio de infecção <i>in vitro</i>	59
4.14. Curva de crescimento.....	60

4.15. Extração e purificação de GIPLs	60
4.16. Eletroforese de carboidratos marcados por fluoróforos (FACE)	61
4.17. Análise estatística	62
5. RESULTADOS	63
5.1. Seleção de genes que codificam enzimas envolvidas em reações metabólicas relacionadas ao processo de glicosilação em <i>Leishmania</i>	63
5.2. Quantificação de glicoconjugados na superfície de tripanossomatídeos por citometria de fluxo	68
5.3. Análises <i>in silico</i> dos genes envolvidos na via de <i>N</i> -glicosilação de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	72
5.4. Avaliação dos níveis de expressão de RNA dos genes Alg11 e Alg9 em formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i>	76
5.5. Deleção e expressão (<i>knock-in</i>) dos genes selecionados envolvidos no metabolismo de glicanos em <i>Leishmania</i>	78
5.6. Avaliação da expressão de mRNA dos genes selecionados em diferentes formas evolutivas de parasitos <i>wild-type</i> e mutantes de <i>L. braziliensis</i>	82
5.7. Perfil de crescimento de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> M2903 <i>wild type</i> e mutantes.....	84
5.8. Avaliação dos índices de infectividade <i>in vitro</i> de parasitos <i>wild type</i> e mutantes de <i>L. braziliensis</i> em células THP-1	86
5.9. Quantificação de glicosilação de glicoconjugados na superfície de parasitos <i>knockout</i> para o gene LbrM2903_340062700.....	91
5.10. Quantificação de monossacarídeos (manose e galactose) associados a GIPLs dos parasitos mutantes e <i>wild type</i> de <i>L. braziliensis</i>	94
5.11. Avaliação da expressão de mRNA dos genes relacionados a via de <i>N</i> -glicosilação em <i>Leishmania</i>	95
6. DISCUSSÃO.....	103
7. CONCLUSÃO	112
8. PERSPECTIVAS	113
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
Anexo 1: Mapas dos plasmídeos utilizados para geração do <i>knockout</i> do gene Alg11 em <i>L. braziliensis</i> M2903.....	151

Anexo 2: Mapa do plasmídeo utilizado para a expressão do gene Alg9 em <i>L. braziliensis</i> M2903.....	153
Anexo 3: Artigo 1: Evaluation of medullary cytokine expression and clinical and laboratory aspects in severe human visceral leishmaniasis.....	154
Anexo 4: Artigo 2: Draft Genome Sequence of the Protozoan Parasite <i>Leishmania braziliensis</i> Strain BA788, Isolated from a Clinical Case in Bahia State, Brazil	155

1. Introdução

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitos intracelulares da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (BAÑULS et al., 2007; AMEEN, 2010). No gênero *Leishmania*, já foram descritas 53 espécies, que estão distribuídas nos subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*, e no complexo *L. enriettii* e *Paraleishmania* (AKHOUNDI et al., 2016). Dentro dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, 31 espécies são conhecidas como parasitos de mamíferos e 20 são patogênicas para humanos (TSOKANA et al., 2014). Lainson e colaboradores subdividiram o gênero *Leishmania* em três seções, de acordo com o desenvolvimento intravetorial do parasito: Hipopilaria (*Sauroleishmania* se desenvolve no intestino posterior), Peripilaria (*L. (Viannia)* se desenvolve no intestino posterior e piloro) e Suprapilaria (*L. (Leishmania)* em que todo o desenvolvimento ocorre no intestino anterior) (LAINSON, SHAW., 1987; LAINSON et al., 1979).

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida heteroxênico (**Figura 1**). Inicialmente, formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas por fêmeas hematófagas de flebotomíneos infectados (ordem Diptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotomiidae) no local da picada na pele do hospedeiro mamífero. As formas promastigotas flageladas podem infectar inicialmente células não fagocíticas (CAVALCANTI-COSTA et al., 2019) e, posteriormente, células como macrófagos e neutrófilos (PETERS et al., 2008), associando-se a vacúolos parasitóforos, onde se transformam em formas amastigotas replicativas. Após sucessivos ciclos de divisão binária do parasito, as células infectadas se rompem, liberando as formas amastigotas, ou entram em apoptose, liberando corpos apoptóticos contendo o parasito que podem ser fagocitados por outros macrófagos, permanecendo na derme ou migrando para órgãos como fígado e baço no caso de formas viscerais ou serem ingeridas por flebotomíneos durante um novo repasto sanguíneo. No intestino médio destes insetos, as amastigotas são liberadas com o rompimento dos macrófagos e se transformam em promastigotas procíclicas, que apresentam alta capacidade replicativa (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Após 48-72 horas, promastigotas procíclicas diferenciam-se em promastigotas nectomonadas com reduzida capacidade replicativa. Estas

formas rompem a membrana peritrófica e migram para o intestino anterior, transformando-se em promastigotas leptomonadas que entram novamente em processos de divisão binária. Após sucessivos ciclos de divisão, o parasito migra e coloniza a válvula estomodeal do inseto vetor. Neste local, as promastigotas transformam-se em formas altamente infectivas, denominadas promastigotas metacíclicas (SACKS, 1989), que são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo. Pode ainda ocorrer um fenômeno denominado metaciclogênese reversa, em que as formas promastigotas retroleptomonadas se multiplicam rapidamente e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas após cada repasto sanguíneo, o que resulta na manutenção da infecção no vetor flebotomíneo (SERAFIM et al., 2018).

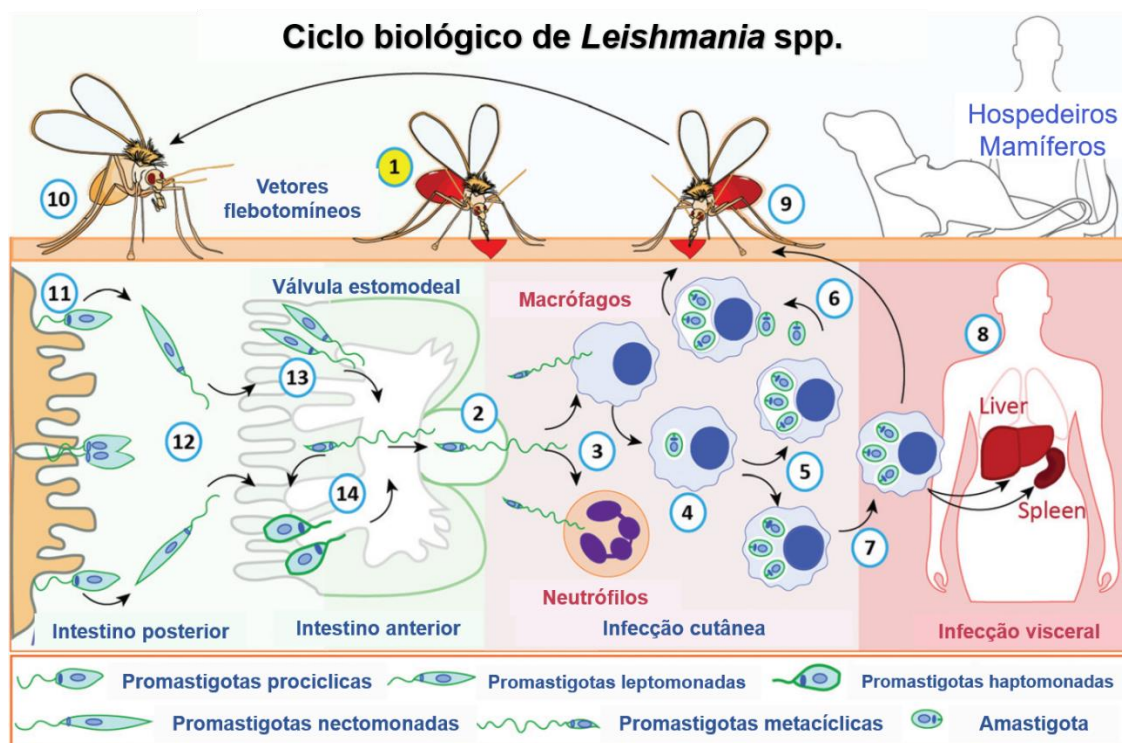


Figura 1: Ciclo de vida de espécies do gênero *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo (1, círculo amarelo), as fêmeas de flebotomíneos infectadas regurgitam, juntamente com os componentes da saliva, sangue contendo formas promastigotas metacíclicas (2) no hospedeiro mamífero. Essas formas flageladas são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos (3). Nos macrófagos, os parasitos se transformam em amastigotas infectantes (4), que se

multiplicam por fissão binária (5), levam ao rompimento das células hospedeiras, e infectam outras células vizinhas (6). Para espécies de *Leishmania* associadas à infecção visceral, diferentes órgãos podem ser atingidos, como fígado ou baço, por macrófagos infectados ou amastigotas liberadas (7), onde os parasitos se replicarão e estabelecerão a infecção (8). Quando um inseto flebotomíneo se alimenta de sangue de um hospedeiro mamífero infectado (9), células contendo amastigotas serão ingeridas. Dentro do intestino do inseto (10), amastigotas se transformarão em promastigotas procíclicas no intestino posterior (11), multiplicarão e migrarão (12) para o intestino médio anterior (válvula estomodeal) do inseto (13), onde se diferenciam em formas infectantes metacíclicas. As promastigotas metacíclicas que não são regurgitadas durante o repasto sanguíneo sofrem rediferenciação em promastigotas retro-leptomonas, que se replicam dentro do vetor, aumentando as promastigotas haptomonas aderidas ao intestino médio anterior do inseto (14). Fonte: (MULE et al., 2020).

Parasitos dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são capazes de causar um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose dérmica pós-kalazar (LDPK) (GONZÁLEZ et al., 2015).

No Velho Mundo (Norte da África, Mediterrâneo, Índia e Ásia Central), a LC é comumente causada por *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*. Por sua vez, no Novo Mundo (América Central e América do Sul), a LC pode ser causada por *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) venezuelensis* e também espécies do subgênero *Viannia*, como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) peruviana* (GONZÁLEZ et al., 2015).

No Novo Mundo, a LCD é associada à infecção por *L. (L.) amazonensis*. Metade das lesões cutâneas causadas por *L. (L.) mexicana* pode cicatrizar em até três meses, enquanto aquelas devidas à infecção por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* persistem por muito mais tempo e podem evoluir para LMC. Existem algumas evidências de que o componente genético do hospedeiro pode ter influência no desenvolvimento da doença

e suas manifestações, podendo variar entre assintomático, sintomático e anérgico (SILVEIRA et al., 2004).

L. (L.) infantum é a principal espécie causadora da LV no Oriente Médio, bacia do Mediterrâneo e América do Sul, e *L. (L.) donovani* é a principal espécie presente no subcontinente indiano e no leste da África associada a esta forma clínica (GONZÁLEZ et al., 2015). Esta última pode também causar lesões difusas maculo-papulares ou nodulares em pacientes tratados com sucesso para LV, que permanecem assintomáticos por meses e posteriormente desenvolvem uma forma secundária da doença resultante da proliferação dos parasitos na pele denominada LDPK (GONZÁLEZ et al., 2015). A LV é a forma sistêmica mais grave que geralmente é fatal caso não seja tratada (WHO,2010; MCGWIRE, SATOSKAR, 2014).

Estima-se que 700 mil a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorram anualmente devido à leishmaniose (WHO, 2018). De todas as manifestações clínicas, a LC é amplamente distribuída no mundo, sendo que dez países apresentam o maior número de casos: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Norte do Sudão, Costa Rica e Peru. Juntos, esses países respondem por 70 a 75% dos casos de LC em todo o mundo (ALVAR et al., 2012). Atualmente, 17 dos 18 países endêmicos das Américas notificaram à Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO) um total de 989.096 casos de LC e LMC durante o período 2001-2018, com uma média anual de 54.950 casos. Do total de casos em 2018, 84% foram notificados pelo Brasil (16.432), Colômbia (6.362), Peru (6.321), Nicarágua (3.722), Bolívia (3.127) e Venezuela (2.612) (PAHO, 2019).

A LV é endêmica em 12 países das Américas, onde 63.331 novos casos foram registrados de 2001 a 2018, com uma média de 3.518 casos por ano. Em 2018, do total de casos, 97% (3.466) foram relatados pelo Brasil e os demais registros ocorreram na Argentina, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Paraguai, Venezuela e Uruguai (PAHO, 2019).

Os cães domésticos são os principais reservatórios urbanos de *L. infantum*, tendo um papel importante na epidemiologia da LV (BANETH et al., 2008; BRASIL, 2006). O número de cães infectados na América do Sul é estimado em milhões, e altas taxas de infecção são relatadas, especialmente no Brasil, onde a elevada prevalência de infecção canina está associada a um alto risco de doença humana (BANETH et al., 2008; BRASIL, 2006; 2017).

Embora a soropositividade seja encontrada em 88-100% dos cães clinicamente afetados, ela é evidente em 30-66% dos animais infectados subclínicamente ou assintomáticos (MIRÓ et al., 2008).

O ciclo de transmissão dos parasitos do gênero *Leishmania* envolve flebotomíneos fêmeas infectadas, pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Estudos entomológicos mostraram que 70 de 900 espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Flebotomíneos) estão implicadas na transmissão das leishmanioses (SECCOMBE et al., 1993; YOUNG, DUNCAN., 1994; BRASIL et al., 2015). A distribuição das doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* é limitada pela distribuição dos vetores flebotomíneos e sua permissividade ao desenvolvimento do parasito (VOLF, MYSKOVA, 2007). No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da LV: *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora de *L. (L.) infantum* no Brasil (BRASIL, 2006). As principais espécies envolvidas na transmissão das formas cutâneas das leishmanioses são: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcomei* e *Lu. migonei* (BRASIL, 2007). Mudanças ambientais podem acarretar alterações no comportamento dos vetores da LC na América Latina, e essas mudanças têm se mostrado fundamentais para o estabelecimento de algumas espécies de *Lutzomyia* no ambiente doméstico, alterando assim o perfil epidemiológico da doença (MAROLI et al., 2013).

Apesar das intensas pesquisas, até o momento, não há vacinas licenciadas para uso humano (JOSHI et al., 2014; KEDZIERSKI, EVANS, 2014; VAKILI et al., 2018; ATAPOUR et al., 2021), apenas para uso canino. Três vacinas para cães (Leishmune, CaniLeish e Leish-Tec) foram registradas no Brasil e na Europa, e conferem 76-80%, 68,4% e 71,4% de proteção, respectivamente (BORJA-CABRERA et al., 2008; REGINA-SILVA et al., 2016; VELEZ et al., 2020). No entanto, somente a vacina Leish-Tec tem sido utilizada no Brasil, uma vez que a vacina Leishmune teve seu uso suspenso (MAPA, 2014). Estudos têm mostrado que a vacina CaniLeish apresenta a ocorrência de reatividade cruzada de anticorpos induzidos pela vacina e antígenos comumente utilizados no diagnóstico sorológico, impossibilitando a diferenciação entre cães imunizados e infectados e, além disso, não induz uma longa proteção (VELEZ et al., 2020). Uma alternativa utilizada no controle da leishmaniose em cães é o uso de coleiras tratadas com deltametrina, que quando

aplicadas sistematicamente a todos os cães, se mostraram eficazes em repelir o vetor flebotomíneo (GAVGANI et al., 2002).

Somado a esse cenário, o tratamento das leishmanioses é um grande desafio no controle dessa doença, devido à toxicidade dos medicamentos atualmente disponíveis, a disseminação da resistência às drogas utilizadas, os altos custos dos medicamentos menos tóxicos e as restrições socioeconômicas, que impossibilitam o acesso das pessoas infectadas ao diagnóstico e ao tratamento de qualidade (CROFT et al., 2006). O tratamento de primeira linha das leishmanioses é baseado em antimoniais pentavalentes (SbV) que são acessíveis, mas altamente tóxicos e sujeitos ao surgimento de resistência (SUNDAR, RAI, 2005). Esses medicamentos têm sido usados para o tratamento em muitos países há mais de 70 anos (CROFT et al., 2006), e requerem longos esquemas de utilização, o que fazem muitos pacientes abandonarem o tratamento, além de apresentarem altas taxas de falha (acima de 65%) (MUKHERJEE et al., 2013; MOHAPATRA, 2014). Outras drogas leishmanicidas disponíveis são: miltefosina, pentamidina, paromomicina e anfotericina B. Destes, a anfotericina B lipossomal é o mais eficiente, menos tóxica, mas apresenta um custo muito elevado, o que torna essa medicação inacessível para a maioria da população (SUNDAR, RAY, 2005).

Estudos anteriores mostraram que a resposta ao tratamento e a manifestação clínica das leishmanioses provavelmente dependem de interações complexas entre o sistema imune do hospedeiro e o parasito (SARAVIA et al., 2002; CALVOPINA et al., 2006; KAYE, SCOTT, 2011). Estudos em modelos animais e pacientes humanos estabeleceram que a resposta imune protetora contra as leishmanioses depende da indução de uma imunidade tipo 1 (MÜLLER et al., 1989; CARVALHO et al., 1992; ALEXANDER et al., 1999). Os antígenos dos parasitos estimulam a secreção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno para direcionar a diferenciação das células T helper 1 (Th1). IFN- γ e TNF- α de células Th1 e de células *natural killer* (NK), ativadas por IL-12, medeiam a ativação de macrófagos e a produção de óxido nítrico, que levam à resolução da doença (CUNNINGHAM., 2002). Por outro lado, uma resposta Th2, mediada por IL-4 e IL-13 e citocinas imunorreguladoras, como IL-10 e TGF β 1 e populações de células reguladoras, inibe a resposta Th1 e aumenta a susceptibilidade à infecção, permitindo a progressão da doença e a persistência do parasito no hospedeiro (SCHRIEFER et al., 2008, AMEEN., 2010). Portanto, as células da imunidade

adaptativa do hospedeiro desempenham dupla função durante a infecção, podendo favorecer a eliminação do parasito, promovendo então o estabelecimento de uma resposta imune protetora de longa duração, mas também podem favorecer a progressão e patogênese da doença (ELMAHALLAWY et al., 2021). Adicionalmente, fatores do parasito modulam a infectividade, a patogenicidade e a virulência, afetando o equilíbrio Th1/Th2 durante a infecção (MURRAY et al., 2005).

1.2. Fatores de virulência do parasito

Diversos estudos têm mostrado o papel e a importância de moléculas relacionadas à infecção de *Leishmania*, também chamadas de fatores de virulência, que possibilitam e favorecem o estabelecimento do parasitismo intracelular bem-sucedido, além da inibição da resposta imune do hospedeiro (CHANG, 1976; CHANG, 1990; NADERER et al., 2004; OKWOR, UZONNA, 2008; CONTRERAS et al., 2010; SHIO et al., 2012; OLIVIER et al., 2012; SILVA-ALMEIDA et al., 2012; BUXBAUM, 2013).

Os parasitos do gênero *Leishmania* sobrevivem em ambientes hidrolíticos severos, seja no intestino do inseto-vetor ou em fagolisossomos de macrófagos dos hospedeiros mamíferos, e ainda precisam evitar a lise mediada pelo sistema complemento antes da penetração na célula hospedeira (ZAMZE, 1991). Mudanças morfológicas e bioquímicas no metabolismo energético, degradação de proteínas, aumento ou diminuição da motilidade, tudo isso torna o parasito capaz de persistir e replicar-se dentro dos macrófagos de forma a estabelecer a infecção (BRANDONISIO et al., 2000; CONTRERAS et al., 2010). A diferenciação de promastigotas em amastigotas é um processo biológico essencial para a sobrevivência da *Leishmania* durante o seu ciclo de vida. Portanto, moléculas específicas de amastigotas desempenham papéis centrais na sobrevivência no hospedeiro mamífero, podendo ser consideradas importantes fatores de virulência (GUY, BELOSEVIC, 1993).

Entre os principais fatores de virulência de *Leishmania* estão as amastinas, que são um grupo de glicoproteínas presentes na superfície do parasito, codificadas por uma das maiores famílias multigênicas do gênero *Leishmania* (TEIXEIRA et al., 1994; WU et al., 2000; ROCHETTE et al., 2005). Essas proteínas são classificadas em quatro subfamílias α , β , γ e δ -amastinas (JACKSON, 2010) e têm sua expressão aumentada nas formas amastigotas

e no pH ácido (WU et al., 2000; COUGHLIN et al., 2000). As principais funções dessas proteínas estão relacionadas à invasão das células do hospedeiro, gerando uma resposta eficiente às mudanças de condições fisiológicas dentro dos macrófagos, podem também atuar como transportadores de membrana e estão entre as proteínas mais imunogênicas dentre as glicoproteínas de superfície (ROCHETTE et al., 2005; STOBER et al., 2006; RAFATI et al., 2006). Estudos realizados por De Paiva e colaboradores (2015) mostraram que parasitos *L. braziliensis* com expressão depletada de δ -amastinas, através de RNA de interferência (RNAi), apresentaram crescimento prejudicado durante a infecção *in vitro* e falharam completamente em produzir infecção *in vivo* em camundongos. Este fenótipo pôde ser revertido através da re-expressão de um gene de δ -amastina resistente a RNAi. Esse estudo reforçou o papel das amastinas como importantes fatores de virulência em *Leishmania* (DE PAIVA et al., 2015).

A família de genes A2 é outro grupo de fatores de virulência importantes em *Leishmania*. Esta família é representada por genes multicópias arranjados em tandem no cromossomo 22 (CHAREST et al., 1996), que codificam proteínas de 42 a 100 kDa compostas por 40 a 90 cópias de uma sequência repetitiva de dez aminoácidos (ZHANG et al., 1996), o que as torna altamente imunogênicas (CHAREST et al., 1994; GHEDIN et al., 1997). Estes genes foram identificados inicialmente em *L. donovani* e sua expressão é estágio-específica na forma amastigota (CHAREST et al., 1994; GUPTA et al., 2001). As proteínas dessa família são expressas em espécies de *Leishmania* relacionadas à forma visceral e ausentes em espécies relacionadas às formas cutâneas (ZHANG et al., 2003). A expressão do gene A2 é induzida por uma variedade de fatores de estresse (CHAREST et al., 1994; BARAK et al., 2005; MCCALL et al., 2010; GOSLINE et al., 2011; MCCALL et al., 2012) e está relacionada à sobrevivência dos parasitos em órgãos viscerais, bem como a resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (FERNANDES et al., 2012). Estudos funcionais utilizando amastigotas de *L. donovani* deficientes de proteínas A2 (ZHANG et al., 1997) mostraram que a ausência dessa família de proteínas afeta a sobrevivência dos parasitos em órgãos de camundongos infectados (ZHANG et al., 2001). Em outro estudo, ao induzir a expressão de uma proteína A2 de *L. donovani* em *L. major*, foram observados o aumento da sobrevivência dos parasitos no baço e em macrófagos residentes de órgãos viscerais e esplenomegalia (ZHANG et al., 2001). Portanto, esses estudos evidenciam que A2 está

envolvida na patologia da infecção da leishmaniose visceral causada por *L. donovani* e *L. infantum* (CHEN et al., 2000).

As proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs) também são consideradas importantes fatores de virulência de *Leishmania*. Estas moléculas com diferentes pesos moleculares atuam como chaperonas, auxiliando no dobramento de peptídeos sob condições de estresse, como choques de temperatura (FEDER et al., 1999). Membros dessa superfamília de proteínas são altamente conservados entre os parasitos da família Trypanosomatidae e são abundantemente expressos em todas as formas evolutivas de *Leishmania* (HOMBACH et al., 2014; KRÖBER-BONCARDI et al., 2020). Algumas HSPs já descritas em *Leishmania* são: HSP23 (ADAUI et al., 2020), HSP40 (MORALES et al., 2010), HSP70 (RICO et al., 1998; RAFATI et al., 2007), HSP83 (DAVI et al., 2010), HSP90 (WIESGIGL, CLOS, 2001; BIFELD et al., 2018) e HSP100 (KROBITSCH, CLOS, 1999). Mutações e variações nas HSPs podem afetar a sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero e podem estar relacionadas ao desenvolvimento de resistência a fármacos (SKEIKY et al., 1995; MORALES et al., 2010). Em seu estudo, Adai e colaboradores observaram alterações na sobrevivência de formas amastigotas dentro dos macrófagos após a deleção de HSP23 em *L. braziliensis* (ADAUI et al., 2020). Em contrapartida, ao deletar HSP70 em *L. infantum*, Carrión e colaboradores observaram um fenótipo atenuado, com baixa carga parasitária no fígado e baço, além de uma imunidade protetora contra *L. major* após o desafio em camundongos BALB/c (CARRIÓN et al., 2011).

A proteína de membrana do cinetoplasto-11 (*Kinetoplastid Membrane Protein-11*, KMP-11) é outra proteína relacionada à virulência de *Leishmania*. Esta proteína de membrana de 11 kDa foi encontrada em diferentes organismos da ordem Kinetoplastida e, portanto, denominada KMP-11 (STEBECK et al., 1995). Trata-se de uma proteína hidrofóbica, associada a lipofosfoglicanos (LPG), que tem funções imunorreguladoras (MOODY, 1993; JARDIM et al., 1995), sendo altamente antigênica para células T murinas e humanas (JARDIM et al., 1991; RUSSO et al., 1992), e possivelmente relacionada à regulação negativa da atividade iNOS e a indução da ativação alternativa em macrófagos infectados (GORDON, 2003). A KMP-11 tem sua expressão aumentada especificamente em formas promastigotas metacíclicas e amastigotas (MATOS et al., 2010), o que sugere sua participação na infecção dos hospedeiros mamíferos.

Outros importantes fatores de virulência encontrados em *Leishmania* são os glicoconjugados (**Figura 2**). Dois glicoconjugados muito importantes e abundantes na superfície de *Leishmania* são o glicosilfosfatidilinositol (GPI) e o glicoinositolfosfolípido (GIPL) (**Figura 2**) (MCCONVILLE et al., 1990; MCCONVILLE et al., 1991). Os GPIs e GIPLs são glicolípídeos de baixo peso molecular, que consistem em três a seis resíduos de sacarídeos ligados a um alquilacilfosfatidilinositol (ROSEN et al., 1989; MCCONVILLE et al., 1990; MCCONVILLE et al., 1991; SEVLEVER et al., 1991). Os GPIs atuam predominantemente como âncoras de proteínas na membrana plasmática dos organismos, formando uma densa camada protetora (MCCONVILLE, FERGUSON.,1993; DE MACEDO et al., 2003). Por sua vez, os GIPLs são encontrados em grandes quantidades em ambos os estágios do parasito, sendo identificado como o principal componente da superfície celular em amastigotas replicativas (MCCONVILLE, FERGUSON, 1993; MENDONCA-PREVIATO et al., 2008; NOVOZHILOVA, BOVIN, 2010; CABEZAS et al., 2015). Esses glicoconjugados estão envolvidos em importantes processos como adesão celular, ativação de receptores, endocitose, transdução de sinal e modulação da resposta imune do hospedeiro (MENDONCA-PREVIATO et al., 2008; TSAI et al., 2012).

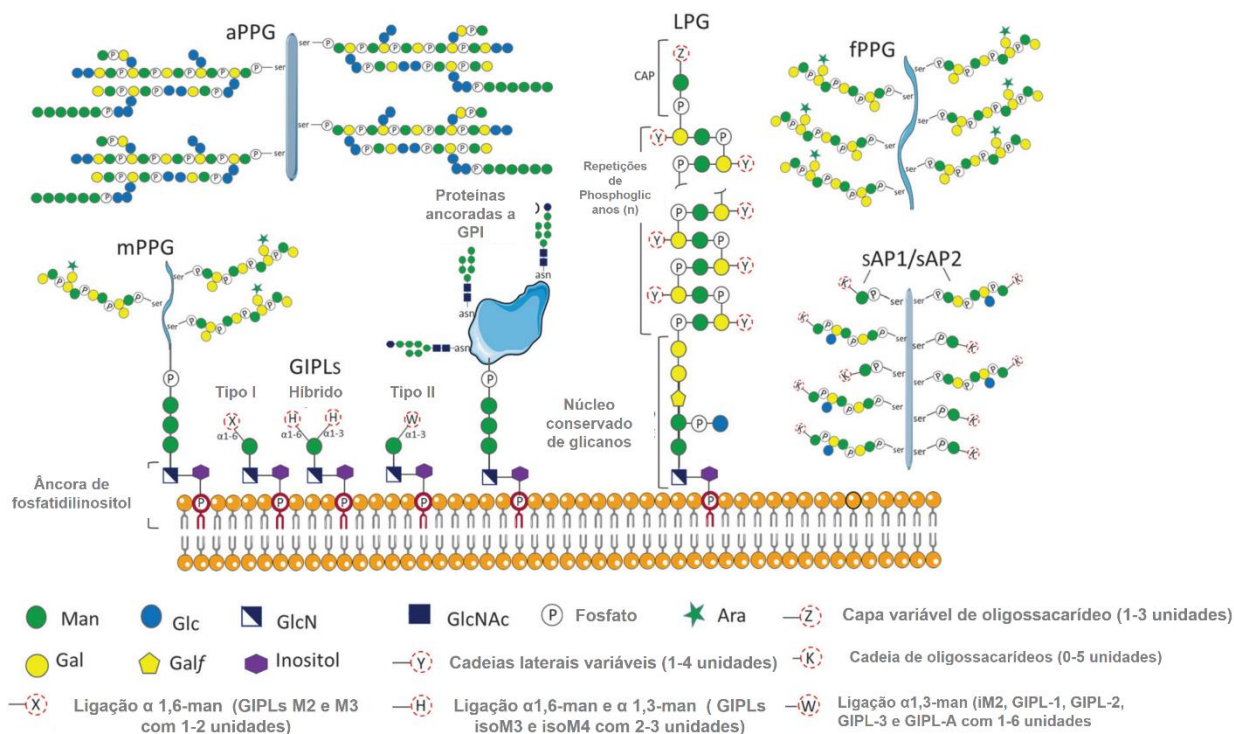


Figura 2: Representação esquemática de glicoconjugados em *Leishmania* spp. Os glicoconjugados incluem os lipofosfoglicanos (LPGs) ancorados por GPI, as proteínas de membrana (por exemplo, Gp63), e os glicoinositolfosfolipídeos de baixo peso molecular (GIPLs). Proteofosfoglicanos (PPGs) expressos predominantemente em formas promastigotas podem ser ligados à membrana (mPPGs), ou podem ser secretados (sAPs e fPPGs). Os aPPGs são estruturalmente diferentes e predominantemente expressos em formas amastigotas. Fonte: (MULE et al., 2020).

Os proteofosfoglicanos (PPGs) são outra classe de glicoconjugados que atuam como fatores de virulência, podendo existir como formas secretadas e ligadas à superfície em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (PIANI et al., 1999). PPG filamentososo (fPPG), PPG de membrana (mPPG) e as fosfatases ácidas secretadas (sAP) são sintetizadas em sua maior parte por formas promastigotas, enquanto o PPG não-filamentososo (aPPG) é secretado por formas amastigotas (ILG et al., 1999) (**Figura 2**). Formas promastigotas leptomonadas, que colonizam o intestino anterior e médio de vetores flebotomíneos, secretam uma substância gelatinosa composta basicamente por fPPGs, que favorece a infecção por *Leishmania* nos

hospedeiros mamíferos (STIERHOF et al., 1999; ROGERS et al., 2004). Por sua vez, as sAPs são enzimas que participam de diversos processos na infecção por *Leishmania*, reduzindo a explosão respiratória de neutrófilos e metabólitos oxidativos tóxicos, desfosforilando fosfolipídios e fosfoproteínas (PFEIFFER et al., 1978; ILG et al., 1991). Elas atuam também na indução da resposta imune humoral, na adaptação do parasito em ambientes ácidos e na aquisição de nutrientes das células hospedeiras (GLEW et al., 1988; CHANG et al., 1990). Sua expressão também está relacionada com o grau de infectividade e virulência, favorecendo a sobrevivência dos parasitos dentro da célula hospedeira (SAHA et al., 1985; REMALEY et al., 1985; CHANG et al., 1990; SINGLA et al., 1992; STAFFORD et al., 2002). As formas secretadas de PPGs e sAPs estão implicados na sobrevivência de *L. donovani* no intestino médio de flebotomíneos logo após o repasto sanguíneo (SACKS et al., 2000). Esses compostos provavelmente conferem resistência ou modulam a atividade de enzimas digestivas dos flebotomíneos, formando uma camada protetora de superfície, mediando as interações parasito-hospedeiro (NADERER et al., 2004; GIRAUD et al., 2019). Os PPGs também atuam no recrutamento de macrófagos para o local da picada (ROGERS et al., 2009). Dentro dos macrófagos, os PPGs secretados por amastigotas desempenham um papel fundamental na maturação dos vacúolos parasitóforos (ILG et al., 1995; MENGELING et al., 1997).

Outro glicoconjugado abundante na superfície celular do parasito é o lipofosfoglicano (LPG), que possui diversas funções que o torna um importante fator de virulência (SACKS; PERKINS, 1985; RUSSELL; WRIGHT, 1988; FORESTIER et al., 2014). O LPG é o glicoconjugado mais abundante no glicocálix das formas promastigotas e tem papel importante na ligação do parasito ao intestino do flebotomíneo (**Figura 2**) (RUSSELL, WRIGHT., 1988; FORESTIER et al., 2014). Após a diferenciação em amastigotas, os níveis desse glicoconjugado são reduzidos e a estrutura bioquímica é significativamente alterada (RUSSELL, WRIGHT., 1988; FORESTIER et al., 2014). A composição do LPG consiste em repetições de Gal β 1,4Man-PO $_4$, ligadas a um núcleo de glicano e inseridas na membrana por uma âncora GPI (FORESTIER et al., 2014). O LPG varia no número de repetições de oligossacarídeos, diferenciando entre as espécies de *Leishmania* e os estágios evolutivos do parasito (SACKS et al., 1995; LODGE, DESCOTEAUX., 2005; FORESTIER et al., 2014). O LPG de promastigotas metacíclicas apresenta um maior número de repetições de

oligosacarídeos em comparação à forma procíclica de *Leishmania* (DESCOTEAUX, TURCO, 1999), o que confere uma importante proteção a membrana plasmática de formas metacíclicas, evitando o ataque das proteínas do sistema do complemento que faz parte da resposta imune inata do hospedeiro vertebrado (PUENTES et al., 1990). Parasitos *knockout* na glicosilação de LPG mostraram ter virulência diminuída com sensibilidade aumentada ao complemento e um fenótipo avirulento (ELHAY et al., 1990). Os LPGs também foram implicados na ligação e entrada de promastigotas metacíclicas em macrófagos (RUSSELL et al., 1989). Esses gliconjugados também promovem a sobrevivência inicial de formas promastigotas metacíclicas dentro do compartimento fagolisossômico (TURCO, 1990; ELHAY et al., 1990; MCNEELY, TURCO, 1990) ao inibir a explosão oxidativa de macrófagos e proteger a superfície do parasito de enzimas hidrolíticas e radicais livres de oxigênio (NOGUEIRA et al., 2016; CARDOSO et al., 2020).

A glicoproteína 63 (Gp63), ou leishmanolisina, é outro importante fator de virulência encontrado na superfície de *Leishmania* e está envolvida nas interações parasito-hospedeiro através da ligação do parasito aos macrófagos (RUSSELL et al., 1986). Ela foi originalmente identificada como uma glicoproteína de 63-68 kDa (BOUVIER et al., 1987; CHANG et al., 1990) e está ligada a membrana do parasito por uma âncora GPI (**Figura 2**). A Gp63 também pode ser liberada no meio extracelular, dentro ou fora de vesículas (ISNARD et al., 2012). Estas moléculas desempenham papéis importantes na modulação da resposta imune do hospedeiro e proteção das formas promastigotas da ação de enzimas hidrolíticas no intestino médio do vetor (REINER et al., 1990; MOTTRAN et al., 1992) e no compartimento de fagolisossomos de macrófagos (PETERS et al., 1995). No entanto, Gp63 é regulada negativamente em formas amastigotas (PIMENTA et al., 1991). Esta protease é responsável por inativar a cascata do complemento, inibindo o fator C3b e impedindo a formação do complexo de ataque a membrana (CAM), o que permite a opsonização do parasito e facilita a fagocitose (ISNARD et al., 2012; SHAO et al., 2019). A atividade de protease da Gp63 favorece a entrada nos macrófagos, através da clivagem de proteínas da matriz extracelular do hospedeiro e da interação com receptores de fibronectina (OLIVIER et al., 2012). Gp63 também atua na ação de outras células fagocíticas e não fagocíticas, influenciando a liberação de IFN de células *natural killer* (NK) e afetando a resposta imune Th1 contra o parasito (LIEKE et al., 2008). Além disso, essa glicoproteína influencia os mecanismos de sinalização

da célula hospedeira e suas funções (ISNARD et al., 2012). Parasitos deficientes em Gp63 mostraram ser menos virulentos (WILSON et al., 1989), por outro lado, a superexpressão de gp63 nos mutantes deficientes dessa glicoproteína aumentou sua ligação aos macrófagos (TURCO, DESCOTEAUX, 1992) e sua capacidade de sobrevivência intracelular (MCNEELLY, TURCO, 1990).

Todos estes fatores de virulência atuam de modo a garantir a sobrevivência, a manutenção e a proliferação do parasito durante a infecção, não estando restritos a mecanismos de evasão do sistema imune. Além dos aqui citados, existem várias outras proteínas que são considerados fatores de virulência, como proteínas e enzimas conjugadas a carboidratos e lipídios que atuam em conjunto de modo a favorecer a sobrevivência do parasito (LIU et al., 2012).

1.3. Mecanismos de glicosilação em *Leishmania*

Como mencionada anteriormente, as superfícies dos parasitos das espécies de *Leishmania* são particularmente ricas em carboidratos, na forma de porções de glicanos e glicoconjugados complexos (ZAMZE, 1991). Os glicanos podem ocorrer como oligossacarídeos livres ou como estruturas simples ou complexas (também chamados de glicoconjugados) ligados covalentemente a diferentes macromoléculas, como proteínas e lipídios, para formar glicoproteínas, proteoglicanos ou PPGs, e glicolipídios, respectivamente (CUMMINGS, PIERCE, 2014).

A glicosilação de proteínas é uma modificação co- e pós-traducional, em que as macromoléculas de glicanos são covalentemente ligadas a resíduos de aminoácidos específicos (VARKI et al., 2009; MULE et al., 2020). As duas principais classes de glicosilação de proteínas são a *N*-glicosilação (adição de carboidratos ao nitrogênio) e a *O*-glicosilação (adição de carboidratos ao radical hidroxila), em que os glicanos são ligados às cadeias laterais dos aminoácidos asparagina (Asn) e serina (Ser)/treonina (Thr), respectivamente (VARKI et al., 2009). Em *Leishmania*, a *N*-glicosilação está associada à virulência, evasão do sistema imune, interação célula-hospedeiro (incluindo, adesão e invasão), modulação da resposta imune do hospedeiro e integridade estrutural de proteínas (BLACKWELL et al., 1985; OLIVIER et al., 2012). Por sua vez, a *O*-glicosilação dos PPGs

desempenha papel crucial na ativação do complemento dos parasitos, inibição da lise pelo soro e prevenção da opsonização dos estágios de vida de amastigotas (PETERS et al., 1997).

A glicosilação de proteínas em um organismo é determinada pela natureza das proteínas que sofrem glicosilação, pela expressão e atividade das enzimas da maquinaria de glicosilação, pela disponibilidade de doadores de açúcar e pelo metabolismo celular (THAYSEN-ANDERSEN et al., 2016). A *N*-glicosilação é um processo catalisado por enzimas biossintéticas, como as glicosiltransferases, α -glicosidases e α -manosidases, que transferem ou clivam resíduos de glicanos. A maioria dessas enzimas transmembranas está localizada no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de Golgi (KUKURUZINSKA, LENNON, 1998).

Em eucariotos, a via biossintética da *N*-glicosilação começa na membrana do RE, onde as glicosiltransferases adicionam moléculas de açúcar, como *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), glicose ou manose, a uma cadeia crescente de oligossacarídeo ligado a lipídio (BOSCH et al., 1988). Em seguida, ocorre a transferência em bloco desses oligossacarídeos a partir do lipídio para as cadeias laterais de asparagina de proteínas nascentes (KUKURUZINSKA, LENNON, 1998; LARKIN, IMPERIALI, 2011). A molécula lipídica aceptora do primeiro açúcar adicionado à cadeia crescente de oligossacarídeo é o dolcildifosfato (Dol-PP), que também atua como o transportador dos oligossacarídeos para as proteínas (BURBA, AEBI, 1999). Em tripanossomatídeos, a cadeia lipídica do Dol-PP é mais curta, com 10-12 unidades de isopreno em comparação com as cadeias de mamíferos (18-21 unidades), plantas e fungos (15-16 unidades) (LÖW et al., 1991).

A montagem do glicano que será transferido para as proteínas é realizada por uma série de glicosiltransferases ligadas à membrana pertencentes a família *Alg* (do inglês, *asparagine-linked glycosylation*), que catalisa a transferência de cada monossacarídeo para o transportador Dol-PP (JONES et al., 2009). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a montagem do glicano começa no lado citoplasmático da membrana do RE com a adição de GlcNAc-1-P ao Dol-P, que será então fosforilado a Dol-PP, pela ação da enzima Alg7, seguida pela transferência do segundo resíduo de GlcNAc pelo complexo Alg13/14 (LEHRMAN, 1991; BICKEL et al., 2005) (**Figura 3**). A manosição inicial é realizada por Alg1, seguida pela adição de quatro resíduos de manose por Alg2 e Alg11 (COUTO et al., 1984; YAMAKAZI et al., 1998; CIPOLLO et al., 2001). Em seguida, esse heptassacarídeo ligado a Dol-P é

filo apicomplexa como *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium*, sugerem que estes parasitos não são capazes de sintetizar glicoconjugados com estrutura semelhante a de *S. cerevisiae* e outros eucariotos, pois as enzimas Alg3, Alg9 e Alg12 estão ausentes, no entanto, estão presentes as glicosiltransferases Alg6, Alg8 e Alg10 (SAMUELSON et al., 2005; LUK et al., 2008). Por outro lado, *P. falciparum* perdeu quase todas as glicosiltransferases da família Alg, com exceção de Alg7, gerando apenas Dol-PP-GlcNAc, o que explica a dificuldade em identificar *N*-glicoproteínas nesta espécie (BERHE et al., 2000).

Enquanto os *N*-glicanos são transferidos em bloco a partir de precursores de oligossacarídeos pré-sintetizados para cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas, na *O*-glicosilação ocorre a adição gradual de unidades de monossacarídeos individuais ao grupo hidroxila de uma cadeia lateral de aminoácidos de serina (Ser) ou treonina (Thr) (VAN DEN STEEN et al., 1998). Existem dois tipos de *O*-glicosilação: a tipo mucina, em que ocorre a adição de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a um resíduo Ser/Thr de uma proteína; e a tipo manose (*O*-manosilação), em que um açúcar manose é transferido para esses resíduos de aminoácidos (VARKI et al., 2009; MULE et al., 2020). No entanto, não há evidência de nenhum dos dois tipos de *O*-glicosilação em proteínas de parasitos do gênero *Leishmania* (ILG, 2000). A *O*-glicosilação já reportada em *Leishmania* é denominada fosfoglicosilação, que envolve a adição de fosfoglicanos a um polipeptídeo em um resíduo de serina e que está envolvida na biossíntese dos PPGs (ILG et al., 1996; HAYNES, 1998).

Nas últimas décadas, a pesquisa no campo da glicosilação teve grandes avanços, incluindo a descoberta de novas modificações de carboidratos, a caracterização bioquímica das enzimas envolvidas na montagem e processamento de glicanos e o impacto biológico desses glicanos nas proteínas-alvo (NORTH et al., 2009; LARKIN, IMPERIALI, 2011). O estudo do papel da glicosilação de proteínas na interação patógeno-hospedeiro pode fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção causada pelo parasito (LIN et al., 2020). Além disso, pesquisas nessa área podem contribuir para o desenvolvimento de vacinas e a descoberta de alvos terapêuticos e de diagnóstico, chamando a atenção para a importância dos glicanos na biologia do parasito e suas aplicações no controle de doenças (LIN et al., 2020; MULE et al., 2020). O que reforça os avanços que os estudos de glicosilação em *Leishmania* podem trazer, ressaltando assim a relevância deste estudo.

1.4. Estudos da função gênica em *Leishmania*

O desenvolvimento de ferramentas moleculares para a manipulação genética de parasitos nos possibilita responder a questões biologicamente relevantes, como avaliar o papel de proteínas e vias metabólicas de um tipo de célula (BURLE-CALDAS et al., 2015). No entanto, o desenvolvimento de ferramentas de manipulação genética em *Leishmania* tem sido desafiador (BEVERLEY, TURCO, 1998; BEVERLEY, 2003), devido à alta complexidade da biologia desses parasitos e sua alta plasticidade genética (ROGERS et al., 2011; STERKERS et al., 2014). Em contraste, a disponibilidade de sequências do genoma de *Leishmania* (IVENS et al., 2005; PEACOCK et al., 2007; YURCHENKO et al., 2021) e algumas metodologias padronizadas até o momento possibilitaram o estudo de genes e suas funções biológicas na infecção e em processos celulares essenciais (CRUZ, BEVERLEY, 1990; BEVERLEY, 2003; SPÄTH, CLOS, 2016).

Nas últimas décadas, várias ferramentas que permitem a manipulação gênica de tripanossomatídeos têm sido desenvolvidas (CLAYTON, 1999; BEVERLEY, 2003; BURLE-CALDAS et al., 2015; SOLLELIS et al., 2015; BARTHOLOMEU et al., 2021). Estas ferramentas permitem a investigação da função de diversos genes, por estratégias de ganho e perda de função, também possibilitam estudar a localização das proteínas usando vários marcadores *in vivo*, como a proteína fluorescente verde (GFP). Também estão disponíveis vetores de expressão que permitem a expressão de proteínas em tripanossomatídeos, incluindo vetores epissomais circulares e cromossomos artificiais lineares (PATNAIK et al., 1996; TAMAR, PAPADOPOULOU, 2001). Por exemplo, a superexpressão utilizando vetores epissomais ou integrados ao genoma permite observar se a maior expressão de uma determinada proteína pode aumentar ou diminuir a susceptibilidade do parasito a uma determinada droga ou afetar sua virulência (WYLLIE et al., 2016; GAZANION et al., 2016).

Os genomas de tripanossomatídeos são organizados em longos clusters gênicos direcionais (DGCs do inglês: *directional gene clusters*) (MYLER, 2000), que são transcritos pela RNA polimerase II em pré-mRNAs policistrônicos longos (CLAYTON, 1992). Estes são processados mRNAs monocistrônicos maduros por duas reações de processamento acopladas, conhecidas como *trans-splicing* e poliadenilação (CLAYTON, 1992). O *trans-*

splicing resulta na adição de uma sequência de minixon de 39 nucleotídeos (nt), conhecida como *spliced leader*, na extremidade 5' de cada mRNA e é dependente da reação de poliadenilação que ocorre na extremidade 3' do gene imediatamente *upstream* (CLAYTON, 1992; MICHAELI, 2011). Portanto, para obter a expressão de um gene em construções episomais em *Leishmania*, é necessário que o plasmídeo tenha um sinal para adição do *spliced leader* e outro para a poliadenilação, que devem estar localizados nas extremidades 5' e 3' da ORF de interesse, respectivamente (LEBOWITZ et al., 1993; PAPADOPOULOU et al., 1994).

Uma das técnicas usadas na manipulação genética de organismos é o RNA de interferência (RNAi) (MYLER., 2000). RNAi é uma técnica que tem como princípio básico a regulação negativa (*knockdown*) da expressão gênica (KOLEV et al., 2011). As funções efetoras da via de RNAi ocorrem pela expressão de enzimas semelhantes a *Dicer* (DCL1 e 2), que clivam longos RNAs de fita dupla (dsRNA) em pequenos fragmentos de fita dupla, chamados de RNA de interferência (siRNA). O siRNA funciona como uma sequência guia para o processamento pela enzima Argonauta, formando o complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC), que leva a degradação do transcrito (KOLEV et al., 2011). O sequenciamento dos genomas de tripanossomatídeos mostrou que algumas espécies como *Trypanosoma brucei* possuem via e genes ativos da maquinaria de RNAi, incluindo argonautas (AGO1) (ULLU et al., 2004) e duas *Dicers* (DCL1 e DCL2) (SHI et al., 2006; PATRICK et al., 2009). Espécies do subgênero *Viannia*, como *L. braziliensis* e *L. guyanensis* possuem genes ortólogos aos presentes em *T. brucei*, assim sendo, uma maquinaria funcional de RNAi (PEACOCK et al., 2007; LYE et al., 2010). Entretanto, os principais ortólogos da maquinaria de RNAi estão ausentes em *T. cruzi*, *L. major* e *L. donovani* (ROBINSON, BEVERLEY et al., 2003; IVENS et al., 2005).

A manipulação gênica em tripanossomatídeos também pode ser realizada através da deleção (*knockout*) de genes por recombinação homóloga. A deleção de um gene de cópia simples, utilizando essa técnica, é iniciada com a substituição do primeiro alelo por um marcador de resistência a drogas e, em uma segunda etapa, pela transfecção do mutante heterozigoto com um segundo marcador de resistência, flanqueado por sequências correspondentes ao segundo alelo do gene alvo (BURLE-CALDAS et al., 2015). No entanto, essa estratégia é muito demorada e envolve múltiplas etapas de clonagem, regiões

flanqueadoras longas no cassete de DNA para promover o reparo por homologia e duas rodadas de transfecção com diferentes marcadores de resistência para geração de mutantes nulos (DUNCAN et al., 2017). A ocorrência frequente de cromossomos supranumerários em *Leishmania* e *T. cruzi* pode tornar ainda mais laboriosa a geração de parasitos *knockouts* pela técnica de recombinação homóloga, requerendo rodadas adicionais de transfecção e seleção dos mutantes (BARTHOLOMEU et al., 2021). Além disso, tentativas de deletar genes essenciais para a viabilidade de promastigotas de *Leishmania* mostraram que esses parasitos apresentam uma enorme plasticidade gênica e, nesse processo de *knockout* por duas etapas, mutações compensatórias geralmente aparecem, o que pode levar ao fracasso da estratégia (BEVERLEY, 2003; DACHER et al., 2014).

Uma nova tecnologia desenvolvida nos últimos anos, que está revolucionando a forma de fazer manipulação genética nos organismos, é a técnica conhecida como CRISPR-Cas9 (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (DOUDNA, CHARPENTIER, 2014; LANDER et al., 2016). Em 1987, Ishino e colaboradores descobriram palíndromos repetitivos de sequências no genoma de *Escherichia coli*, mas até então o papel dessas sequências não era totalmente compreendido, e diversos nomes foram atribuídos a elas; até que em 2002, Jansen e colaboradores as chamaram de CRISPR (ISHINO et al., 1987; JANSEN et al., 2002). Este sistema é basicamente um complexo de ribonucleoproteínas capaz de detectar e silenciar ácidos nucléicos estranhos ao organismo, ou seja, funciona como um tipo de sistema imunológico adaptativo em bactérias e arqueobactérias, que as protege contra plasmídeos ou invasões de vírus (BARRANGOU et al., 2007; SOREK et al., 2013; BONDY-DENOMY, DAVIDSON., 2014; TERNS, R; TERNS, M., 2014; MARRAFFINI, 2015; RATH et al., 2015; SINGH et al., 2017).

CRISPR associada a proteína 9 (Cas9) possibilita a clivagem precisa de um DNA de fita dupla por uma nuclease Cas9, com especificidade de sequência determinada por um RNA guia (sgRNA, do inglês *single guide RNA*) (DOUDNA, CHARPENTIER, 2014; LANDER et al., 2016). O reparo direcionado por homologia subsequente à quebra de fita dupla fornece oportunidades para interrupção ou modificações precisas do *locus* alvo. Em apicomplexa, os métodos CRISPR-Cas9 têm sido usados em *Plasmodium spp.* (GHORBAL et al., 2014; ZHANG., 2014) e *Cryptosporidium* (VINAYAK et al., 2015) e permitiram identificar novos

genes importantes na infecção e avaliar a perda de função em todo o genoma de *Toxoplasma gondii* (SIDIK et al., 2016).

Os primeiros kinetoplastídeos a serem submetidos à edição gênica utilizando a técnica CRISPR-Cas9 foram *T. cruzi* (PENG et al., 2014; LANDER et al., 2015; LANDER et al., 2016), *L. donovani* (ZHANG, MATLASHEWSKI 2015) e *L. major* (SOLLELIS et al., 2015). Nestes estudos foram utilizadas estratégias semelhantes para expressar Cas9 a partir de plasmídeos episomais. Por sua vez, os sgRNAs específicos para os alvos foram transfectados após serem transcritos *in vitro* (PENG et al., 2014) ou através de transfecção de plasmídeos episomais para a transcrição *in vivo* pela RNA polimerase I (LANDER et al., 2015; ZHANG, MATLASHEWSKI 2015) ou promotores de RNA polimerase III (SOLLELIS et al., 2015). A transfecção conjunta de Cas9 e sgRNA com um DNA doador para o reparo direcionado por homologia é capaz de gerar modificações precisas no *locus* alvo (ZHANG, MATLASHEWSKI., 2015), permitindo a geração de mutantes nulos para genes únicos ou multicópias. Sem a adição de um DNA doador, quebras de fita dupla induzidas por Cas9 são reparadas por um mecanismo de junção de extremidades mediada por micro homologia (MMEJ) (PENG et al., 2014; ZHANG, MATLASHEWSKI, 2015). Portanto, uma das principais vantagens da tecnologia CRISPR-Cas9 é permitir a interrupção ou modificação simultânea de genes em famílias multigênicas ou em cromossomos supranumerários, o que não é possível com métodos convencionais (PENG et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

Beneke e colaboradores (2017) desenvolveram um novo protocolo para a obtenção de sgRNA, usando moldes de DNA gerados por PCR, que são transcritos *in vivo* pela T7 RNA polimerase, e uma ferramenta *online* (LeishGEdit.net) para desenho de *primers*. Além disso, com esse protocolo também é possível utilizar um conjunto de plasmídeos que permite a geração fácil e escalonável de construções de DNA para transfecção (BENEKE et al., 2017). Neste estudo, também foi possível obter a localização de proteínas através de marcadores fluorescentes, que podem ser fusionados a proteínas no N- ou C-terminais (BENEKE et al., 2017). Essa metodologia também permitiu obter mutantes nulos em um único ciclo de transfecção em promastigotas de *L. major*, *L. mexicana* e formas sanguíneas de *T. brucei*. Os genes deletados utilizando essas ferramentas foram indetectáveis mesmo em populações não clonais (BENEKE et al., 2017).

Portanto, estudos funcionais utilizando a técnica CRISPR-Cas9 são considerados promissores, por ser uma técnica simples, relativamente de baixo custo, eficiente e aplicável em diferentes espécies (BARRANGOU et al., 2015; SINGH et al., 2017). As aplicações desta técnica a parasitos, responsáveis pelas principais doenças endêmicas que impactam a expectativa e a qualidade de vida de milhões de pessoas, trazem avanços para a parasitologia molecular e perspectivas animadoras para o estudo de seus mecanismos biológicos (CUI, YU, 2016; LANDER et al., 2016).

Apesar do uso crescente das abordagens "ômicas", a maioria dos genes associados à virulência de *Leishmania* permanece não caracterizada, limitando nossa compreensão da doença e dificultando a identificação de alvos vacinais e o desenvolvimento de novas terapias. Portanto, novos estudos são necessários para um melhor entendimento de fatores do parasito que influenciam a virulência e contribuem para a determinação das formas clínicas da doença. Dessa forma, o estudo funcional de fatores de virulência associados ao processo de glicosilação em *Leishmania*, utilizando técnicas de manipulação gênica, poderá contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de infecção do parasito e para o desenvolvimento de vacinas e novas drogas para o tratamento contra as leishmanioses. Sabendo das lacunas e escassez de conhecimentos acerca do processo de *N*-glicosilação em *Leishmania*, propomos um estudo funcional de duas enzimas relacionadas a esse processo, utilizando ferramentas de bioinformática e biologia molecular, como CRISPR e RT-qPCR. Sendo assim, nossa hipótese é de que a presença de Alg9, um gene anteriormente ausente em *L. braziliensis*, pode levar ao aumento no depósito de carboidratos na superfície do parasito, impactando positivamente sua sobrevivência e infectividade. E, de modo inversamente proporcional, o *knockout* do gene Alg11 pode impactar negativamente o depósito de carboidratos na superfície e afetar os índices de sobrevivência e infectividade em *L. braziliensis*.

2. Justificativa

Moléculas de superfície de patógenos representam a primeira interface com o hospedeiro, participando de diversos mecanismos de interação essenciais para sua sobrevivência, como invasão celular, ativação e escape do sistema imune. Os glicoconjugados de superfície assumem papel de destaque nestes processos e são geralmente representados por moléculas inseridas na membrana plasmática de patógenos por âncoras GPI, o que confere uma alta densidade de moléculas de superfície. Em *Leishmania*, essas moléculas ancoradas por GPI incluem lipofosfoglicanos (LPGs), Glicosilfosfatidilinositóis (GIPLs), mProteofosfoglicano (mPPGs), e proteínas como GP63. Além disso, outros glicoconjugados podem ser secretados, como fosfatases ácidas secretadas (sAPs) e PPG filamentoso (fPPGs). Açúcares como glicose, manose, galactose compõem a estrutura destas moléculas, as quais possuem estruturas bastante complexas e variáveis em diferentes espécies de *Leishmania* e formas evolutivas do parasito. Apesar destes estudos, existem vários aspectos ainda a serem elucidados em relação à via de *N*-glicosilação em *Leishmania* e ao papel individual das enzimas envolvidas nesta via. Além disso, os mecanismos pelos quais os glicoconjugados permitem que as várias espécies de *Leishmania* evadam e sobrevivam aos mecanismos antimicrobicidas de macrófagos ainda são pouco conhecidos. A caracterização funcional de duas α -1,2-manosiltransferases, Alg9 e Alg11, envolvidas no processo de *N*-glicosilação em *Leishmania* e objetos de estudo deste trabalho, poderá fornecer novos conhecimentos relacionados à interação do parasito com o hospedeiro, progressão da doença e manifestação clínica. Um melhor entendimento de tais fatores pode aumentar a nossa compreensão das leishmanioses e ajudar na identificação de novos alvos para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização funcional de fatores de virulência relacionados ao processo de *N*-glicosilação em *Leishmania*.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar e selecionar genes que codificam enzimas envolvidas em reações metabólicas relacionadas ao processo de *N*-glicosilação em *Leishmania*;
- Deletar o gene LbrM2903_340062700 (Alg11) e realizar o *knock-in* do gene LINP_120006700 (Alg9), envolvidos no metabolismo de glicanos, em *Leishmania braziliensis* M2903;
- Avaliar a expressão de mRNA dos genes Alg9 e Alg11 em diferentes formas evolutivas de parasitos *wild type* e mutantes de *L. braziliensis*;
- Analisar o perfil de crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis wild type* e mutantes;
- Avaliar os índices de infectividade *in vitro* de parasitos *wild type* e mutantes de *L. Braziliensis*;
- Quantificar os glicoconjugados na superfície de parasitos mutantes em comparação com parasitos *wild type* de *L. braziliensis*.
- Analisar e comparar os níveis de expressão de mRNA de outros genes envolvidos na via de *N*-glicosilação nos diferentes estágios evolutivos e espécies do gênero *Leishmania* e nos parasitos *wild type* e mutantes de *L. braziliensis*.

4. Material e métodos

4.1. Seleção dos alvos

Sequências proteicas preditas a partir do genoma de 17 espécies de tripanossomatídeos (**Tabela 1**) foram obtidas dos bancos de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (ASLETT et al., 2010) e GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (BENSON et al., 2015). Os organismos foram agrupados de acordo com a habilidade de infectar o hospedeiro mamífero, sendo classificados em: apatogênicos (sem capacidade para infectar e multiplicar em mamíferos ou que são rapidamente eliminados após infecção); patogênicos extracelulares (possui capacidade de infectar mamíferos, mas com ciclo de vida restritos ao ambiente extracelular, como sangue e outros fluidos teciduais, e sem a capacidade de invadir células destes hospedeiros); e patogênicos intracelulares (possui habilidade de invadir e sobreviver dentro de células de mamíferos durante seu ciclo de vida).

Tabela 1: Proteomas preditos baseados nos genomas de 17 espécies de tripanossomatídeos. Fonte: (MENDES, 2015)

Organismo	Infecção em mamíferos	Hospedeiro invertebrado	Banco de dados	Versão	Referência
<i>A. deanei</i>	Apatogênico	Vários	GenBank	21/07/13	(MOTTA et al., 2013)
<i>L. amazonensis</i>	Intracelular	Flebotomíneos	GenBank	18/07/13	(REAL et al., 2013)
<i>L. braziliensis</i>	Intracelular	Flebotomíneos	TritrypDB	6.0	(PEACOCK et al., 2007)
<i>L. donovani</i>	Intracelular	Flebotomíneos	TritrypDB	6.0	(DOWNING et al., 2011)
<i>L. infantum</i>	Intracelular	Flebotomíneos	TritrypDB	6.0	(PEACOCK et al., 2007)
<i>L. major</i>	Intracelular	Flebotomíneos	TritrypDB	6.0	(IVENS et al., 2005)
<i>L. mexicana</i>	Intracelular	Flebotomíneos	TritrypDB	6.0	(ROGERS et al., 2011)
<i>L. tarentolae</i>	Apatogênico	Flebotomíneos	TritrypDB	6.0	(RAYMOND et al., 2012)
<i>S. culicis</i>	Apatogênico	Vários	GenBank	21/07/13	(MOTTA et al., 2013)
<i>T. brucei brucei</i>	Extracelular	Glossinas	TritrypDB	6.0	(BERRIMAN et al., 2005)
<i>T. brucei gambiense</i>	Extracelular	Glossinas	TritrypDB	6.0	(JACKSON et al., 2010)
<i>T. congolense</i>	Extracelular	Glossinas	TritrypDB	6.0	(JACKSON et al., 2012)
<i>T. cruzi CL Brener</i>	Intracelular	Triatomíneos	TritrypDB	6.0	(EL-SAYED et al., 2005a)
<i>T. cruzi marinkellei</i>	Intracelular	Triatomíneos	TritrypDB	6.0	(FRANZÉN et al., 2012)
<i>T. cruzi Sylvio X10-1</i>	Intracelular	Triatomíneos	TritrypDB	6.0	(FRANZÉN et al., 2011)
<i>T. rangeli</i>	Apatogênico	Triatomíneos	GenBank	12/05/14	(STOCO et al., 2014)
<i>T. vivax</i>	Extracelular	Glossinas*	TritrypDB	6.0	(JACKSON et al., 2012)

* Tabanídeos são também considerados vetores mecânicos de *T. vivax*.

A. deanei – *Angomonas deanei*; *L. amazonensis* – *Leishmania 44filico44nses*; *L. braziliensis* – *Leishmania braziliensis*; *L. donovani* – *Leishmania donovani*; *L. infantum* – *Leishmania infantum*; *L. major* – *Leishmania major*; *L. mexicana* – *Leishmania mexicana*; *L. tarentolae* – *Leishmania tarentolae*; *S. culicis* – *Strigomonas culicis*; *T. brucei brucei* – *Trypanosoma brucei brucei*; *T. brucei gambiense* – *Trypanosoma brucei gambiense*; *T. congolense* – *Trypanosoma congolense*; *T. cruzi CL Brener* – *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener; *T. cruzi marinkellei* – *Trypanosoma cruzi marinkellei*; *T. cruzi Sylvio X10-1* – *Trypanosoma cruzi* cepa Sylvio X10-1; *T. rangeli* – *Trypanosoma rangeli*; *T. vivax*, *Trypanosoma vivax*. Essas análises foram realizadas por Mendes (2015).

Reações metabólicas para cada tripanossomatídeo foram automaticamente recuperadas do KEGG (KANEHISA, 2002), utilizando as ferramentas disponíveis no pacote RAVEN Toolbox (AGREN et al., 2013) em MATLAB versão 2013^a (MathWorks, EUA).

Inicialmente, uma matriz contendo representação binária para presença ou ausência de cada reação metabólica potencialmente realizada por cada organismo foi construída baseada no conjunto de enzimas identificadas para todos os tripanossomatídeos. Uma matriz de distância foi posteriormente construída estratificando as reações para as seguintes vias

metabólicas classificadas conforme o *KEGG pathway* (TANABE, KANEHISA, 2012): metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carboidratos, metabolismo energético, metabolismo de lipídeos, metabolismo de nucleotídeos, biossíntese e metabolismo de glicanos, metabolismo de cofatores e vitaminas, e biossíntese de metabólitos secundários. As matrizes de distância foram utilizadas para construção de dendrogramas, utilizando o método de Fitch implementado no pacote PHYLIP (FELSENSTEIN, 1989; MENDES, 2015).

A partir destas análises foram selecionados para este trabalho os seguintes genes: LbrM2903_340062700, que codifica a α -1,2-manosiltransferase Alg11 (ausente em *L. tarentolae* e presente em todas as espécies de *Leishmania* patogênicas), e LINF_120006700, que codifica a α -1,2-manosiltransferase Alg9 (ausente somente em *L. tarentolae* e *L. braziliensis* e presente nas demais espécies de *Leishmania*), ambos codificam enzimas relacionadas ao processo de *N*-glicosilação em *Leishmania*.

4.2. Análise *in silico* de genes da via de *N*-glicosilação de *Leishmania*

Para identificar os genes ortólogos envolvidos na via de *N*-glicosilação em parasitos do gênero *Leishmania*, as análises *in silico* foram realizadas a partir de buscas no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (ASLETT et al., 2010). Foram investigados os genes da via de *N*-glicosilação das 13 espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. donovani* (BPK282A1), *L. enrietti* (LEM3045), *L. gerbilli* (LEM452), *L. infantum* (JPCM5), *L. major* (Friedlin), *L. martiniquensis* (LEM2494), *L. mexicana* (MHOM/GT/2001/U1103), *L. panamensis* (MHOM/COL/81/L13), *L. tarentolae* (Parrot-TarII), *L. tropica* (L590) e *L. turanica* (LEM423).

4.3. Cultura de parasitos

Promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) foram cultivadas em meio de cultura 199 M0393 (Sigma-Aldrich), pH 7,5, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Thermo Fisher Scientific), adenina 10 mM (Sigma-Aldrich), biotina 0,1% (Sigma-Aldrich), hemina 0,25% (Sigma-Aldrich), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e 1 µM de 6-biopterin (Sigma-Aldrich), e mantidas em estufa BOD a 27 °C. As culturas de promastigotas foram repicadas uma vez por semana ou quando atingissem a fase estacionária, em diluições 1:40 em meio de cultura fresco. Formas promastigotas estacionárias foram obtidas de culturas envelhecidas do parasito. Formas promastigotas metacíclicas foram obtidas a partir do enriquecimento de cultura envelhecida do parasito, utilizando gradiente de separação por ficoll.

Amastigotas axênicas foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 25% de SFB (Thermo Fisher Scientific) e 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), a 37 °C, 5% de CO₂ e pH 5,5 (SAAR, RANSFORD et al. 1998). Formas amastigotas intracelulares foram obtidas em células DH82, uma linhagem de macrófagos caninos imortalizados derivados de histiocitose maligna, e THP-1, uma linhagem de células humanas imortalizadas derivadas de um paciente com leucemia monocítica aguda, em meio RPMI (Sigma-Aldrich), suplementado com L-glutamina 200 mM (Gibco), 10% de SFB(Thermo Fisher Scientific), e 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), a 37 °C e 5% de CO₂.

4.4. Citometria de fluxo de parasitos marcados com lectina

Para cada poço de uma placa de cultura celular com fundo arredondado (TPP; número catálogo 92097), um total de 5×10^5 formas promastigotas ou amastigotas axênicas, fixadas em paraformaldeído 2%, foram inicialmente centrifugadas a 2000 x g por 10 min a 4 °C e lavadas duas vezes com tampão PBS 1X. Em seguida, foi realizada a incubação dos parasitos em temperatura ambiente por 1 hora com três diferentes soluções: I) somente PBS 1X (parasitos não marcados); II) lectina Concanvalina A de *Canavalia ensiformis* (ConA) (Sigma-Aldrich) (afinidade por resíduos de α -D-manose e α -D-glicose) conjugada com FITC, diluída 1:100 em PBS 1X; III) lectina ConA previamente incubada por 15 minutos à temperatura ambiente com seu inibidor metil α -D-manopiranosídeo (Sigma-Aldrich), na concentração de 2 mM (CLEGG et al., 1981), para avaliar a especificidade da ligação. Os parasitos foram lavados três vezes com PBS 1X e centrifugados a 2000 x g por 10 min a 4 °C e ressuspensos em 200 μ L de PBS 1X. Após esta etapa foi realizada a aquisição dos dados no citômetro FACScan (Becton Dickinson) ajustado para leitura de dez mil eventos e analisados utilizando o software FlowJo versão 10.8.1 (Becton Dickinson). Para cada amostra, a área contendo células com morfologia preservada foi selecionada baseado nos perfis de tamanho e granulosidade (FSC x SSC) e calculado a intensidade média de fluorescência (MFI) para os dados coletados com filtro apropriado para o comprimento de onda FITC (FL-1, 530/30 nm). Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão.

4.5. Extração de DNA

O DNA genômico de formas promastigotas em fase logarítmica foi extraído utilizando o *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo K182001). O primeiro passo é a obtenção de 1×10^8 formas promastigotas, que foram centrifugadas a 4 °C, 2.000 x g por 10 minutos, para remover o meio de cultura, após este passo o sobrenadante foi descartado, o material foi ressuspensionado em 1 ml de PBS 1X e um novo passo de centrifugação foi realizado, descartando o sobrenadante em seguida. Após a obtenção das formas promastigotas, o *pellet* foi então ressuspensionado em 180 µl de *Genomic digestion buffer*, seguido da adição de 20 µl de proteinase K. O material ressuspensionado foi incubado a 55 °C por 10 minutos, após a incubação foram adicionados 20 µl de RNase A, seguido de um novo passo de incubação por 2 minutos a temperatura ambiente. O material foi então centrifugado a 20.000 x g por 5 minutos também em temperatura ambiente, para a remoção de partículas, e transferido para um novo tubo onde foram adicionados 200 µl de *Pure link genomic binding buffer*, seguido de um passo de homogeneização em vórtex por 5 segundos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol absoluto 99,9%, para precipitar o DNA, e mais um passo de homogeneização em vórtex por 5 segundos foi realizado. As amostras foram carregadas em colunas de sílica e centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente. Os tubos coletores foram descartados e foi realizado o primeiro passo de lavagem adicionando 500 µl de *Wash buffer 1*, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente, e um segundo passo de lavagem foi realizado adicionando 500 µl de *wash buffer 2*, seguido de centrifugação a 20.000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. Para a eluição do DNA foram adicionados 50 µl do tampão de eluição, incubou-se por 5 minutos, e centrifugou-se em seguida as colunas a 20.000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente. O DNA extraído foi quantificado e as relações das absorbâncias A260/280 e A260/230 foram avaliadas, utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

4.6. Extração de RNA

O RNA total a partir de promastigotas, amastigotas axênicas e intracelulares foi extraído, usando o kit *NucleoSpin RNA* (Macherey-Nagel, número de catálogo 740955). Para isso, formas promastigotas e amastigotas foram submetidas ao processo de lise adicionando 350 µl do tampão RA1 e 3,5 µl de β-mercaptoetanol, seguido de homogeneização vigorosa em vórtex. As amostras foram transferidas para uma coluna de filtração e centrifugadas a 11.000 x g por 1 minuto, para reduzir a viscosidade. O filtro foi descartado e a amostra agora filtrada foi precipitada pela adição de 350 µl de etanol 70%, em seguida, homogeneizou-se em vórtex 2x de 5 segundos. As amostras foram carregadas na coluna e centrifugadas à 11.000 x g por 30 segundos, as colunas foram então transferidas para um novo tubo coletor e o primeiro passo de lavagem foi realizado adicionando 350 µl de tampão MDB, seguido de centrifugação à 11.000 x g por 1 minuto, para a remoção de sal. O passo da remoção de DNA com DNase foi realizado separadamente, desse modo, seguiu-se o protocolo passando então ao passo de lavagem com tampão RA3, adicionou-se 600 µl do tampão e centrifugou por 30 segundos à 11.000 x g, descartando agora o eluato, devolvendo em seguida as colunas aos tubos coletores. Um segundo passo de lavagem foi realizado adicionando 250 µl do tampão RA3 e centrifugando por 2 minutos à 11.000 x g. Para a eluição do RNA foram adicionados 40 µl do tampão de eluição, incubou-se por 5 minutos e centrifugou-se as colunas a 11.000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente. O RNA extraído foi quantificado e as relações das absorbâncias A260/280 e A260/230 foram avaliadas, utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

4.7. Tratamento do RNA com Dnase

Para a remoção do DNA, foi utilizada 1 unidade da enzima DNase I (RNase-free) (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo EN0521), 1 µg do RNA obtido no passo anterior, 1 µl do tampão de reação contendo MgCl₂ e RNase *free water* em um volume final de 10µl. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 1 µl de EDTA (50 mM) e incubou por 10 minutos a 65 °C para inativar a ação da enzima. Após este passo, o RNA tratado foi quantificado novamente, utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Para verificar a eficácia do tratamento 50 ng de cada amostra foram utilizados para a realização de PCR convencional. Para isso, foram utilizados 4 µl de tampão GoTaq Green 1X (Promega), 0,2 µM dNTP mix, 0,5 µM dos iniciadores: Lb_Betatubulina.Fw AGAACTCCGACGAGTCGATG e Lb_Betatubulina.Rw GGTCACGCCAGACATCAC, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), e água ultrapura em um volume final de 20 µL. As reações de amplificação foram realizadas da seguinte forma: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando tampão TAE 1X e 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Bio-Rad). O resultado foi visualizado no equipamento ImageQuant LAS 4000 (Cytiva/GE Healthcare). A confirmação da eficácia do tratamento se deu através da ausência de produto de amplificação quando comparado ao controle positivo utilizado.

4.8. Transcriptase reversa

Um micrograma do RNA, previamente tratado com DNase I, foi utilizado como molde para a reação de síntese de cDNA, usando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo 4368814). Para as reações de transcriptase reversa foram utilizados 2µl de 10X RT *Buffer*, 0,8µl de 25X dNTP Mix (100 mM), 2µl de 10X RT *Random Primers*, 1µl de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e *nuclease free water* em um volume final de 10µl. As condições de ciclagem consistiram em 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 minutos. O cDNA obtido foi utilizado para as reações de RT-qPCR.

4.9. RT-qPCR

Para as reações de RT-qPCR foram utilizados, 5µl do reagente *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) número de catálogo A25742, 20 ng do cDNA de cada amostra e 0,2µM de cada iniciador *Forward* e *Reverse* em um volume final de 10µl. As PCRs em tempo real foram realizadas no equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizados iniciadores específicos para os genes alvo e para o gene *splice leader*, usado como normalizador (**Tabela 2**). O ensaio foi realizado em duplicata para todos os genes, sendo a expressão do gene constitutivo avaliada na mesma placa que os demais genes. As amostras foram incubadas a 95 °C durante 10 min e submetidas a 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min. Uma curva de dissociação ao final de cada experimento foi realizada para avaliar a especificidade dos iniciadores. As diferenças relativas entre as amostras foram determinadas pelo método $2^{-\Delta C_t}$ (BUSTIN et al., 2009).

Tabela 2: Iniciadores utilizados para avaliar a expressão gênica dos genes selecionados

Alvos	Iniciadores	Sequências
<i>Splice leader</i>	7SL-RT-Lbr_Fw	5' TGCTCTGTAACCTTCGGGGGC 3'
	7SL-RT-Lbr_Rv	5' GCTCCGCGGTGTGATTCTGCAAC 3'
Alg11	LbrM2903_340062700.RT.Fw	5' TAGTGGTGGAAACGGTTGG 3'
	LbrM2903_340062700.RT.Rw	5' AGATGATGGGGTAATGCGTG 3'
Alg9	LINF_120006700.RT.Fw	5' CCAGCGGATCACGCACTA 3'
	LINF_120006700.RT.Rw	5' GTTGAACGTCTCGTCGCAGT 3'
Alg7	LbrM2903_350054900.RT.Fw	5' CCGGCGTGTACAGCAAGA 3'
	LbrM2903_350054900.RT.Rw	5' GTCAGCTTCTCCTCGTGCAT 3'
Alg14	LbrM2903_300011900.RT.Fw	5' GGTGGCTTTCTCTTCTGCGT 3'
	LbrM2903_300011900.RT.Rw	5' AGAATGCCCCGTCAGCAC 3'
Alg2	LbrM2903_200030000.RT.Fw	5' GAACGTGCAGTACGCCGA 3'
	LbrM2903_200030000.RT.Rw	5' CGACAACCGGCTTCGAGT 3'
Alg3	LbrM2903_350029300.RT.Fw	5' GCGCATTCGCAGCCTCTA 3'
	LbrM2903_350029300.RT.Rw	5' ATGCCTGGCGCGAAGAG 3'
OST	LbrM2903_340016500.RT.Fw	5' TGGGACTACGGCTACCAGAT 3'
	LbrM2903_340016500.RT.Rw	5' GACGTCAGCATCTTGCCGAT 3'
MOGS	LbrM2903_280030600.RT.Fw	5' CTGCCAAGAAGGGGTGGG 3'
	LbrM2903_280030600.RT.Rw	5' CACACCTCACCGCGCA 3'
GANAB	LbrM2903_180006000.RT.Fw	5' GGGTCGCAGCGGTATGC 3'
	LbrM2903_180006000.RT.Rw	5' CTGCATCCACCGCACAAAC 3'
Alg1	LbrM2903_180015300.Fw	5' GTCGCACGTGGTGGTGAG 3'
	LbrM2903_180015300.Rw	5' CCACTGGAGGAAAAGTGCAG 3'

4.10. Geração de parasitos *knockouts* e deleção gênica por edição de genoma pela técnica CRISPR/Cas9

A deleção do gene LbrM2903_340062700 de *L. braziliensis* foi realizada pela técnica de CRISPR/Cas9. Promastigotas de *L. braziliensis* M2903 em fase log, expressando a nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes* e a T7 RNA polimerase, a partir da transfecção episomal do plasmídeo pT007 (BENEKE et al., 2017) (**Anexo 1**), foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Moldes de sgRNAs, que irão direcionar a Cas9 para a sequência de DNA a ser clivada, e o DNA *donor*, contendo o gene de resistência a blasticidina, que irá substituir por recombinação homóloga a sequência clivada, foram gerados por PCR, de acordo com as especificações de Beneke e Gluenz (2019).

Para geração de dois moldes de sgRNAs alvo-específicos, dois iniciadores foram desenhados, cada um contendo o promotor T7, uma sequência de 20 nt complementar a região 5' UTR (sgRNA1) ou 3' UTR (sgRNA2) do gene LbrM2903_340062700, e uma sequência complementar ao *scaffold* de sgRNA (BENEKE et al., 2017). Para a amplificação dos moldes de sgRNA, foram adicionados 0,2 mM de dNTPs, 1 unidade de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), 10 µL de tampão de reação 5X (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM do iniciador G00 (*scaffold* do sgRNA, **Tabela 3**) (BENEKE, GLUENZ, 2019) e 0,2 µM do iniciador Lbr_340062700_Sg1 (**Tabela 3**) ou 0,2 µM do iniciador Lbr_340062700_Sg2 (**Tabela 3**), em combinação com o *scaffold* do sgRNA, que foi usado como molde (BENEKE et al., 2017), em um volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada a 98 °C por 30 s, seguido por 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 53 °C por 30 s e 72 °C por 15s. As reações para a obtenção dos RNA guias foram realizadas individualmente para os iniciadores Sg1/G00 e Sg2/G00. Dois microlitros desta reação foram aplicados em um gel de agarose 1% para verificar a presença do produto esperado. As bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (Cytiva/GE Healthcare). O volume restante foi precipitado com 2,5 volume de etanol absoluto e acetato de sódio 0,3 M e transfectado sem purificação adicional.

Tabela 3: Iniciadores utilizados para *knockout* do gene LbrM2903.34_0062700 e confirmação do *knockout* em *L. braziliensis* M2903

Iniciadores	Sequências
Lbr_340062700_sg1	5' gaaattaatac gactcactataggCTGCAAGGAGCAAGGTTATC gttttagagctagaaata gc 3'
Lbr_340062700_sg2	5' gaaattaatac gactcactataggCCTGCTAGCGAGGACGTATG gttttagagctagaaatag c 3'
G000 (BENEKE, GLUENZ, 2019)	5'aaaagcaccgactcggtgccactttttcaagttgataacggactagccttattttaactgctatttctagctctaaa ac 3'
Lbr_340062700_KO_Fw	5' ACCTTCTACATCGCTGCAAGGAGCAAGGTT gtataatgcagacctgctgc 3'
Lbr_340062700_KO_Rw	5' GCGTGCAACAGGTATCAAAACAAGCCTCAT ccaatttgagagacctgctgc 3'
KO CONFIRM.Fw (LbrM2903_340062700.RT.F)	5' TAGTGGTGGAAACGGTTGG 3'
KO CONFIRM.Rw (LbrM2903_340062700.RT.R)	5' AGATGATGGGGTAATGCGTG 3'

Nucleotídeos em maiúsculo são complementares ao gene alvo (LbrM2903_340062700).

Nucleotídeos marcados em azul indicam a sequência do promotor T7.

Nucleotídeos marcados em vermelho indicam a sequência complementar ao *scaffold* de sgRNA.

Nucleotídeos marcados em verde indicam a sequência de reconhecimento do plasmídeo pTBlast.

Para a geração do DNA *donor*, foram desenhados iniciadores contendo 30 nt complementares às regiões 5' e 3' UTRs do gene alvo LbrM2903_340062700, seguido por uma sequência de reconhecimento do plasmídeo pTBlast (BENEKE et al., 2017), que possui o gene de resistência a blasticidina (**Anexo 1**). Para a amplificação do DNA *donor*, foram utilizados 30 ng do plasmídeo pTBlast (BENEKE et al. 2017), 0,2 mM de dNTP mix, 0,2 µM de cada um dos iniciadores Lbr_340062700_KO_F e Lbr_340062700_KO_R (**Tabela 3**), 1 unidade de *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), 10 µL de tampão 5X (Thermo Fisher Scientific), em um volume final de 50 µL. A reação de amplificação ocorreu a 98 °C por 30 s, seguido por 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 40 s, 72 °C por 2 min e 10 s, e extensão final a 72 °C por 5 min. Dois microlitros desta reação foram aplicados em um gel de agarose 1% para verificar a presença de produto esperado. As bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (Cytiva/GE Healthcare). O volume restante foi precipitado com 2,5 volume de etanol absoluto e acetato de sódio 0,3 M e utilizado para a transfecção sem purificação adicional.

Para a geração de parasitos *knockouts* para o gene LbrM2903_340062700, 2×10^7 promastigotas de *L. braziliensis* M2903 (expressando a nuclease Cas9 e a T7 RNA

polimerase) foram cotransfectadas com os dois moldes de sgRNAs e o DNA *donor*, contendo o gene de resistência a blasticidina, utilizando o tampão Tb-BSF 3X (SCHUMANN BURKARD et al., 2011). Foi realizado 1 pulso por transfecção com o programa X-001, utilizando o sistema Amaxa Nucleofector (Lonza). Após a transfecção, os parasitos foram mantidos em meio 199 completo (Sigma- Aldrich) sem pressão seletiva por 24 horas. Após este período, os parasitos foram centrifugados a 2000 x g, por 10 min, a temperatura ambiente, e ressuspensos em 200 µL de meio 199 completo e 100 µL foram plaqueados em duas placas de meio 199 semi-sólido (1% meio 199 completo, ágar noble 1% (Sigma-Aldrich), 6-biopetrin 1,2 µg/mL (Sigma Aldrich) e blasticidina 10 µg/mL (Gibco). As placas foram mantidas em BOD a 23 °C por aproximadamente 2 semanas até aparecimento das colônias, após este período estas foram isoladas e inoculadas em meio 199 líquido, contendo 10 µg/mL de blasticidina, até atingirem a fase estacionária.

Após a expansão das colônias, o DNA dos parasitos foi extraído e utilizado em reações de PCR com iniciadores específicos para o gene alvo, para confirmação dos clones de parasitos *knockouts*. Para a PCR de diagnóstico, foram utilizados 50 ng do DNA extraído de cada um dos clones previamente selecionados, 4 µL de tampão GoTaq Green (Promega) 1X, 0,2 µM de dNTP mix (Bio-rad), 1,25 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), 0,5 µM dos iniciadores KO CONFIRM F e R (LbrM2903_340062700) (**Tabela 3**), e água ultrapura para ajustar para um volume final para 20 µL. As reações de amplificação foram realizadas a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94° C por 30s, 60 °C por 30s e 72°C por 30s, e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando tampão TAE 1X e 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Bio-Rad). As bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (Cytiva/GE Healthcare). Em seguida, os níveis de expressão de mRNA do gene LbrM2903_340062700 foram verificados por RT-qPCR, utilizando os iniciadores LbrM2903_340062700.RT.F e LbrM2903_340062700.RT.R (**Tabela 2**).

4.11. Geração de *L. braziliensis* mutantes expressando a proteína LINF_120006700 (*Knock-in*)

Para o *knock-in* do gene LINF_120006700 em formas promastigotas de *L. braziliensis* M2903, foram desenhados iniciadores específicos para o gene (**Tabela 4**), LI.12.6700.XhoI F e LI.12.6700.GS.3xHA.BamHI.R, contendo sítios para enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI*, respectivamente. Adicionalmente, o iniciador reverso contém 3 cópias da *tag* de HA (27 nt derivados da glicoproteína hemaglutinina de influenza humana), e um *GS linker* (30 nt que codificam uma sequência de glicina e serina para melhorar o dobramento e a estabilidade da proteína de fusão). O gene alvo foi amplificado por PCR, utilizando 50 ng do DNA genômico de *L. infantum* PP75, 2,5 µL de tampão de reação 5X (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM de dNTP mix, 2 mM de MgSO₄, 0,4 µM dos iniciadores LI.12.6700.XhoI.F e LI.12.6700.GS.3xHA.BamHI.R (**Tabela 4**), 1 U de *Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific) e água ultra pura para completar o volume final para 25 µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial 95 °C por 30 s, seguido por 30 ciclos de 95°C por 10 s, 60 °C por 40 s e 72 °C por 2 min e 10 s, e extensão final 72 °C por 5 min.

Tabela 4: Iniciadores utilizados para o *knock-in* do gene LINF_120006700 e confirmação da integração da construção em *L. braziliensis* M2903.

Iniciadores	Sequências
LI.12.6700.XhoI Fw	5' TTTCTCGAGATGCACCAGCGGATCACGCA 3'
LI.12.6700.GS.3xHA.BamHI.Rw	5'TATGGATCCTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGG TAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGCGTAATC TGGAACATCGTATGGGTAACCTACCCGATCCTGATCCAG ATCCTGATCCCGGTTTGGAGTTCAGCACAAGTGG 3'
SSU::APRTL.T.Fw	5' GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG 3'
Overhang-XhoI-SAS.Rw	5' GTACATCTCGAGACCACCGCTACGGTGGACGGC 3'
LINF_120006700.RT.Fw	5' CCAGCGGATCACGCACTA 3'
LINF_120006700.RT.Rw	5' GTTGAACGTCTCGTCCAGT 3'

Para a clonagem no vetor de expressão em *Leishmania* pSSUneo (MISSLITZ et al., 2000) (**Anexo 2**), o produto de PCR obtido e o plasmídeo foram submetidos a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI* e, em seguida, foram ligados, utilizando

a DNA ligase (Promega). Células de *E. coli* BL21 quimicamente competentes foram transformadas com a construção, contendo o gene LINF_120006700, e as colônias resistentes ao antibiótico ampicilina foram isoladas e usadas para extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial contendo o gene de interesse foi submetido a uma dupla digestão com as enzimas *PacI* e *PmeI* para linearização e transfecção estável em *L. braziliensis*.

Promastigotas de *L. braziliensis* M2903 (2×10^7 parasitos) em fase logarítmica foram utilizadas para a transfecção, utilizando 3 µg do DNA plasmidial pSSUneo, contendo o gene de interesse, em tampão Tb-BSF 3X (SCHUMANN BURKARD et al., 2011). Foi realizado 1 pulso por transfecção com o programa X-001, utilizando o sistema Amaxa Nucleofector (Lonza). Após a transfecção os parasitos foram mantidos em meio 199 completo (Sigma) sem pressão seletiva por 24h. Após este período, os parasitos foram centrifugados 2000 x g por 10 min, a temperatura ambiente, ressuspensos em 200 µL de meio 199 completo e 100 µL foram plaqueados em duas placas de meio 199 semi-sólido (1% meio 199 completo, ágar noble 1% (Sigma-Aldrich), 6-biopetrin 1,2 µg/mL (Sigma-Aldrich) e geneticina (G418) 10 µg/mL (Thermo Fisher Scientific). As placas foram mantidas em BOD a 23 °C por aproximadamente 2 semanas até a emergência das colônias, após este período estas foram isoladas e inoculadas em meio 199 líquido, contendo 10 µg/mL de geneticina até atingirem a fase estacionária.

Após a expansão das colônias, para confirmar a integração da construção no genoma, o DNA dos parasitos foi extraído e utilizado em reações de PCR, utilizando 50 ng de DNA de cada clone, tampão GoTaq Green 1X (Promega), 0,2 µM dNTP mix, 0,5 µM dos iniciadores SSU::APRTL.T.F e Overhang-XhoI-SAS.R (**Tabela 4**), 1,25 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), água ultra pura para completar o volume final para 20 µL. As reações de amplificação foram realizadas da seguinte forma: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando tampão TAE 1X e 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Bio-Rad). As bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (Cytiva/GE Healthcare). A confirmação dos níveis de expressão do gene LINF_120006700 nos clones selecionados foi realizada por RT-qPCR, utilizando os iniciadores específicos para o gene LINF_120006700.RT.F e LINF_120006700.RT.R (**Tabela 4**).

4.12. Purificação de formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* M2903

A forma evolutiva promastigota metacíclica é encontrada principalmente nos estágios finais de crescimento em cultura (fase estacionária). Esta é a forma infectante de parasitos do gênero *Leishmania* para o hospedeiro mamífero e, portanto, torna-se necessário seu enriquecimento para a utilização em experimentos de infecção *in vitro*, a fim de tornar os resultados obtidos reprodutíveis. Para isso, foi realizado um método adaptado de Spath e Berverley (2001), para isolamento de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* por centrifugação em gradiente de densidade, usando Ficoll (SPATH, BERVERLEY, 2001). Aproximadamente, 20 mL de culturas promastigotas envelhecidas (7 a 8 dias) de *L. braziliensis* M2903 foram centrifugadas a 2000 x g por 10 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 3 mL de meio 199 completo. Em um tubo falcon de 15 mL, foram adicionados 3 mL de Ficoll PM 400 (Sigma-Aldrich) 20%, uma segunda camada de 3 mL de Ficoll PM 400 (Sigma-Aldrich) 10%, e uma terceira camada que consiste na suspensão de parasitos em meio 199. Para criar o gradiente, a segunda e terceira camada foram adicionadas vagarosamente pela parede do tubo inclinado com o auxílio do pipetador. O gradiente foi então centrifugado 1300 x g por 10 min, à temperatura ambiente sem aceleração e freio. Após esta etapa é possível observar a formação de um anel turvo, que consiste das formas procíclicas do parasito (mais densas), e logo acima estão as formas metacíclicas (menos densas). Todo o conteúdo acima do anel turvo foi coletado e transferido para um outro tubo, e procedeu a lavagem completando o volume final de 15 ml com PBS 1X, e novamente o material foi centrifugado a 2000 x g por 10 min, à temperatura ambiente. Este último passo de centrifugação é essencial para concentrar os parasitos em um volume final em 1 mL e remover o Ficoll. Em seguida, é feita a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer.

4.13. Ensaio de infecção *in vitro*

Para a realização dos ensaios de infecção *in vitro*, foram utilizadas células THP-1 (ECAAC), uma linhagem de células humanas imortalizadas derivadas de um paciente com leucemia monocítica aguda. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), pH 7,2, suplementado com 10% de SFB inativado (Thermo Fisher Scientific), 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e 2 mM de L-glutamina (Thermo Fisher Scientific). O subcultivo foi realizado a cada dois ou três dias, sempre na proporção de 1:5. Para a infecção *in vitro*, as células foram centrifugadas 180 x g por 5 min a 4 °C e ressuspendidas em meio RPMI, nas mesmas condições citadas acima, seguido da adição de PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato, Sigma-Aldrich), na concentração de 40 ng/mL. PMA estimula a diferenciação das formas monocíticas para macrófagos. As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células por poço em placas de 24 poços (KASVI), contendo lamínulas de vidro de 13 mm e incubados durante 72 h a 37 °C e 5% de CO₂ para completa diferenciação. Posteriormente, as células foram lavadas em meio RPMI para remover células não aderentes. Promastigotas metacíclicas *wild type* e mutantes foram plaqueados, 2×10^6 parasitos por poço e incubados com os macrófagos a uma proporção de 1:10 durante 4 h. Após o tempo de infecção, as células foram lavadas 3 vezes com meio RPMI. Foram avaliados os períodos de 4 h, 24 h e 48 h subsequentes a infecção e mantidas durante todo o período de experimentação em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

Posteriormente, as lamínulas foram coradas pelo método panótico rápido (Laboclin, PR, Brazil). Resumidamente, as lamínulas contendo macrófagos aderentes infectados foram imersas em solução fixadora N° 1 (verde rápido em metanol) por 60 s, seguido pelo mesmo procedimento utilizando a solução corante N° 2 (eosina G em tampão fosfato - cor vermelha) e a solução corante N° 3 (corante tiazina em tampão fosfato - cor azul). As lamínulas foram lavadas com PBS 1X, secas e montadas em lâminas de microscopia, usando Entellan (Merck Millipore). A infecção foi quantificada por contagem de células infectadas e amastigotas intracelulares por 500 células em microscópio óptico. Os ensaios foram realizados em triplicata e replicata técnica.

4.14. Curva de crescimento

Curvas de crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* M2903 *wild type* e mutantes (parasitos expressando Cas9/T7 RNA polimerase, parasitos *knockouts* do gene LbrM2903_340062700 e parasitos *knock-in* do gene LINF_120006700) foram obtidas através da avaliação da densidade da cultura. Para isso, 5×10^5 parasitos/mL de cada cultura, em fase log inicial de crescimento, foram adicionados em 5 mL de meio 199 (Sigma-Aldrich). Ao longo de um período de 7 dias, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer para a montagem das curvas. As culturas e a contagem dos parasitos foram realizadas em duplicata.

4.15. Extração e purificação de GIPLs

Cerca de 10^9 formas promastigotas de *Leishmania* foram mantidas em cultura até o início da fase estacionária e então foram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS 1X. Após a obtenção do *pellet*, adicionou-se 2,5 ml de clorofórmio/metanol (3:2, v/v) e 0,5 ml de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 4 mM, seguido de uma nova centrifugação a 2100 x g por 7 min. O material foi sonicado e centrifugado novamente a 2100 x g por 7 min. As fases aquosas, superior e inferior, foram descartadas e este procedimento foi repetido. À fase sólida intermediária foram adicionados 2,5 mL de $MgCl_2$ 4 mM, seguido do procedimento de sonicação e centrifugação a 2100 x g por 7 min. Este passo foi repetido e no final o sobrenadante foi descartado. Na etapa seguinte, foram adicionados 3 mL de clorofórmio/metanol/água (10:10:3, v/v) e 0,5 mL de clorofórmio/metanol (1:1, v/v), este último adicionado apenas na primeira centrifugação. O material foi centrifugado 3 vezes a 2100 x g por 7 min e o sobrenadante foi coletado. Os sobrenadantes contendo GIPLs coletados nas etapas anteriores foram juntos em um *pool* e secos por evaporação em banho sob fluxo de N_2 . Este material seco contendo os GIPLs foi diluído em acetato de amônio a 0,1 M com 5% de 1-propanol e aplicado em uma coluna de Octil-sepharose (80 mL) equilibrada na mesma solução.

Na etapa seguinte, já com as amostras na coluna, foi aplicado um gradiente contínuo de 1-propanol de 5 a 60% em acetato de amônio 0,1 M. Foram coletadas frações de 3 mL e a presença dos GIPLs foi confirmada aplicando-se 2 mL de cada fração em uma placa de

cromatografia em camada delgada (CCD). Após aspersão da placa com uma mistura de orcinol:ácido sulfúrico (1:1), a placa foi aquecida a 100 °C por 5 min. A presença dos GIPLs foi confirmada a partir do aparecimento de uma coloração roxa (ORLANDI; TURCO, 1987).

As porções glicídicas dos GIPLs foram submetidas a hidrólise ácida forte (ácido trifluoroacético a 2 N, 3 h a 100 °C) e secas em *speed-vac*. Ao material seco, foram adicionados 500 µL de tolueno para remover o ácido, o material foi homogeneizado em vórtex e evaporado sob N₂. Este procedimento foi repetido 1 vez. As amostras foram então dissolvidas em 500 µL de água e o sal foi removido por cromatografia de troca iônica (SOARES et al., 2002). As amostras dissolvidas em 500 µL de água foram aplicadas em uma coluna contendo a resina AG1-X8 sobre a resina AG50W-X12 (cerca de 500 µL de cada). As amostras foram eluídas em 5 mL de água e secas em *speed-vac* (COELHO-FINAMORE et al., 2011).

4.16. Eletroforese de carboidratos marcados por fluoróforos (FACE)

Um décimo do volume das amostras obtidas no passo anterior foi utilizado para análise dos monossacarídeos, utilizando a técnica de FACE. As amostras foram marcadas com AMAC 0,1 M (2-aminoacridona) em ácido acético 5% e cianoborohidreto de sódio 1 M em THF.

A separação dos monossacarídeos foi realizada por eletroforese em gel de resolução (19% acrilamida-1% bis-acrilamida em Tris-HCl 0,5 M, ácido bórico 0,5 M, pH 7,0) sob um gel de concentração (5% acrilamida-1,25% bis-acrilamida em Tris-HCl 0,5 M, ácido bórico 0,5 M, pH 6,8), em tampão de corrida composto por Tris-base 0,12 M, glicina 0,1 M e ácido bórico 0,1 M, pH 8,3. Os resultados foram visualizados sob luz UV. Um padrão contendo 0,5 mg/mL de monossacarídeos D-galactose e D-manose (Sigma) foi utilizado para determinar a composição de monossacarídeos nas amostras (COELHO-FINAMORE et al., 2011; SOARES et al., 2004).

4.17. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8 (Prism Software). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. Dependendo da natureza dos dados em relação à normalidade, foram empregadas diferentes estratégias de análise: para dados paramétricos, foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para comparações entre formas evolutivas; e para os dados não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Para a representação gráfica, os seguintes símbolos foram utilizados: * quando $p < 0,05$; ** quando $p < 0,01$ e *** quando $p < 0,001$.

5. Resultados

5.1. Seleção de genes que codificam enzimas envolvidas em reações metabólicas relacionadas ao processo de glicosilação em *Leishmania*

Em estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa, reações metabólicas de diferentes tripanossomatídeos foram recuperadas do KEGG, para avaliar o impacto da evolução dos genomas na adaptação de tripanossomatídeos à invasão e sobrevivência em células de mamíferos (MENDES, 2015). Para isso, foram feitas a reconstrução de redes metabólicas baseadas em dados genômicos de 17 espécies de tripanossomatídeos, classificadas em patogênicos extracelulares, patogênicos e apatogênicos, e a simulação de fluxos metabólicos (MENDES, 2015).

O perfil de agrupamento das espécies baseado na presença e na ausência de enzimas estratificadas entre as principais vias metabólicas descritas no banco de dados KEGG foram avaliados pela construção de dendrogramas (**Figura 4**). Na **Figura 4A**, em que o dendrograma representa o agrupamento baseado em todas as vias metabólicas, é possível observar um grupo contendo apenas espécies de *Leishmania*, no qual *L. braziliensis* é a mais divergente entre elas. Nota-se que, nos agrupamentos estratificados para as diferentes vias metabólicas (**Figuras 4B-I**), as espécies de *Leishmania* tendem a agrupar entre si na maioria das vias, uma das exceções é o agrupamento das reações metabólicas associadas ao processo de glicosilação (**Figura 4G**), no qual é possível observar que a espécie apatogênica *L. tarentolae* agrupou-se com tripanossomatídeos parasitos exclusivamente de insetos, e a espécie *L. braziliensis* deslocou de posição, agrupando-se com espécies não patogênicas para mamíferos *L. tarentolae*, *Strigomonas culicis* e *Angomonas deanei*. Esta variação no padrão de agrupamento entre as espécies de *Leishmania* referente à biossíntese e metabolismo de glicanos é responsável por gerar uma alteração significativa na topologia da árvore. Esta tendência é significativa quando comparada aos demais dendrogramas, com alterações sustentadas por valores de *bootstrap* acima de 50%. Esse perfil observado é devido à ausência de reações catalisadas pela enzima α -1,2-manosiltransferase (Alg11), ausente em *L. tarentolae* e presente em todas as outras espécies de *Leishmania* com capacidade de infectar mamíferos (**Figura 5A**). Outra reação que contribuiu para a alteração no perfil observado

também está envolvida com a adição de manose em glicoproteínas e é catalisada pela enzima α -1,2-manosiltransferase (Alg9) e está ausente em *L. braziliensis* e *L. tarentolae* (**Figura 5B**).

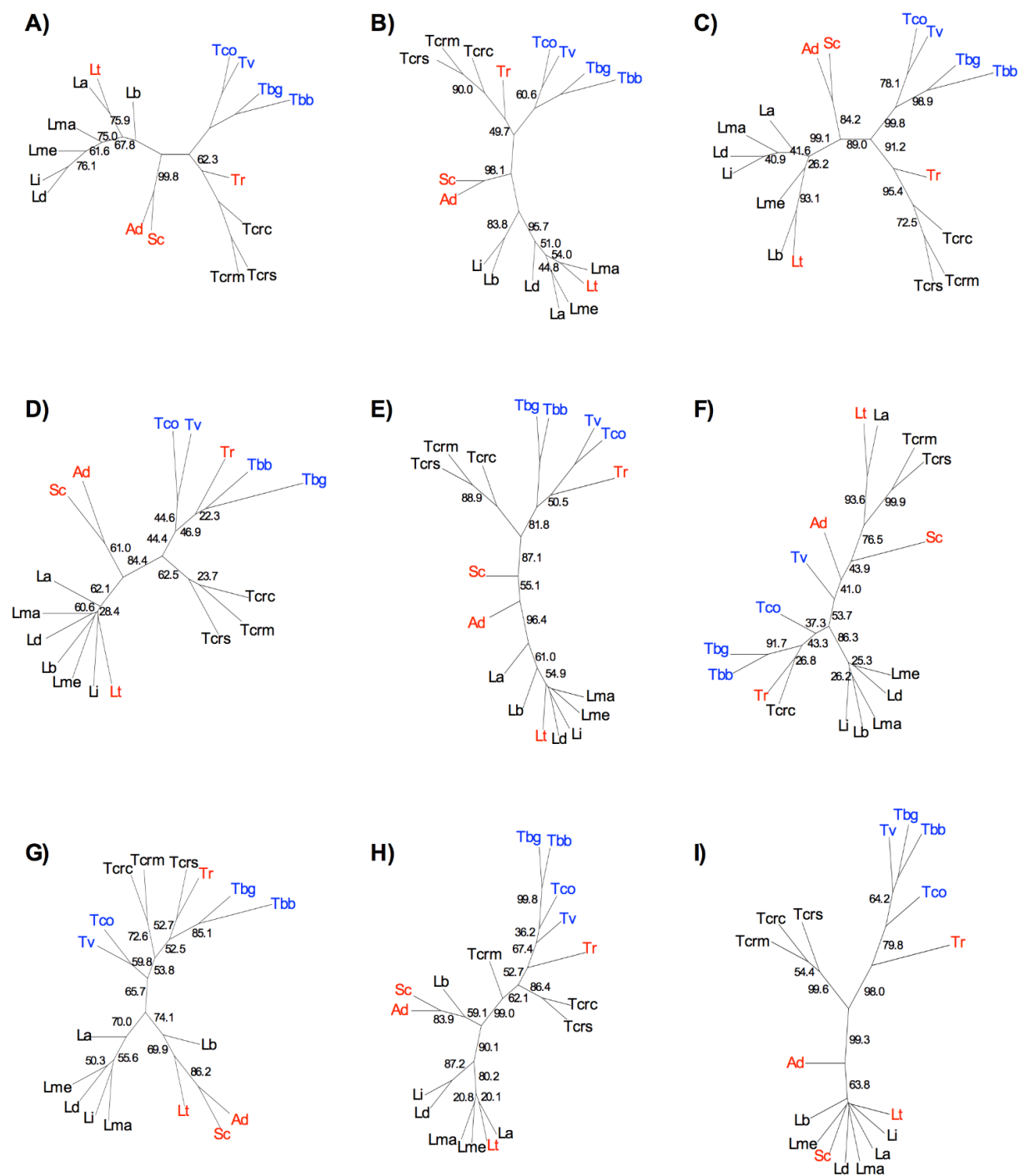


Figura 4: Agrupamento hierárquico aglomerativo baseado na presença ou ausência de reações metabólicas em tripanossomatídeos. (A) Agrupamento baseado em todas as reações metabólicas. Agrupamentos estratificados para as diferentes vias metabólicas: **(B)** Metabolismo de aminoácidos; **(C)** Metabolismo de carboidratos; **(D)** Metabolismo

energético; **(E)** Metabolismo de lipídeos; **(F)** Metabolismo de nucleotídeos; **(G)** Biossíntese e metabolismo de glicanos; **(H)** Metabolismo de cofatores e vitaminas; e **(I)** Biossíntese de metabólitos secundários. Códigos com fonte preta representam tripanossomatídeos com capacidade de invadir e sobreviver em células de hospedeiros mamíferos; com fonte azul representam parasitos extracelulares; e com fonte vermelha representam apatogênicos para mamíferos. Os números nos ramos indicam os valores de bootstrap menores que 100%, ramos sem valores numéricos possuem bootstrap de 100%. **Ad**, *Angomonas deanei*; **La**, *Leishmania amazonensis*; **Lb**, *Leishmania braziliensis*; **Ld**, *Leishmania donovani*; **Li**, *Leishmania infantum*; **Lma**, *Leishmania major*; **Lme**, *Leishmania mexicana*; **Lt**, *Leishmania tarentolae*; **Sc**, *Strigomonas culicis*; **Tbb**, *Trypanosoma brucei brucei*; **Tbg**, *Trypanosoma brucei gambiense*; **Tco**, *Trypanosoma congolense*; **Tcrc**, *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener; **Tcrm**, *Trypanosoma cruzi marinkellei*; **Tcrs**, *Trypanosoma cruzi* cepa Sylvio X10-1; **Tr** – *Trypanosoma rangeli* **Tv**, *Trypanosoma vivax*. Essas análises foram realizadas por Mendes (2015).

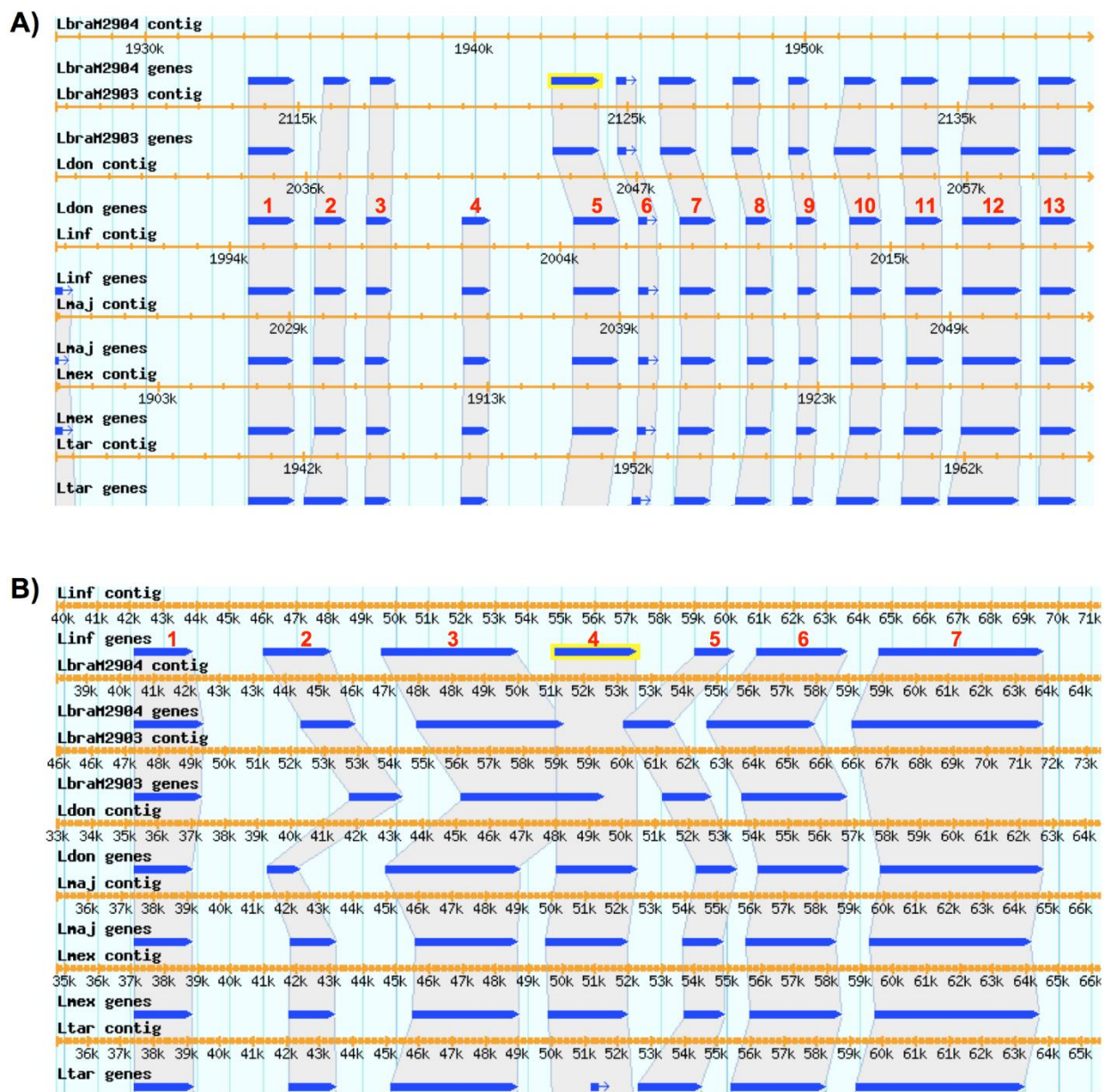


Figura 5: Comparação de regiões genômicas de diferentes espécies de *Leishmania* contendo genes codificadores de enzimas da via de biossíntese de glicanos. (A) Região genômica do cromossomo 34 de *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. tarentolae* e cromossomo 35 de *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major*, que contém o gene α -1,2-manosiltransferase (Alg11), indicado pelo número 5 em vermelho. Esse gene está ausente em *L. tarentolae* e presente nas demais espécies. (B) Região do cromossomo 12 de diferentes espécies de *Leishmania* contendo o gene α -1,2-manosiltransferase (Alg9), indicado pelo número 4 em

vermelho. Esse gene está ausente em *L. braziliensis* e *L. tarentolae* e presente nas demais espécies. (MENDES, 2015).

Estas duas enzimas estão relacionadas à transferência de manose para glicoproteínas presentes na superfície do parasito. O gene Alg11, uma α -1,2-mannosiltransferase, atua adicionando dois resíduos de manose a uma cadeia crescente de glicano na via da *N*-glicosilação no lado citosólico da membrana do RE. Por sua vez, Alg9, também uma α -1-2 mannosiltransferase, adiciona dois resíduos de manose ao glicano que está sendo sintetizado no lado luminal do RE. Estes dois genes parecem ser importantes na diferenciação de espécies patogênicas de *Leishmania* de espécies apatogênicas como *L. tarentolae*.

5.2. Quantificação de glicoconjugados na superfície de tripanossomatídeos por citometria de fluxo

Para validar a hipótese de que as enzimas α -1,2-mannosiltransferase Alg9 e Alg11 são expressas diferencialmente entre as espécies de *Leishmania*, foram realizados ensaios de citometria de fluxo a fim de quantificar a proporção de glicanos de superfície entre as diferentes espécies de *Leishmania* (MENDES, 2015). Formas promastigotas e amastigotas axênicas dos parasitos foram marcadas com a lectina Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (ConA), que reconhece resíduos terminais de α -D-manose e α -D-glicose de glicoconjugados (CLEGG et al., 1981; KIERNAN, 1975). Os parasitos foram incubados com a lectina ConA marcada com fluorescência e com a lectina ConA previamente tratada com o seu ligante específico (inibidor metil- α -D-manopiranosídeo), que compete pelo mesmo sítio de ligação da lectina ao carboidrato. Como controle, parasitos não marcados foram utilizados. A marcação com ConA foi específica para resíduos de manose, uma vez que o tratamento prévio com o inibidor metil- α -D-manopiranosídeo reduziu completamente o sinal ao mesmo nível de parasitos não marcados para todas as espécies e formas evolutivas (**Figuras 6 e 7**). Confirmando os dados obtidos a partir das análises *in silico*, *L. tarentolae* apresentou uma menor quantidade de glicoconjugados contendo manose e/ou glicose comparado com as espécies patogênicas, tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas

axênicas (**Figuras 6 e 7**). *L. braziliensis* também apresentou uma redução da marcação para esses carboidratos em relação às formas amastigotas axênicas das outras espécies avaliadas (**Figuras 6 e 7**). Comparando a marcação entre os estágios evolutivos promastigota e amastigota axênica, pode ser observada uma maior marcação nas formas amastigotas axênicas em relação as formas promastigotas nas espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. mexicana* (**Figura 7**). Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão.

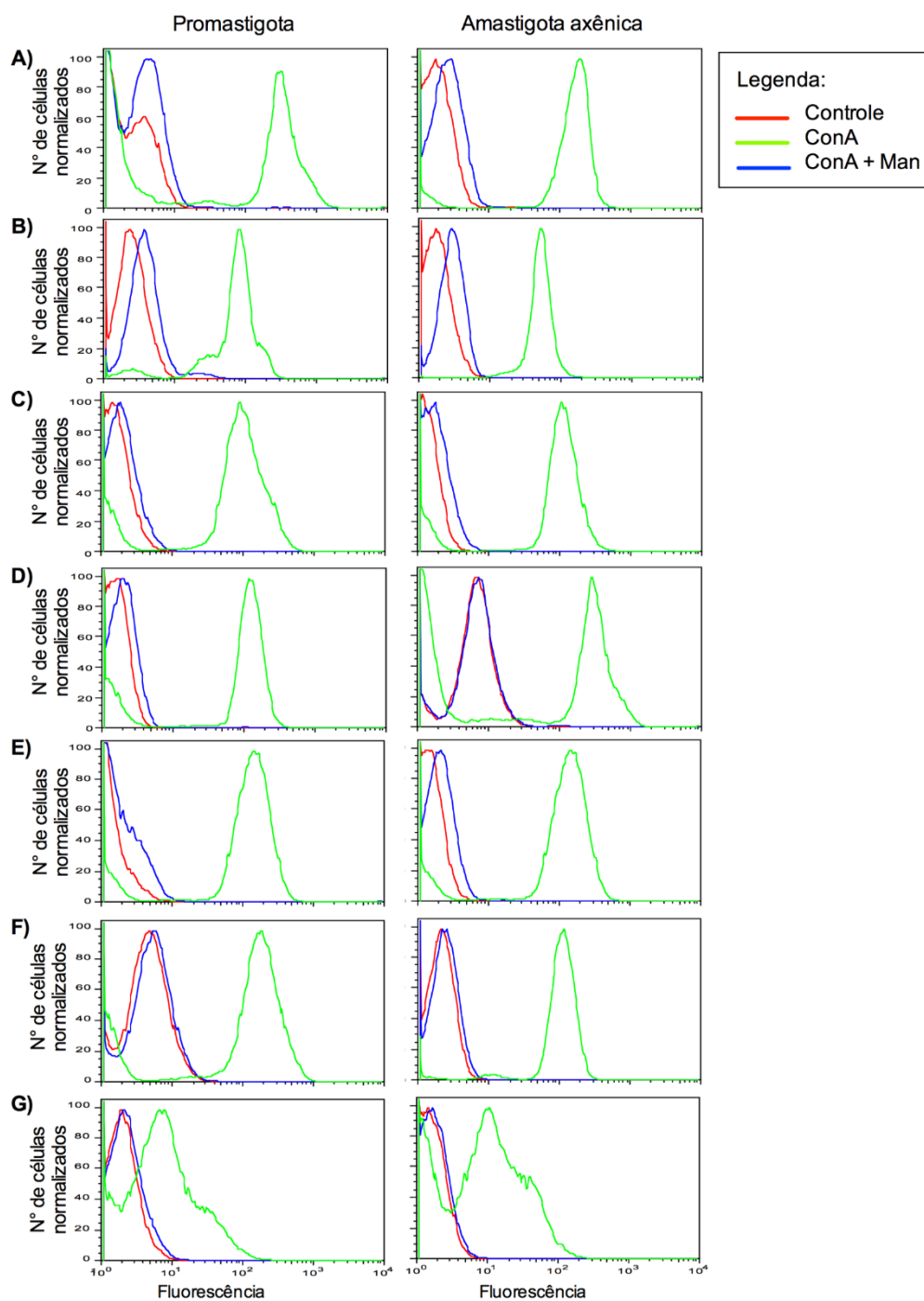


Figura 6: Quantificação da fluorescência derivada da marcação de glicoproteínas de superfície de formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania* com a lectina ConA. (A) *L. amazonensis*. (B) *L. braziliensis*. (C) *L. donovani*. (D) *L. infantum*. (E) *L. major* (F) *L. mexicana*. (G) *L. tarentolae*. ConA: lectina Concanvalina A de *Canavalia*

ensiformis. ConA + Man: amostras incubadas com concanavalina A previamente tratadas com seu inibidor metil- α -D-manopiranosídeo. Controle: parasitos não marcados. Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão (MENDES, 2015).

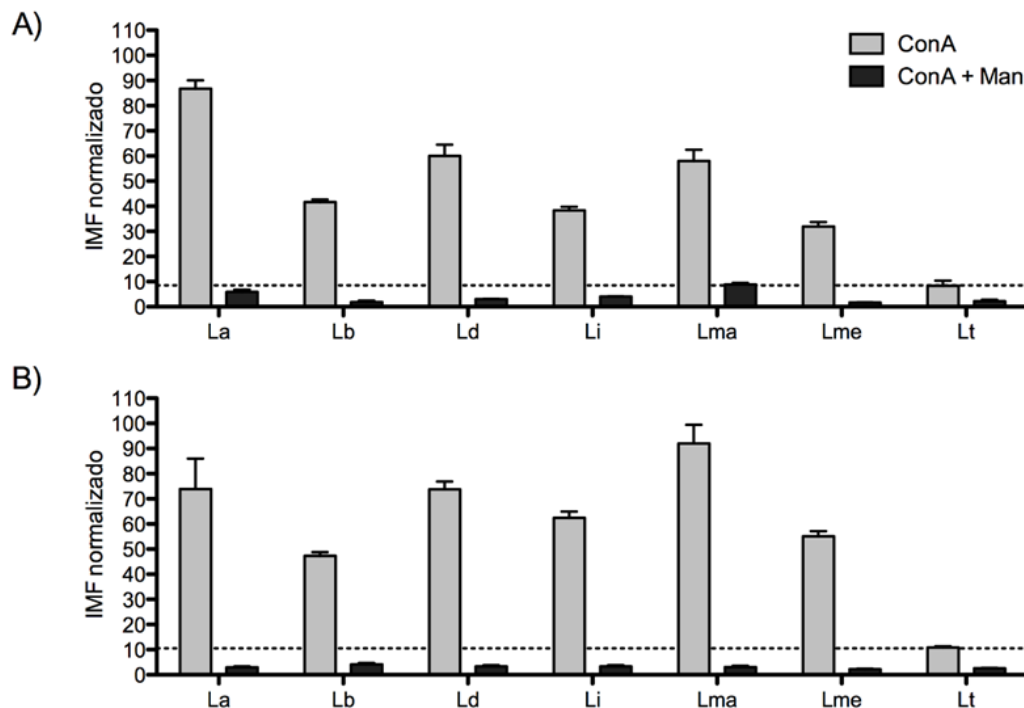


Figura 7: Intensidade média de fluorescência de parasitos marcados com a lectina Concanavalina A de *Canavalia Ensiformes*. (A) Perfil de marcação em formas promastigotas. (B) Perfil de marcação em formas amastigotas axênicas. ConA, lectina Concanavalina A de *Canavalia ensiformis*. ConA + Man, amostras incubadas com concanavalina A previamente tratadas com seu inibidor metil- α -D-manopiranosídeo. Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão (MENDES, 2015).

5.3. Análises *in silico* dos genes envolvidos na via de *N*-glicosilação de parasitos do gênero *Leishmania*

Como a ausência de dois genes (Alg11 e Alg9) envolvidos na via de *N*-glicosilação de duas espécies de *Leishmania* foi capaz de provocar alterações na topologia do dendograma relacionados à biossíntese e metabolismo de glicanos em tripanossomatídeos, foram realizadas análises *in silico* para a identificação dos demais genes envolvidos nessa via em diferentes espécies desse gênero (**Figura 8** e **Tabela 5**). Foram identificados 10 genes envolvidos na via de *N*-glicosilação, baseado nas sequências anotadas no banco de dados TriTrypDB para 13 espécies de *Leishmania*. Esses genes são conservados na maioria das espécies avaliadas. As exceções são: o gene Alg11 (codifica uma α -1,2-manosiltransferase) ausente em *L. tarentolae*, como descrito anteriormente; o gene Alg9 (α -1,2-manosiltransferase) ausente em *L. panamensis*, além de *L. braziliensis* e *L. tarentolae*, já relatado anteriormente; e o gene MOGS (manosil-oligossacarídeo glicosidase) ausente em *L. enrietti* (**Tabela 5**). Alguns dos genes já identificados como parte da via de *N*-glicosilação em *S. cerevisiae*, como Alg12 (α -1,6-manosiltransferase), Alg6 (α -1,3-glicosiltransferase), Alg8 (α -1,3-glicosiltransferase) e Alg10 (α -1,2-glicosiltransferase), não foram descritos e/ou identificados em *Leishmania* (**Figura 8**).

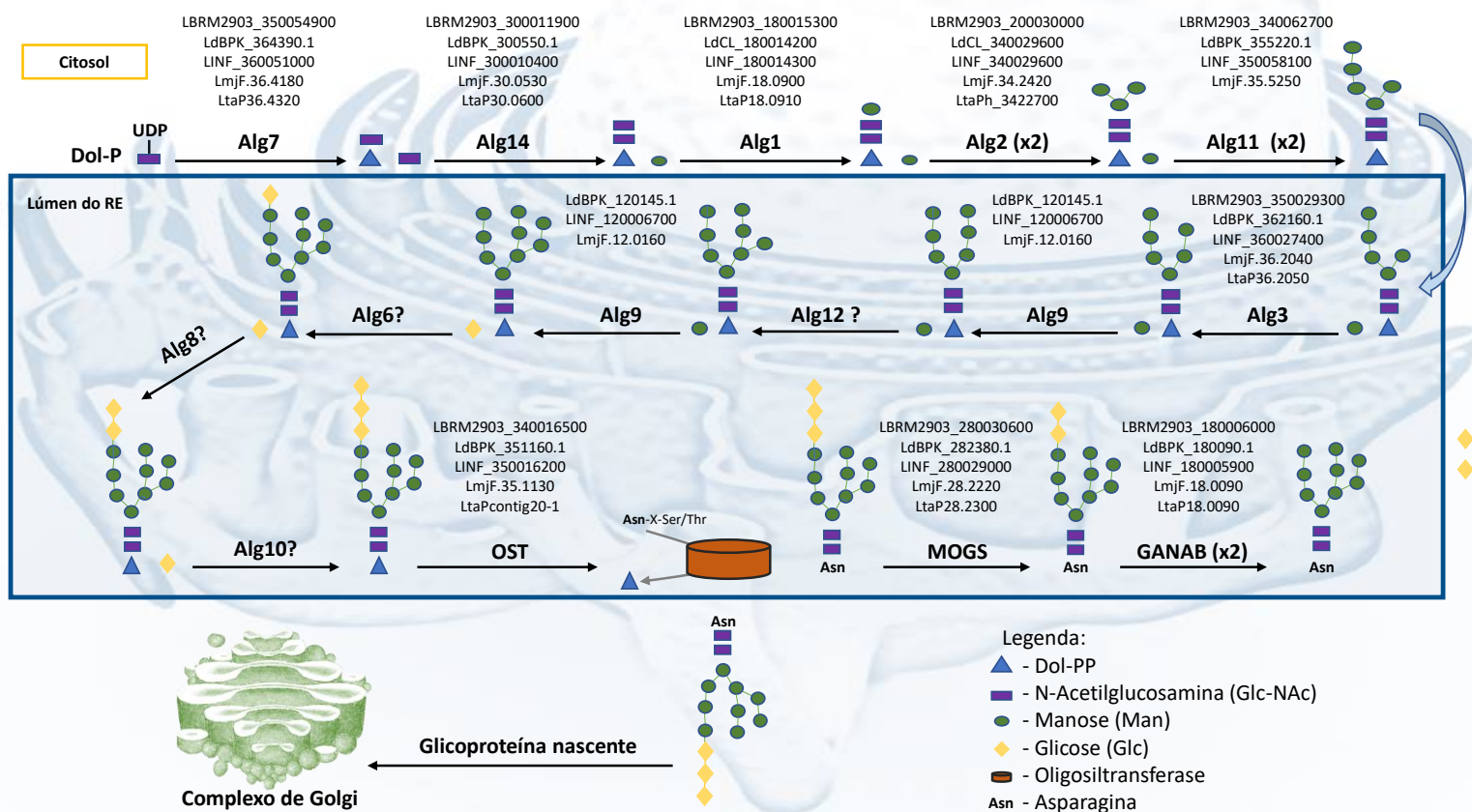


Figura 8: Representação esquemática da via de N-glicosilação em parasitos do gênero *Leishmania*. Enzimas: **Alg7:** UDP-N-acetilglucosamina-dolicil-fosfato N-acetilglucosamina fosfotransferase; **Alg14:** UDP-N-acetilglucosamina transferase; **Alg1:** β -1,4-mannosiltransferase; **Alg2:** α -1,3/1,6-manosiltransferase; **Alg11:** α -1,2-manosiltransferase; **Alg3:** α -1,3-manosiltransferase; **Alg9:** α -1,2-manosiltransferase; **Alg12:** α -1,6-manosiltransferase; **Alg6:** α -1,3-glicosiltransferase; **Alg8:** α -1,3-glicosiltransferase; **Alg10:** α -1,2-glicosiltransferase; **OST:** oligossacaril-transferase; **MOGS:** manosil-oligossacarídeo glicosidase; **GANAB:** alfa-glicosidase neutra AB. Os identificadores dos genes que codificam as enzimas em diferentes espécies de *Leishmania* estão indicados acima das setas na via. Adaptado de Mule et al. (2020).

Tabela 5: Identificação *in silico* dos genes envolvidos na via de *N*-glicosilação de parasitos do gênero *Leishmania*

Organismo	Alg7	Alg14	Alg1	Alg2	Alg11	Alg3	Alg9	OST	MOGS	GANAB
<i>L. amazonensis</i>	LAMA_00034 9000	LAMA_00059 1500	LAMA_00028 2200	LAMA_00074 7500	LAMA_00081 9000	LAMA_00032 7100	LAMA_00018 5400	LAMA_00077 8500	LAMA_00057 7300	LAMA_00027 4600
<i>L. braziliensis</i>	LBRM2903_35 0054900	LBRM2903_30 0011900	LBRM2903_18 0015300	LBRM2903_20 0030000	LBRM2903_34 0062700	LBRM2903_35 0029300	ni	LBRM2903_34 0016500	LBRM2903_28 0030600	LBRM2903_18 0006000
<i>L. donovani</i>	LdBPK_36439 0.1	LdBPK_30055 0.1	LdBPK_18090 0.1	LdBPK_34219 0.1	LdBPK_35522 0.1	LdBPK_36216 0.1	LdBPK_12014 5.1	LdBPK_35116 0.1	LdBPK_28238 0.1	LdBPK_18009 0.1
<i>L. enrietti</i>	LENLEM3045 _360051700	LENLEM3045 _300011300	LENLEM3045 _180014700	LENLEM3045 _340025800	LENLEM3045 _350060600	LENLEM3045 _360027100	LENLEM3045 _120006900	LENLEM3045 _350016000	ni	CUR178_0697 0
<i>L. gerbilli</i>	LGELEM452_ 360051700	LGELEM452_ 300010700	LGELEM452_ 180013800	LGELEM452_ 340023200	LGELEM452_ 350059500	LGELEM452_ 360027000	LGELEM452_ 120007000	LGELEM452_ 350016800	LGELEM452_ 280030300	LGELEM452_ 180005900
<i>L. infantum</i>	LINF_3600510 00	LINF_3000104 00	LINF_1800143 00	LINF_3400296 00	LINF_3500581 00	LINF_3600274 00	LINF_1200067 00	LINF_3500162 00	LINF_2800290 00	LINF_1800059 00
<i>L. major</i>	LmjF.36.4180	LmjF.30.0530	LmjF.18.0900	LmjF.34.2420	LmjF.35.5250	LmjF.36.2040	LmjF.12.0160	LmjF.35.1140	LmjF.28.2220	LmjF.18.0090
<i>L. martiniquensis</i>	LMARLEM24 94_360051400	LMARLEM24 94_300011300	LMARLEM24 94_180014500	LMARLEM24 94_340027400	LMARLEM24 94_350058900	LMARLEM24 94_000018300	LSCM1_07826	LMARLEM24 94_000016000	LMARLEM24 94_280031800	LMARLEM24 94_180005900
<i>L. mexicana</i>	LmxM.36.4180	LmxM.29.0530	LmxM.18.0900	LmxM.33.2420	LmxM.34.5250	LmxM.36.2040	LmxM.12.0160	LmxM.34.1150	LmxM.28.2220	LmxM.18.0090
<i>L. panamensis</i>	LPAL13_3500 51100	LPAL13_3000 10800	LPAL13_1800 11900	LPAL13_2000 26500	LPAL13_3400 59000	LPAL13_3500 27300	ni	LPAL13_3400 15500	LPAL13_2800 29800	LPAL13_1800 06000
<i>L. tarentolae</i>	LtaP36.4320	LtaP30.0600	LtaP18.0910	LtaP34.2270	ni	LtaP36.2050	ni	LtaP35.1240	LtaP28.2300	LtaP18.0090
<i>L. tropica</i>	LTRL590_360 052700	LTULEM423_ 300011000	LTRL590_180 014400	LTRL590_340 028400	LTRL590_350 059700	LTRL590_360 027700	LTRL590_120 006900	LTRL590_350 016400	LTRL590_280 029800	LTRL590_180 006000
<i>L. turanica</i>	LTULEM423_ 360052100	LTULEM423_ 300011000	LTULEM423_ 180014400	LTULEM423_ 340023100	LTULEM423_ 350059200	LTULEM423_ 360027600	LTULEM423_ 120007000	LTULEM423_ 350017000	LTULEM423_ 280029500	LTULEM423_ 180005900

ni: não identificado nas análises *in silico* no banco de dados do TritypDB

Alg7: UDP-*N*-acetilglucosamina-dolicil-fosfato *N*-acetilglucosaminafosfotransferase; **Alg14:** UDP-*N*-acetilglucosamina transferase; **Alg1:** β-1,4-mannosiltransferase; **Alg2:** α-1,3/1,6-manosiltransferase; **Alg11:** α-1,2-manosiltransferase; **Alg3:** α-1,3-manosiltransferase; **Alg9:** α-1,2-manosiltransferase; **OST:** oligossacaril-transferase; **MOGS:** manosil-oligossacarídeo glicosidase; **GANAB:** alfa-glicosidase neutra AB.

Em eucariotos, o processo de *N*-glicosilação envolve a ligação covalente de um oligossacarídeo ao nitrogênio da amida da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos asparagina de proteínas aceptoras. Este processo inicia-se no lado citosólico da membrana do retículo endoplasmático, onde dolícilfosfato (Dol-P) é fosforilado a dolícildifosfato (Dol-PP) e ligado a uma molécula de *N*-acetilglucosamina pela ação da enzima Alg7 (UDP-*N*-acetilglucosamina-dolícil-fosfato *N*-acetilglucosamina fosfotransferase). Em seguida, a enzima Alg14 (UDP-*N*-acetilglucosamina transferase) adiciona uma segunda molécula de *N*-acetilglucosamina ao glicano. Logo após, a enzima Alg1 (β -1,4-manosiltransferase) adiciona a primeira molécula de manose ao glicano em formação e, subsequentemente, Alg2 (α -1,3/1,6-manosiltransferase) adiciona a segunda e terceira moléculas de manose. Em seguida, Alg11 (α -1,2-manosiltransferase) atua adicionando a quarta e quinta moléculas de manose ao glicano. No lúmen do retículo endoplasmático, mais uma molécula de manose é adicionada pela enzima Alg3 (α -1,3-manosiltransferase), seguido da adição do sétimo resíduo de manose pela ação da enzima Alg9 (α -1,2-manosiltransferase). Em *S. cerevisiae*, a enzima Alg12 (α -1,6-manosiltransferase) adiciona um oitavo resíduo de manose à cadeia crescente de oligossacarídeo (LARKIN, IMPERIALI, 2011). Em *T. brucei*, o gene que codifica essa enzima também já foi identificado (LEAL et al., 2004), o mesmo não ocorrendo em *Leishmania*. Em seguida, um último resíduo de manose pode ser adicionado novamente pela ação da enzima Alg9. As glicosiltransferases Alg6 (α -1,3-glicosiltransferase), Alg8 (α -1,3-glicosiltransferase) e Alg10 (α -1,2-glicosiltransferase) também não foram descritas em *Leishmania* (PARODI et al., 1984; PARODI, 1993; MULE et al., 2020) e não foram encontradas nas análises *in silico* realizadas. A enzima OST (oligossacaril-transferase) catalisa a transferência em bloco do oligossacarídeo de Dol-PP para a cadeia lateral de asparagina da proteína aceptora. As glicoproteínas recém-formadas podem ser processadas por uma série de glicosidases e glicosiltransferases no RE e no complexo de Golgi para remodelar o núcleo de sacarídeo, resultando em uma grande diversidade de estruturas de glicanos observadas em eucariotos e nas diferentes espécies e formas evolutivas dos parasitos (PARODI, 1993; HERSCOVICS, 1999; ROTH, 2002; ASSIS et al., 2012; MULE et al., 2020).

5.4. Avaliação dos níveis de expressão de RNA dos genes Alg11 e Alg9 em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*

Para avaliar os níveis de expressão de mRNA dos genes alvo deste estudo, foi realizada RT-qPCR utilizando formas promastigotas, amastigotas axênicas (com 12 e 36 h de diferenciação) e amastigotas intracelulares, obtidas através da infecção *in vitro* em células DH82, referentes às espécies: *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tarentolae* (**Figura 9**). O gene LbrM2903_340062700, que codifica a α -1,2-manosiltransferase (Alg11), apresentou expressão em formas promastigotas, amastigotas axênicas e intracelulares em todas as espécies patogênicas avaliadas e, como esperado, não foi detectada a expressão desse gene em *L. tarentolae* (**Figura 9A**). Foi observada também uma maior expressão desse gene em promastigotas de *L. braziliensis* em relação as demais espécies patogênicas (**Figura 9A**). Para o gene LINF_120006700, que codifica a α -1,2-manosiltransferase (Alg9), os resultados confirmam a ausência de expressão do gene em *L. braziliensis* e *L. tarentolae* e ainda revelam uma maior expressão desse gene em formas amastigotas de *L. donovani* e *L. infantum* (**Figura 9B**).

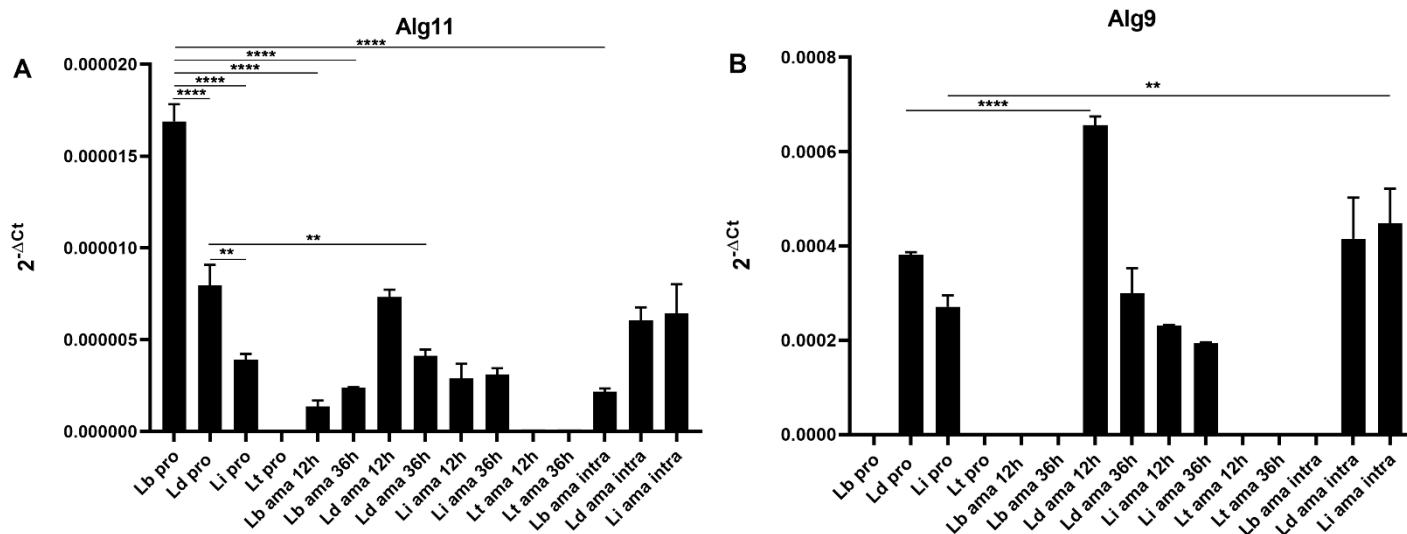


Figura 9: Análise da expressão diferencial de RNA dos genes α -1,2-manosiltransferase Alg11 e Alg9 em formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tarentolae*. (A) LbrM2903_340062700 codifica a α -1,2-manosiltransferase Alg11; e (B) LINF_120006700 codifica a α -1,2-manosiltransferase Alg9. As análises foram realizadas por RT-qPCR, utilizando o método de $2^{-\Delta C_t}$. A expressão do gene de 7SL *Spliced leader* foi usada como normalizador. Pro: promastigotas; Ama 12h e Ama 36h: amastigotas axênicas com 12 e 36 horas de diferenciação; Ama intra: amastigotas intracelulares. Lb: *L. braziliensis*; Ld: *L. donovani*; Li: *L. infantum*; Lt: *L. tarentolae*. Análises realizadas por One-way-ANOVA, seguidas do teste Tukey de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.5. Deleção e expressão (*knock-in*) dos genes selecionados envolvidos no metabolismo de glicanos em *Leishmania*

Como exposto anteriormente, pouco se sabe sobre o processo de *N*-glicosilação em *Leishmania*, no entanto, este processo parece ser fundamental para diversas funções biológicas do parasito. Assim ao observar diferenças na expressão desses genes, que apesar de conservados entre a maioria das espécies estão ausentes em *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. tarentolae* (Alg9) e ausente em *L. tarentolae* (Alg11), decidimos então estudar melhor a função desses dois genes. Foram gerados parasitos mutantes através da deleção do gene LbrM2903_340062700 (Alg11) em *L. braziliensis* e o *knock-in* do gene LINF_120006700 (Alg9) de *L. infantum* em *L. braziliensis*.

Promastigotas de *L. braziliensis*, expressando a nuclease Cas9 de *S. pyogenes* e a T7 RNA polimerase, foram transfectadas com moldes de sgRNAs e o DNA *donor*, contendo o gene de resistência a blasticidina, ambos contendo sequências complementares ao gene LbrM2903_340062700 (Alg11). Após a realização da transfecção e seleção dos parasitos em placas contendo blasticidina, foi possível confirmar a deleção do gene Alg11 por PCR convencional (**Figura 10A**). A confirmação do *knockout* do gene foi realizada utilizando iniciadores internos ao gene LbrM2903_340062700, gerando um produto de 96 pb. Foi possível observar ausência de produto amplificado nos clones 1 a 5 e 10, indicando a deleção do gene. Por sua vez, os clones 6-9 e 11-12 apresentaram uma banda de 96 pb, indicando a presença de uma ou mais cópias desse gene no genoma (**Figura 10B**). Após a transfecção, a pressão seletiva que mantinha o plasmídeo episossomal (pT007), que permite a expressão da Cas9 foi retirada; concomitantemente, foi adicionada a pressão seletiva para a seleção dos mutantes utilizando blasticidina. Ao confirmar a correta deleção do gene Alg11, a pressão seletiva foi totalmente removida, pois a construção foi integrada ao genoma do parasito sendo assim estável na ausência de blasticidina.

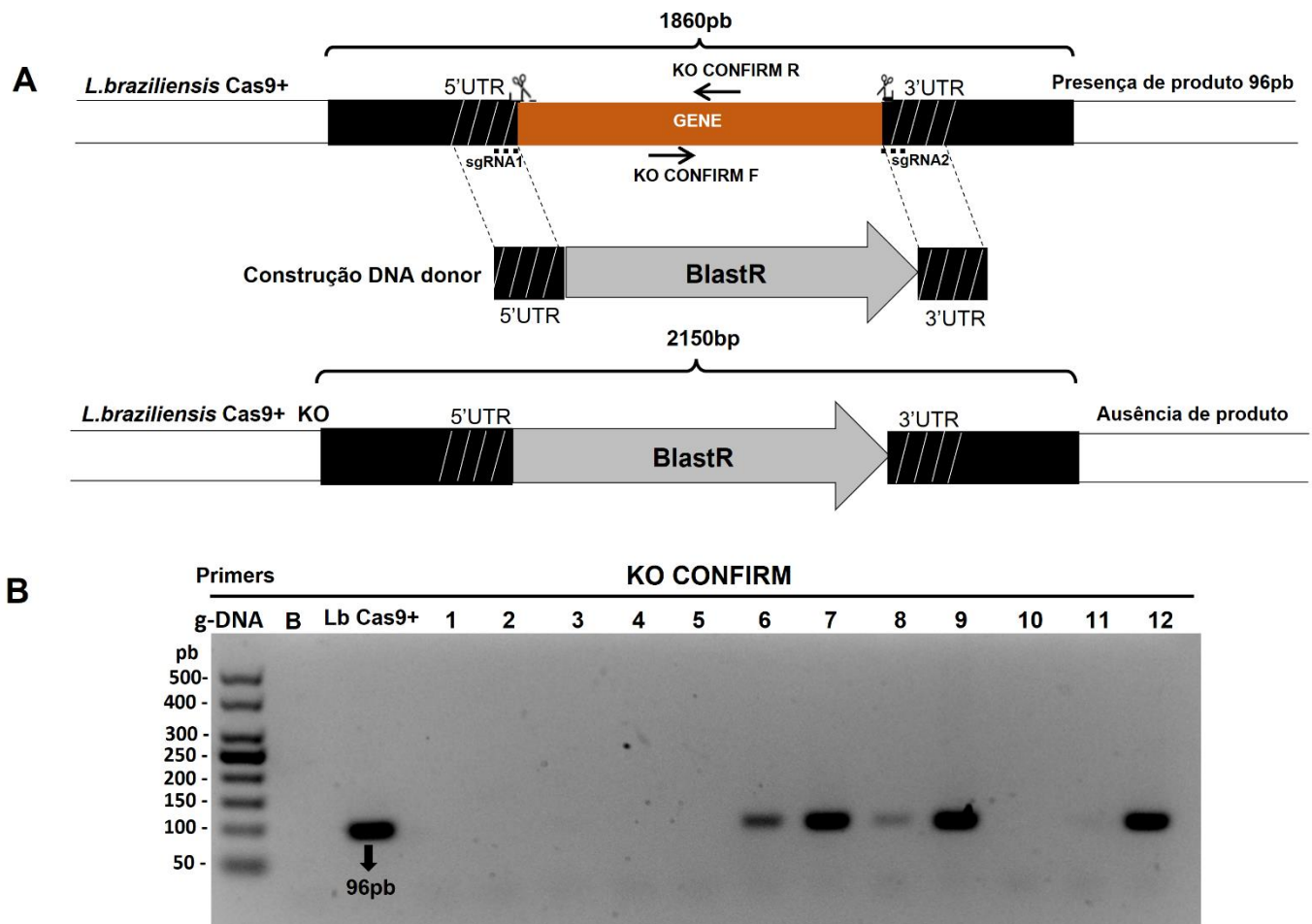


Figura 10: Geração de parasitos *knockouts* do gene LbrM2903_340062700 em *L. braziliensis*. (A) Esquema representando a estratégia para deleção do gene Alg11 do parasito. Na parte superior, estão representados o *locus* do gene LbrM2903_340062700, os locais de anelamento dos sgRNA 1 e 2 e reconhecimento e clivagem da Cas9, e o local de anelamento dos iniciadores usados para verificação do *knockout* por PCR. No meio, está representada a construção do DNA *donor*, contendo as 5' e 3' UTRs do gene Alg11 e o gene de resistência a blasticidina (proveniente do plasmídeo pTBlast), usada na transfecção para reparo da quebra das fitas gerada pela técnica de CRISPR-Cas9. E na parte inferior, está representado o locus após a deleção do gene Alg11 e a integração da construção no genoma. (B) Análise eletroforética em gel de agarose da PCR para confirmação da deleção do gene LbrM2903_340062700 nos clones dos parasitos. Foram utilizados iniciadores específicos que se anelam internamente no gene LbrM2903_340062700. O produto de 96 pb indica a presença do gene no DNA genômico dos parasitos, indicando a não deleção gênica ou a presença de pelo menos um alelo no

genoma. A ausência de banda no gel indica a deleção do gene (clones *knockout*). bp: pares de base; gDNA: DNA genômico; B: Controle negativo (branco); Lb Cas9⁺: *L. braziliensis* M2903 expressando a nuclease Cas9 de *S. pyogenes*; 1 a 12: clones de *L. braziliensis* transfectados para deleção do gene Alg11.

A geração de parasitos *L. braziliensis*, capazes de expressar o gene Alg9 através do *knock-in* do gene LINF_120006700, foi realizada pela transfecção do plasmídeo pSSUneo com a sequência codificadora de Alg9 de *L. infantum*. Após seleção dos parasitos com o antibiótico G418, foram obtidos clones em meio semi-sólido. A correta integração da construção contendo o gene LINF_120006700 no genoma de *L. braziliensis* foi confirmada por PCR convencional, utilizando um iniciador que se anela próximo ao local de inserção da construção no *locus* SSU rDNA e outro iniciador que se liga ao plasmídeo pSSUneo (**Figura 11A**). A amplificação de um produto de 800 pb é observada na PCR com o DNA dos clones em que a construção foi integrada corretamente no genoma. Todos os clones avaliados foram positivos para a presença da construção contendo o gene de Alg9 no *locus* de SSU rDNA (**Figura 11B**).

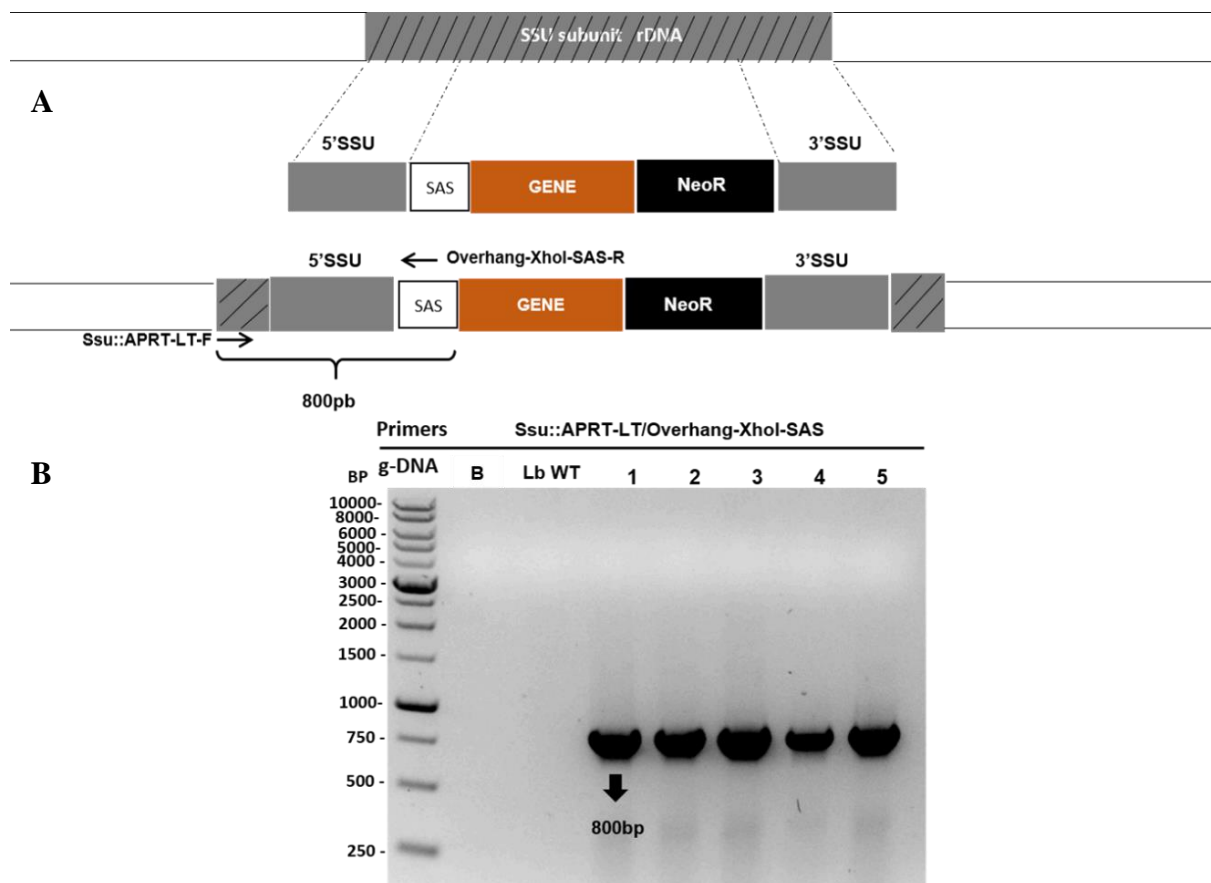


Figura 11: Geração de parasitos mutantes de *L. braziliensis knock-in* do gene LINF_120006700. (A) Esquema representando a estratégia para inserção do gene Alg9 de *L. infantum* no locus SSU rDNA de *L. braziliensis*. Na parte superior, está representado o locus SSU rDNA, onde o gene LINF_120006700 (Alg9) foi inserido após a transfecção. No meio, está representada a construção contendo o gene de interesse e o gene de resistência a geneticina. E na parte inferior, estão representados o locus após a inserção da construção, contendo o gene Alg9, no genoma e o local de anelamento dos iniciadores utilizados na PCR. SAS: *splicing acceptor site*. (B) Análise eletroforética em gel de agarose da PCR para confirmação da inserção do gene LINF_120006700 no genoma de *L. braziliensis*. O produto de 800 pb indica a correta integração da construção no locus do SSU rDNA de *L. braziliensis*. BP: pares de base; gDNA: DNA genômico; B: Controle negativo (branco); Lb WT: *L. braziliensis wild type*; 1 a 5: clones de *L. braziliensis* transfectados com o plasmídeo pSSUneo contendo o gene Alg9 de *L. infantum*.

5.6. Avaliação da expressão de mRNA dos genes selecionados em diferentes formas evolutivas de parasitos *wild-type* e mutantes de *L. braziliensis*

Para confirmar a deleção do gene LbrM2903_340062700 (Alg11) e o *knock-into* gene LINF_120006700 (Alg9) em *L. braziliensis*, os níveis de expressão de mRNA desses genes foram avaliados por RT-qPCR. Para a realização deste experimento, foram obtidas formas promastigotas e amastigotas intracelulares, cultivadas em células DH82, dos clones do *knockout* do gene LbrM2903_340062700 e dos clones *knock-into* gene LINF_120006700, além de *L. braziliensis* M2903 *wild type* e *L. braziliensis* M2903 Cas9⁺. Foram utilizados pelo menos três clones de cada construção e os experimentos foram realizados em duplicata.

Ao analisar os níveis de expressão de mRNA nos parasitos com deleção do gene LbrM2903_340062700, é possível observar que os clones 1, 2 e 4, anteriormente confirmados como *knockouts* para o gene Alg11 ao avaliar o DNA genômico (**Figura 10B**), também não apresentaram expressão de mRNA (**Figura 12A**). Também foram avaliados três clones de *L. braziliensis* M2903 expressando o gene LINF_120006700, anteriormente selecionados através de PCR convencional (**Figura 11B**). Conforme mostrado anteriormente (**Figura 9B**), não foi detectada expressão do gene Alg9 em formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* M2903 *wild type* (**Figura 12B**). Os três clones avaliados apresentaram expressão de mRNA do gene Alg9, tanto em formas promastigotas quanto amastigotas (**Figura 12B**), confirmando que a transfecção para geração dos parasitos mutantes foi bem-sucedida. Além disso, foi possível verificar que esses parasitos mutantes apresentam variação nos níveis de expressão de Alg9 entre formas promastigotas e amastigotas intracelulares (**Figura 12B**).

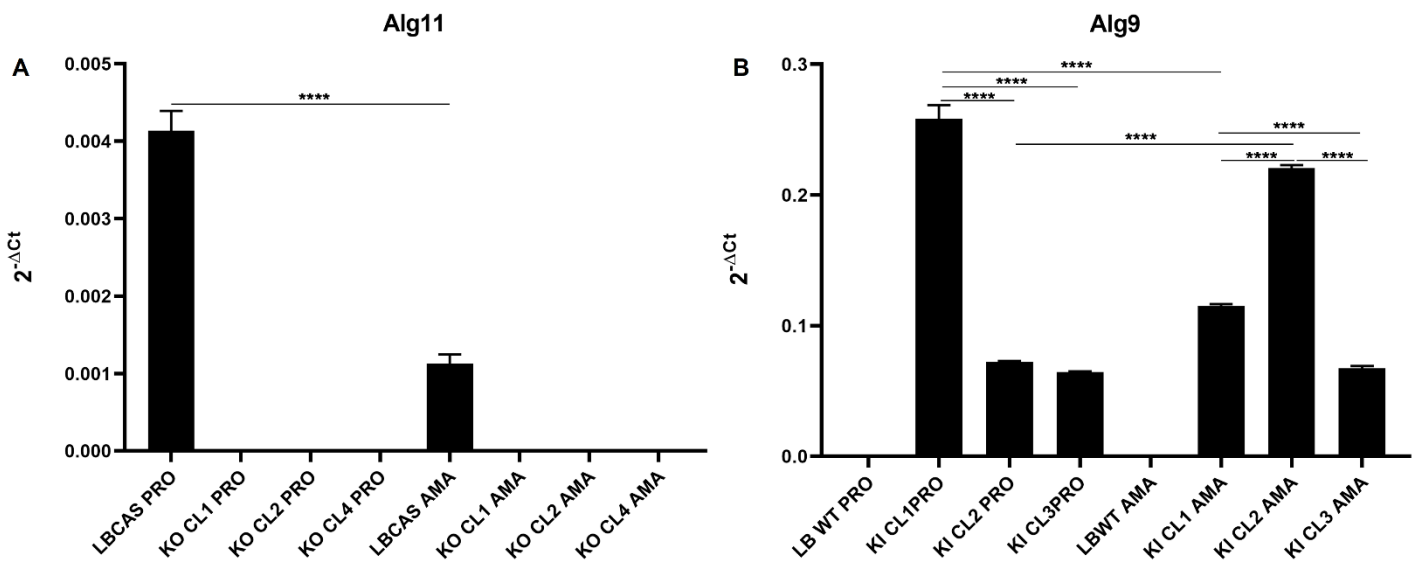


Figura 12: Análise dos níveis de expressão de mRNA dos genes LbrM2903_340062700 (Alg11) e LINF_120006700 (Alg9) em parasitos mutantes e *wild type* nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M2903. Os níveis de expressão do mRNA foram avaliados por RT-qPCR, utilizando o método de $2^{-\Delta Ct}$ e o gene 7SL *Spliced leader* como normalizador. **(A)** Expressão do gene LbrM2903_340062700 (Alg11) em parasitos mutantes. Clones 1, 2 e 4: deleção de todos os alelos do gene Alg11. **(B)** Expressão do gene LINF_120006700 (Alg9) em parasitos mutantes. Clones 1, 2 e 3: confirmação do *knock-in* do gene Alg9. **LB:** *L. braziliensis*; **WT:** *wild type*; **PRO:** formas promastigotas; **AMA:** formas amastigotas intracelulares; **CAS:** parasitos expressando Cas 9; **KO:** parasitos mutantes *knockout*; **KI:** parasitos mutantes *knock-in* (integração no *locus* SSU rDNA); **CL:** clones. Análises realizadas por One-way-ANOVA, seguidas do teste Tukey de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.7. Perfil de crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* M2903 *wild type* e mutantes

Para verificar se existem diferenças no perfil de crescimento entre parasitos *wild type* e mutantes, formas promastigotas foram inoculadas em meio 199, iniciando com 5×10^5 parasitos/mL em duplicata e acompanhadas diariamente por 7 dias através de contagem em câmara de Neubauer. Foi possível observar que os clones 1 e 4, *knockouts* para o gene LbrM2903_340062700, apresentaram diferenças significativas no perfil de crescimento em comparação ao controle (*L. braziliensis* M2903 Cas9⁺) (Figura 13). Esses clones atingiram o pico de crescimento com um dia de atraso (6º dia) quando em comparação ao controle (5º dia). O clone 1 também apresentou um crescimento mais lento desde o 3º dia de monitoramento. Por outro lado, o clone 4 apresentou um crescimento maior em termos de células/mL quando comparado ao controle.

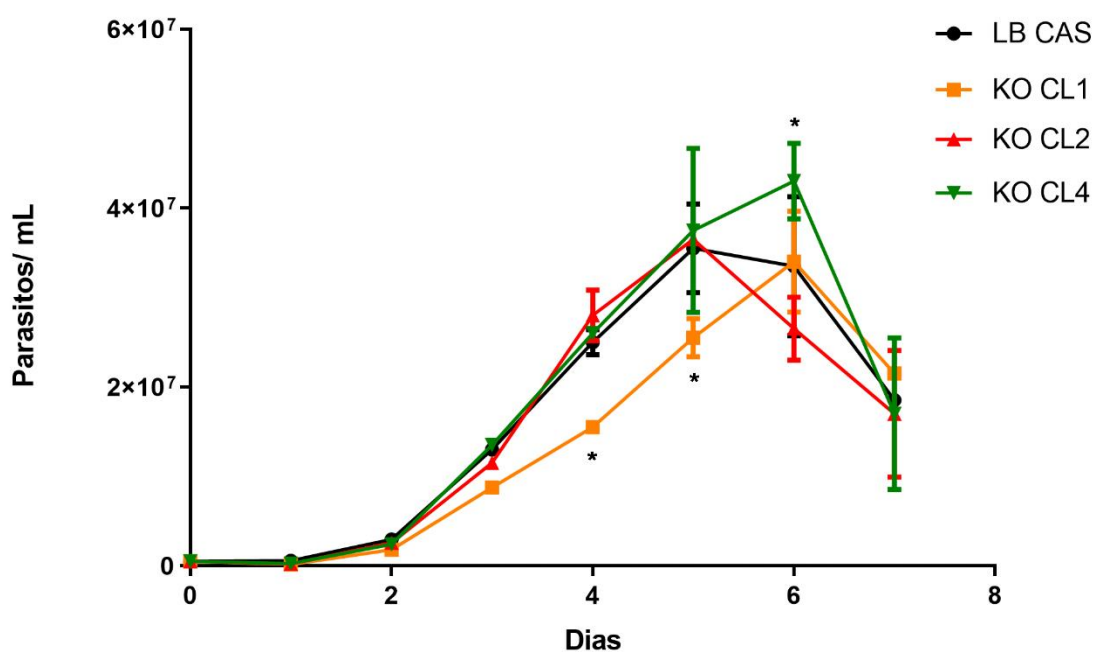


Figura 13: Curva de crescimento de *L. braziliensis* (M2903) Cas9⁺ e dos clones *knockout* para o gene LbrM2903_340062700. O gráfico representa a curva de crescimento ao longo de 7 dias de formas promastigotas dos parasitos realizada em duplicata e partindo da concentração inicial de 5×10^5 parasitos/mL. LB CAS: *L. braziliensis* expressando Cas 9; KO: parasitos mutantes *knockout*; CL: clones. Análises realizadas por Two-way-ANOVA, seguidas do teste Dunnett de múltiplas comparações.

Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ sempre em relação ao grupo controle LB CAS.

Ao observar o perfil de crescimento dos clones *knock-in* do gene LINF_120006700, nota-se um aumento significativo no crescimento dos clones 2 e 3 em relação ao clone 1 e o controle *L. braziliensis* M2903 *wild type* (**Figura 14**). Também é possível observar que o clone 3 atingiu o pico de crescimento um dia antes (5º dia) dos demais clones avaliados (6º dia).

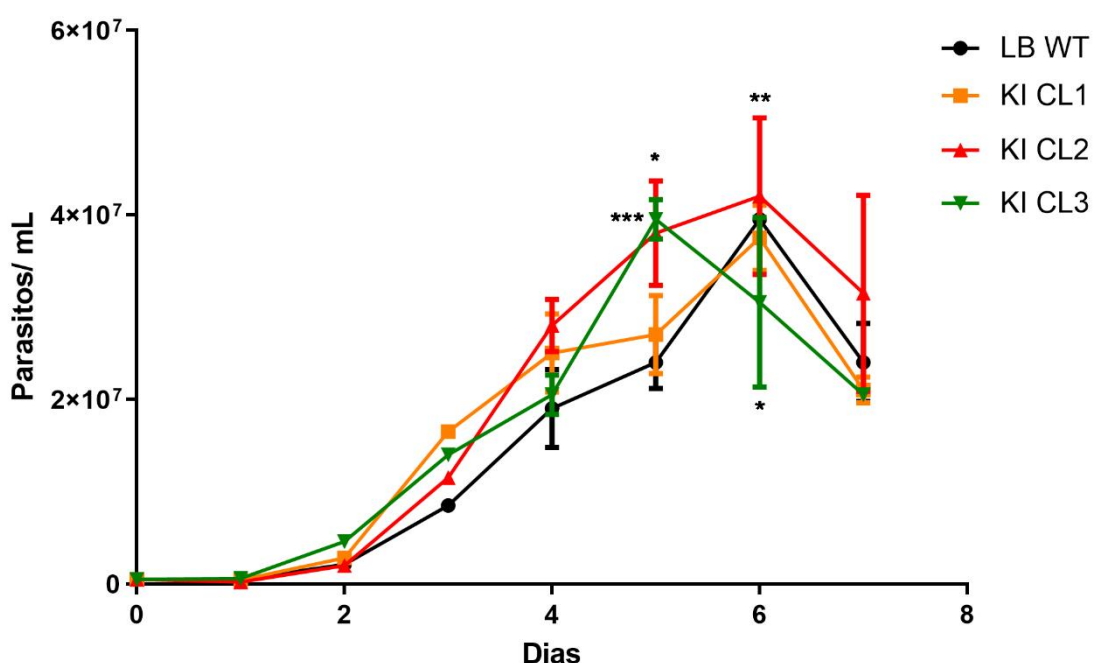


Figura 14: Curva de crescimento de *L. braziliensis* M2903 *wild type* e dos clones *knock-into* gene LINF_120006700. O gráfico representa a curva de crescimento ao longo de 7 dias de formas promastigotas dos parasitos realizada em duplicata e partindo da concentração inicial de 5×10^5 parasitos/mL. LB WT: *L. braziliensis* M2903 *wild type*; KI: parasitos mutantes *knock-in* do gene LINF_120006700, integrado no *locus* SSU rDNA; CL: clones. Análises realizadas por Two-way-ANOVA, seguidas do teste Dunnett de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ sempre em relação ao grupo controle LB WT.

5.8. Avaliação dos índices de infectividade *in vitro* de parasitos *wild type* e mutantes de *L. braziliensis* em células THP-1

Após a confirmação da deleção do gene LbrM2903_340062700 nos parasitos mutantes, tanto por análise do DNA genômico (**Figura 10B**) quanto do mRNA (**Figura 12A**), foram avaliados os índices de infectividade *in vitro* para verificar a influência da deleção na capacidade dos parasitos *knockouts* infectar, sobreviver e multiplicar-se dentro das células. Células THP-1 foram infectadas, na proporção 1:10, com 3 clones *knockout* (clones 1, 2 e 4) e com parasitos expressando o gene LbrM2903_340062700 (*L. braziliensis* M2903 Cas9⁺), como controle (**Figura 15**). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

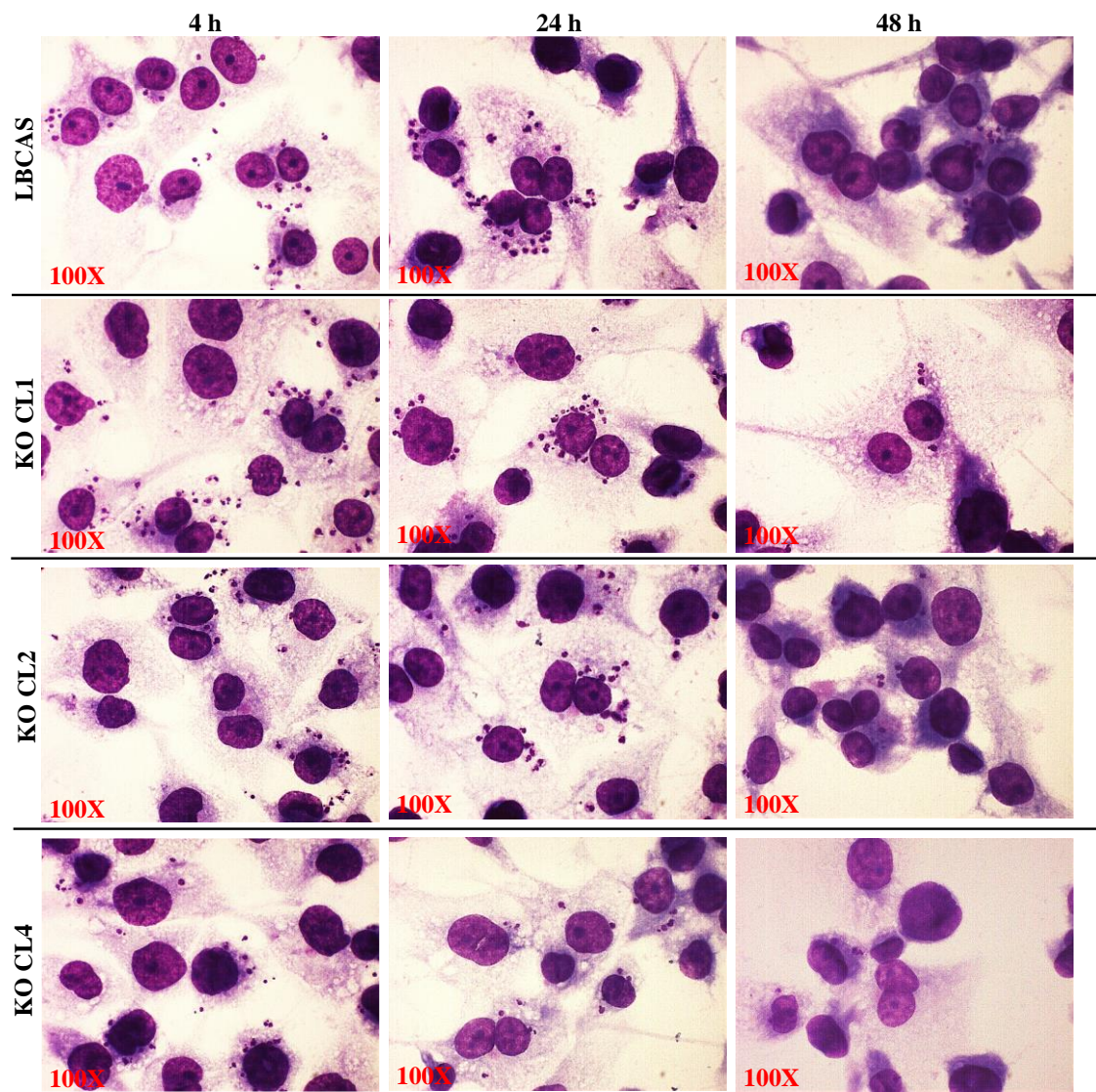


Figura 15: Imagens representativas de células THP-1 infectadas com *L. braziliensis* M2903 CAS9⁺ e clones 1, 2 e 4 *knockouts* para o gene LbrM2903_340062700 (Alg11). Neste experimento foi utilizada uma proporção 10:1 de promastigotas metacíclicas para cada macrófago. Após coloração com panótico, é possível visualizar as amastigotas intracelulares dentro dos macrófagos 4, 24 e 48 horas pós-infecção (aumento 100X). LB CAS: *L. braziliensis* expressando Cas 9; KO: parasitos mutantes *knockout*; CL: clones.

Ao quantificar a porcentagem de células infectadas, foi possível observar que em comparação ao controle, os três clones *knockout* (clones 1, 2 e 4) apresentaram níveis significativamente maiores de células infectadas em relação ao controle com 4 horas pós-infecção. Com 24 horas pós-infecção, apenas o clone 4 apresentou diferença

estatisticamente significativa. Em 48 horas pós-infecção, houve uma diminuição do número de células infectadas em relação aos demais tempos avaliados (4 e 24 horas de infecção), no entanto, quando comparado ao controle essa diferença não é estatisticamente significativa (**Figuras 16A**). Um padrão semelhante foi observado ao analisar os resultados da quantificação de amastigotas por célula no tempo de 4 horas pós-infecção (**Figuras 16B**). Adicionalmente, foi observado um aumento significativo entre o clone 4 e o controle com 24 horas de infecção. No entanto, após 48 horas de infecção, ocorreu uma diminuição significativa no número de amastigotas intracelulares apenas para o clone 1 em relação ao controle. Estes resultados sugerem que o gene *Alg11* pode estar relacionado com o processo de invasão das células.

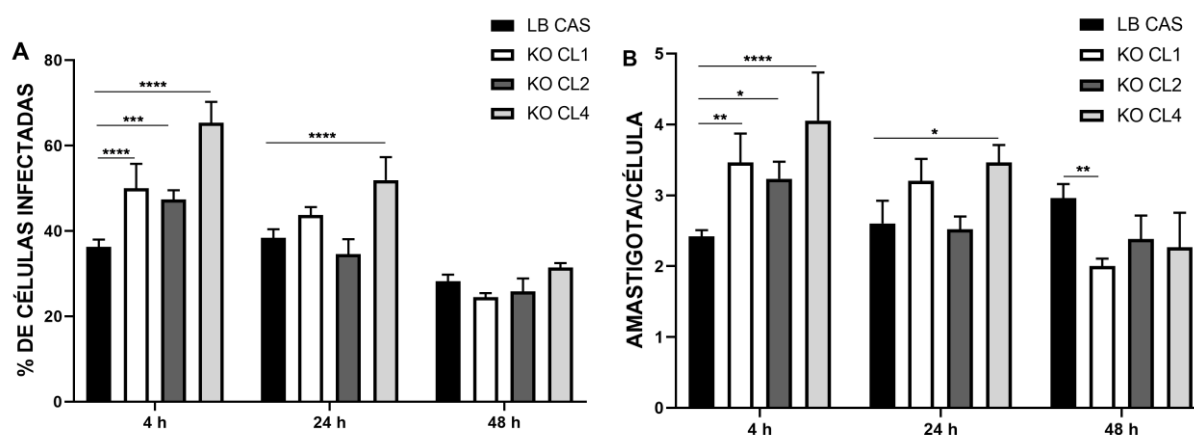


Figura 16: Avaliação da infectividade dos parasitos *knockout* para o gene LbrM2903_340062700 (*Alg11*). (A) Porcentagem de células THP-1 infectadas após 4, 24 e 48 h. (B) Número de amastigotas por célula THP-1 observado após 4, 24 e 48 h de infecção por parasitos *L. braziliensis* Cas9⁺ e *knockouts* para o gene *Alg11*. LB CAS: *L. braziliensis* expressando Cas 9; KO: parasitos mutantes *knockout*; CL: clones. Análises realizadas por Two-way-ANOVA, seguidas do teste de Dunnett de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Da mesma forma, foram avaliados os índices de infectividade *in vitro* para os clones *knock-in* do gene LINF_120006700. Células THP-1 foram infectadas, na proporção 1:10, com *L. braziliensis wild type*, como controle, e com os clones 1, 2 e 3 (**Figura 17**), para os quais anteriormente foi confirmada a correta integração da construção no DNA genômico (**Figura 11B**) e a expressão de mRNA (**Figura 12B**).

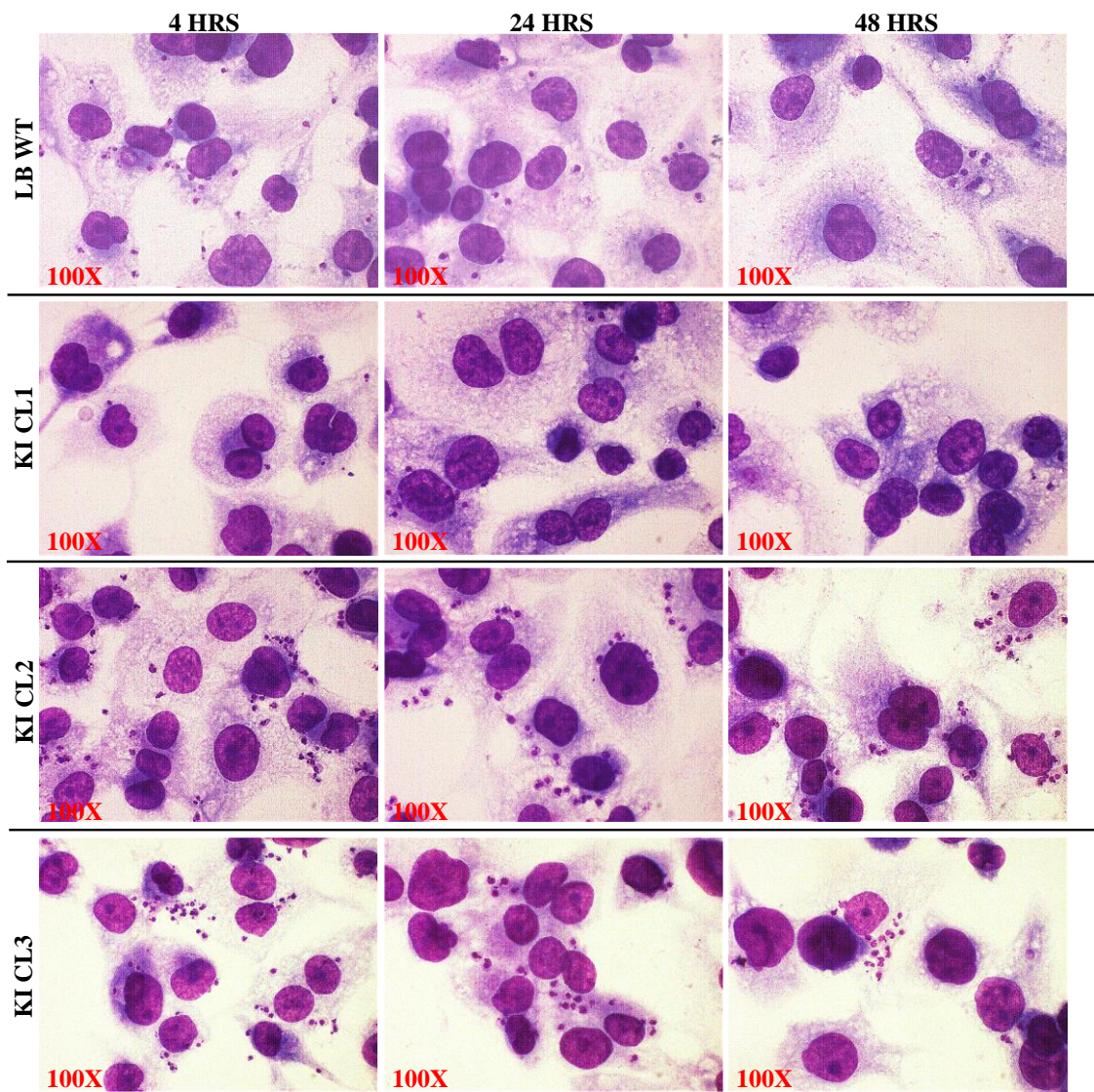


Figura 17: Imagens representativas de células THP-1 infectadas com *L. braziliensis* M2903 *wild type* e clones 1, 2 e 3 *knock-in* do gene LINF_120006700 (Alg9). Neste experimento foi utilizada uma proporção 10:1 de promastigotas metacíclicas para cada macrófago. Após coloração com panótico, é possível visualizar as amastigotas intracelulares dentro dos macrófagos 4, 24 e 48 horas pós-infecção (aumento 100X). LB WT: *L. braziliensis* M2903 *wild type*; KI: parasitos mutantes *knock-in* do gene LINF_120006700, integrado no *locus* SSU rDNA; CL: clones.

Ao observar a porcentagem de células infectadas, nota-se um aumento significativo do número de células infectadas com os clones 2 e 3 nos três tempos avaliados (4, 24 e 48 h pós-infecção) em comparação com o controle (**Figuras 18A**).

Resultado semelhante foi observado ao quantificar as amastigotas por célula, houve um aumento significativo no número de amastigotas intracelulares nos clones 2 e 3 em relação ao controle (**Figura 18B**).

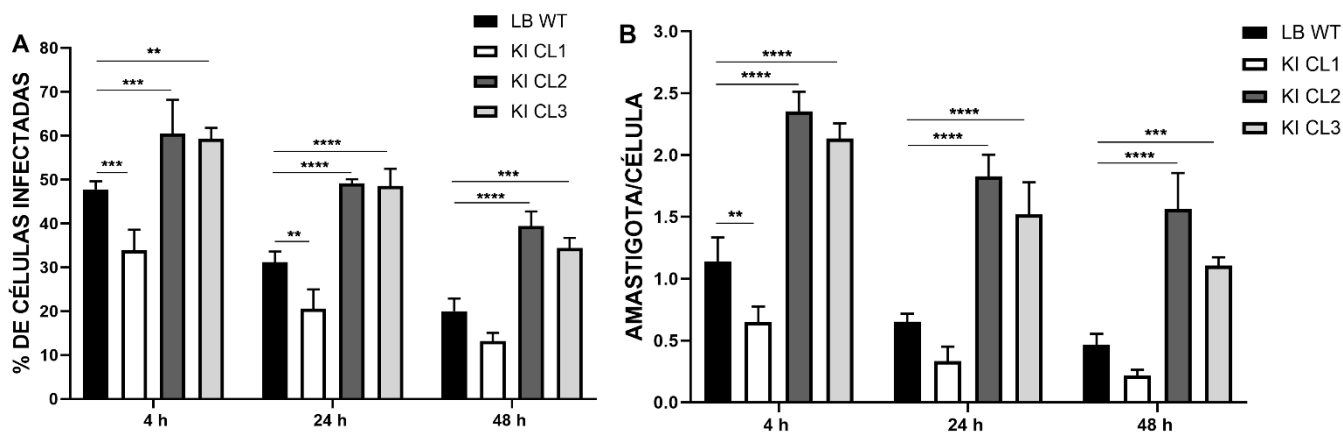


Figura 18: Avaliação da infectividade dos parasitos *knock-in* do gene *LINF_120006700* (Alg9). (A) Porcentagem de células THP-1 infectadas após 4, 24 e 48 h. (B) Número de amastigotas por célula THP-1 observado após 4, 24 e 48 h de infecção por parasitos *wild type* e *knock-in* do gene Alg9. LB WT: *L. braziliensis* M2903 *wild type*; KI: parasitos mutantes *knock-in* do gene Alg9, integrado no *locus* SSU rDNA; CL: clones. Análises realizadas por Two-way-ANOVA, seguidas do teste de Dunnett de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.9. Quantificação de glicosilação de glicoconjugados na superfície de parasitos *knockout* para o gene LbrM2903_340062700

Para avaliar a glicosilação de glicoconjugados na superfície dos parasitos *knockout* para o gene LbrM2903_340062700, as promastigotas e amastigotas axênicas com 12 h e 24 h de amastigogênese foram marcadas com a lectina Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (ConA) conjugada a FITC e a intensidade média de fluorescência foi quantificada por citometria de fluxo. Os parasitos foram incubados com a lectina ConA ou com a lectina previamente tratada com seu inibidor (metil- α -D-manopiranosídeo). Como controle, parasitos não marcados foram utilizados. De acordo com os resultados obtidos na citometria, foi possível verificar que a marcação com ConA foi específica, uma vez que a incubação prévia com o inibidor reduziu o sinal a níveis similares aos dos parasitos não marcados (**Figura 19 e 20**). Quando comparado ao controle *L. braziliensis* expressando Cas 9, o clone *knockout* 1 para o gene LbrM2903_340062700 apresentou um aumento significativo da intensidade média de fluorescência nas formas promastigotas; o clone 2 apresentou uma diminuição significativa da intensidade média de fluorescência, tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas axênicas com 12 e 24 h; e o clone 4 não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle nas formas promastigotas, mas apresentou um aumento na marcação por ConA nas formas amastigotas axênicas com 12 e 24 h de diferenciação (**Figura 20**). Estes dados são opostos àqueles obtidos anteriormente, uma vez que a deleção do gene LbrM2903_340062700 foi confirmada tanto por sua ausência de detecção no genoma (**Figura 10B**) quanto pela ausência de expressão de mRNA dos parasitos *knockouts* (**Figura 12A**). Desse modo, esperava-se uma redução da intensidade média de fluorescência (MFI) nas diferentes formas evolutivas (promastigota e amastigota axênica), dos clones *knockout* em relação ao controle *L. braziliensis* expressando Cas9, o que não ocorreu. Os resultados obtidos na citometria nos sugerem um possível mecanismo de compensação, através por exemplo de uma via alternativa de adição de glicanos nas proteínas de superfície, que poderia ter sido ativada devido a deleção do gene α -1,2-manosiltransferase Alg11.

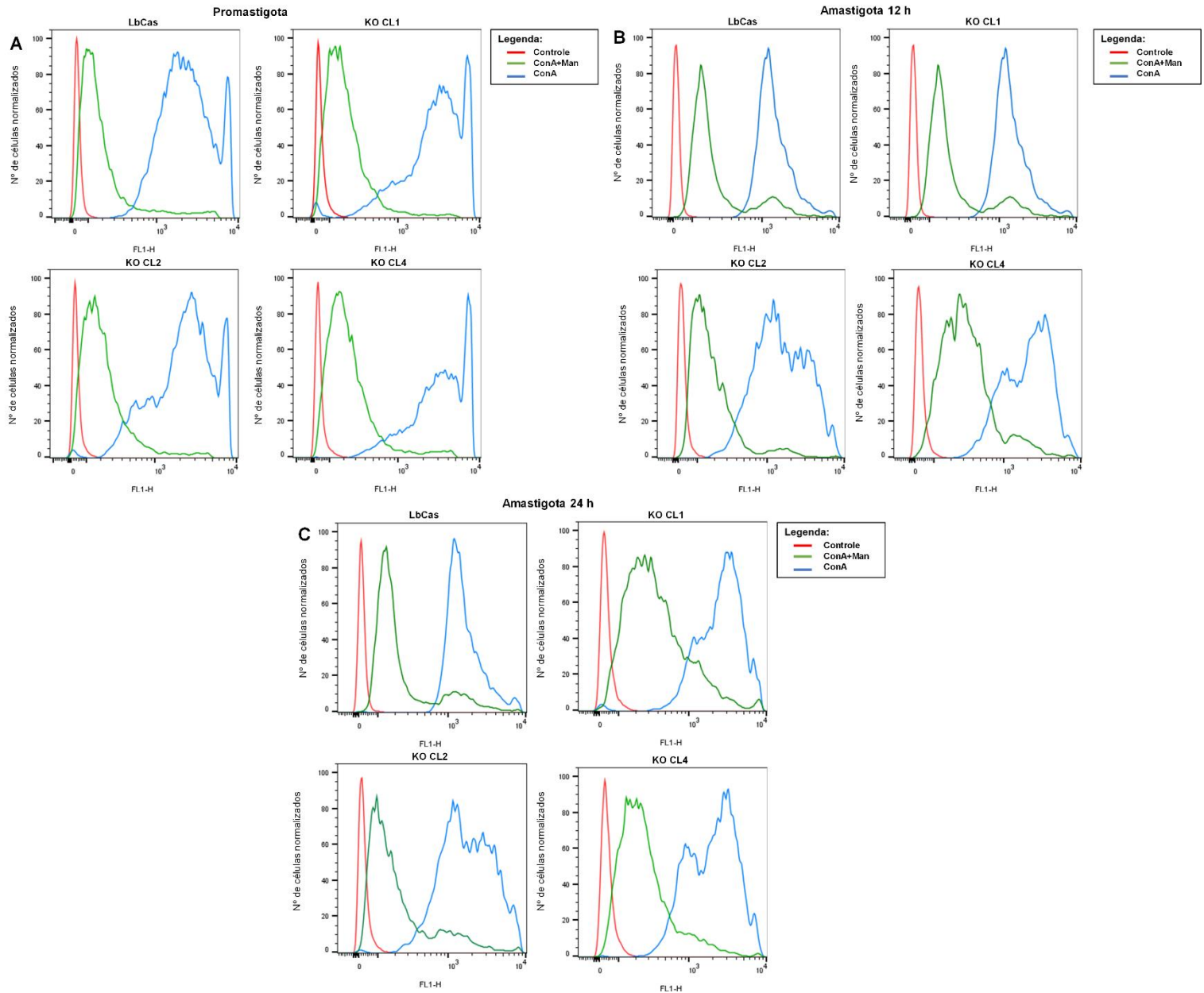


Figura 19: Quantificação da fluorescência derivada da marcação de glicoproteínas de superfície com a lectina ConA de formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. braziliensis* knockout para o gene *Alg11*. (A) Formas promastigotas axênicas em fase estacionária. (B) Formas amastigotas axênicas com 12 horas de amastigogênese. (C) Formas amastigotas axênicas com 24 horas de amastigogênese. Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão.

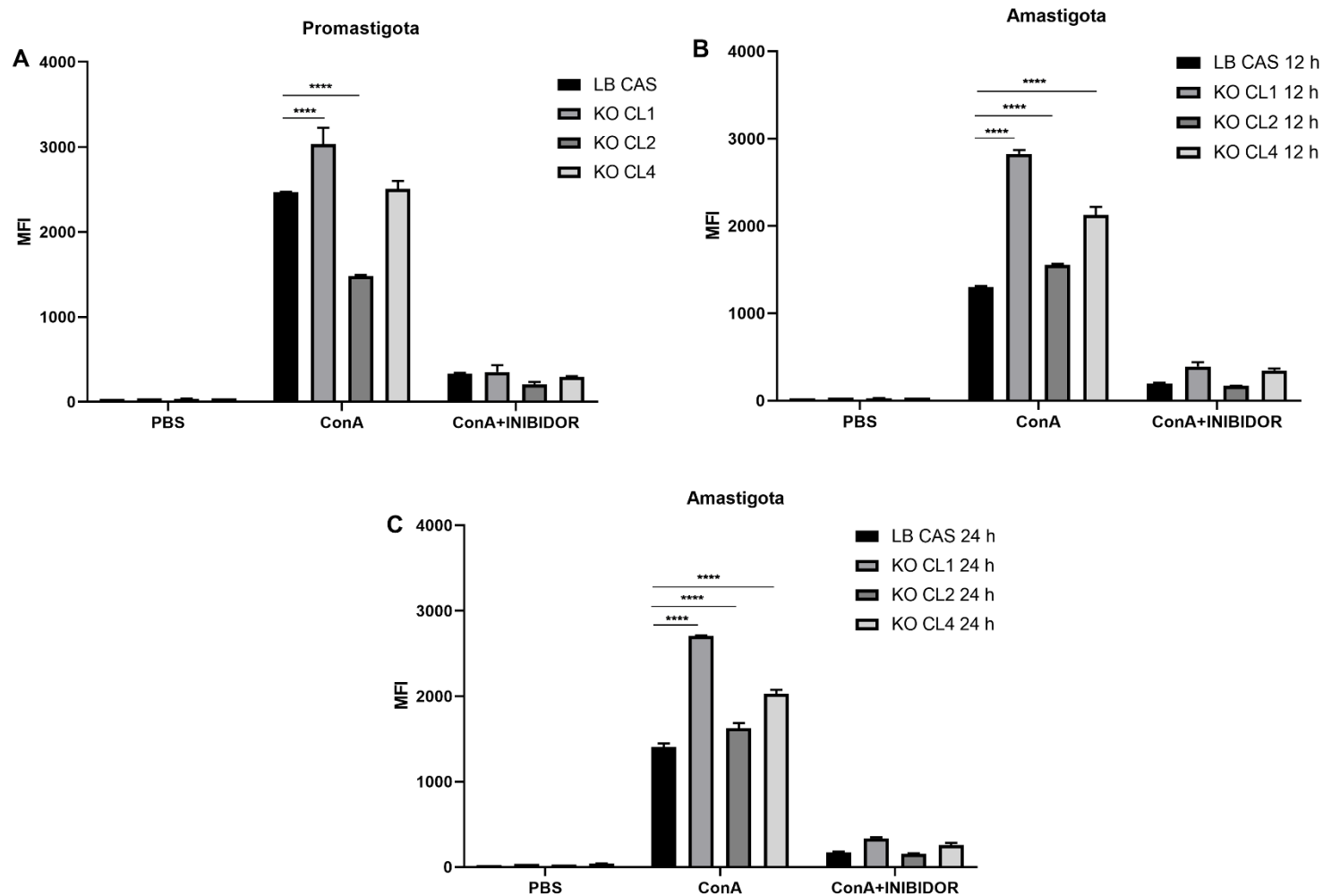


Figura 20: Quantificação de carboidratos (resíduos de α -D-manose e α -D-glicose) na superfície dos parasitos *L. braziliensis* Cas9+ e *knockout* para o gene *LbrM2903_340062700*. Intensidade média de fluorescência (MFI) de formas promastigotas em fase log (A) e amastigotas axênicas obtidas a partir de promastigotas em fase estacionária com 12 horas (B) e 24 horas (C) de diferenciação de amastigogênese. *L. braziliensis* M2903, expressando a endonuclease Cas9, e três clones *knockouts* foram marcadas com a lectina ConA conjugada com FITC. PBS: Controle não marcado; ConA: parasitos marcados com Concanavalina A; ConA + inibidor: parasitos incubados com Concanavalina A previamente tratadas com seu inibidor metil- α -D-manopiranosídeo; LB CAS: *L. braziliensis* expressando Cas 9; KO: parasitos mutantes *knockout*; CL: clones. Análises realizadas por ANOVA, seguidas do teste Dunnett de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, * $p <$**

0,001 e **** $p < 0,0001$ sempre em relação ao grupo controle LB CAS. Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão.

5.10. Quantificação de monossacarídeos (manose e galactose) associados a GIPLs dos parasitos mutantes e *wild type* de *L. braziliensis*.

Após a obtenção dos parasitos em cultura, estes foram submetidos a uma forte hidrólise ácida para a purificação dos GIPLs e submetidos a eletroforese de carboidratos marcados por fluoróforos, e, desse modo, foi determinada a composição de monossacarídeos em sua superfície. Manose e galactose estão presentes em todas as amostras analisadas; os clones *knockout* para o gene Alg11 (clones 2 e 4) apresentaram uma maior intensidade da banda correspondente à manose em relação ao controle *L. braziliensis* expressando a Cas9 (Cas) (**Figura 21**). A realização deste experimento reforça a ideia de que existem uma ou mais vias alternativas ao depósito de manose na superfície do parasito, padrão já observado através de citometria de fluxo utilizando *Concanavalina A* (**Figura 20**).

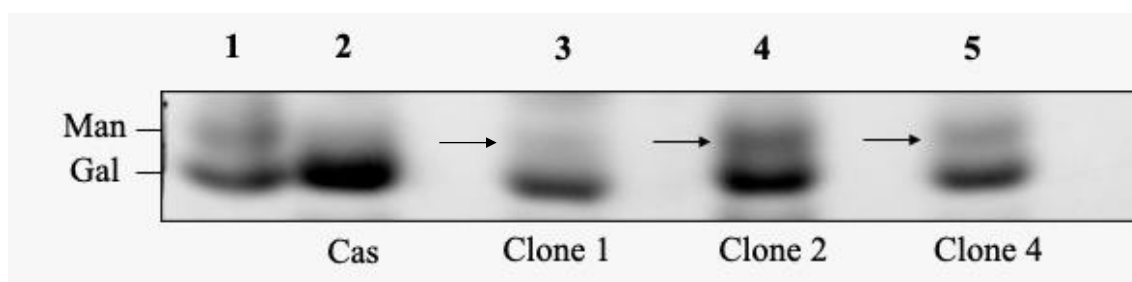


Figura 21: Perfil de monossacarídeos (manose e galactose) de parasitos mutantes para o gene *LbrM2903_340062700* e *L. braziliensis* M2903 Cas9⁺. Eletroforese de carboidratos marcados por fluoróforos (FACE). 1 - Padrão de marcação: monossacarídeos manose (Man) e galactose (Gal) 0,5 μ g; 2 - GIPLs de *L. braziliensis* M2903 Cas9⁺ (Cas), 3, 4 e 5 - GIPLs dos clones 1, 2 e 4 *knockouts* para o gene *LbrM2903_340062700*. Setas indicam a banda correspondente a manose nos clones.

5.11. Avaliação da expressão de mRNA dos genes relacionados a via de N-glicosilação em *Leishmania*

A fim de investigar possíveis alterações na expressão de outros genes da via de N-glicosilação nos parasitos mutantes obtidos neste trabalho, iniciadores específicos para cada gene envolvido nesta via foram desenhados. Um total de 10 iniciadores foram utilizados para determinar os níveis dos transcritos desses genes nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis knockout* para o gene Alg11, bem como para os parasitos expressores do gene Alg9 e parasitos selvagens de *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. infantum*.

Verificou-se a expressão dos dez genes avaliados em parasitos selvagens das três espécies analisadas, com exceção de Alg9 em *L. braziliensis*, uma vez que esse gene está ausente nessa espécie, como relatado anteriormente (**Figura 22**). Foi também observada maior expressão dos genes na forma promastigota de *L. braziliensis* quando comparado com a forma amastigota desta espécie e em relação às duas formas evolutivas nas demais espécies avaliadas, que apresentaram níveis menores e semelhantes de expressão dos genes entre formas promastigotas e amastigotas (**Figura 22**).

A quantificação dos níveis de mRNA dos clones *knockout* para o gene Alg11 (α -1,2-manosiltransferase) também foi avaliada. Foi observado um aumento da expressão das enzimas Alg3 (α -1,3-manosiltransferase), OST (oligossacaril-transferase), MOGS (manosil-oligossacarídeo glicosidase) e GANAB alfa-(glicosidase neutra AB) para os clones 1 e 2 em ambas as formas, promastigota e amastigota, quando comparado ao parasito selvagem (**Figura 23**). Como esperado, não foi detectada a expressão do gene Alg9 em *L. braziliensis Cas9* bem como nos clones *knockout* para o gene Alg11 (dados não mostrados). Vale ressaltar que estas alterações ocorrem nas enzimas que atuam após a enzima Alg11 na via e, desse modo, estas variações podem explicar o fenótipo observado nos clones *knockout* para o gene Alg11.

Os dados de expressão de mRNAs dos genes envolvidos na via de N-glicosilação nos clones *knock-in* do gene Alg9 (α -1,2-manosiltransferase) confirmam mais uma vez a expressão do gene Alg9 e a ausência desse gene nas formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis wild type*. Além disso, é possível observar uma aparente inibição na expressão de todos os genes que codificam as enzimas avaliadas nos clones *knock-in* do gene Alg9, quando comparado a formas promastigotas de parasitos selvagens, com

tendência geral de diminuição de expressão nas formas promastigotas dos parasitos mutantes (**Figura 24**).

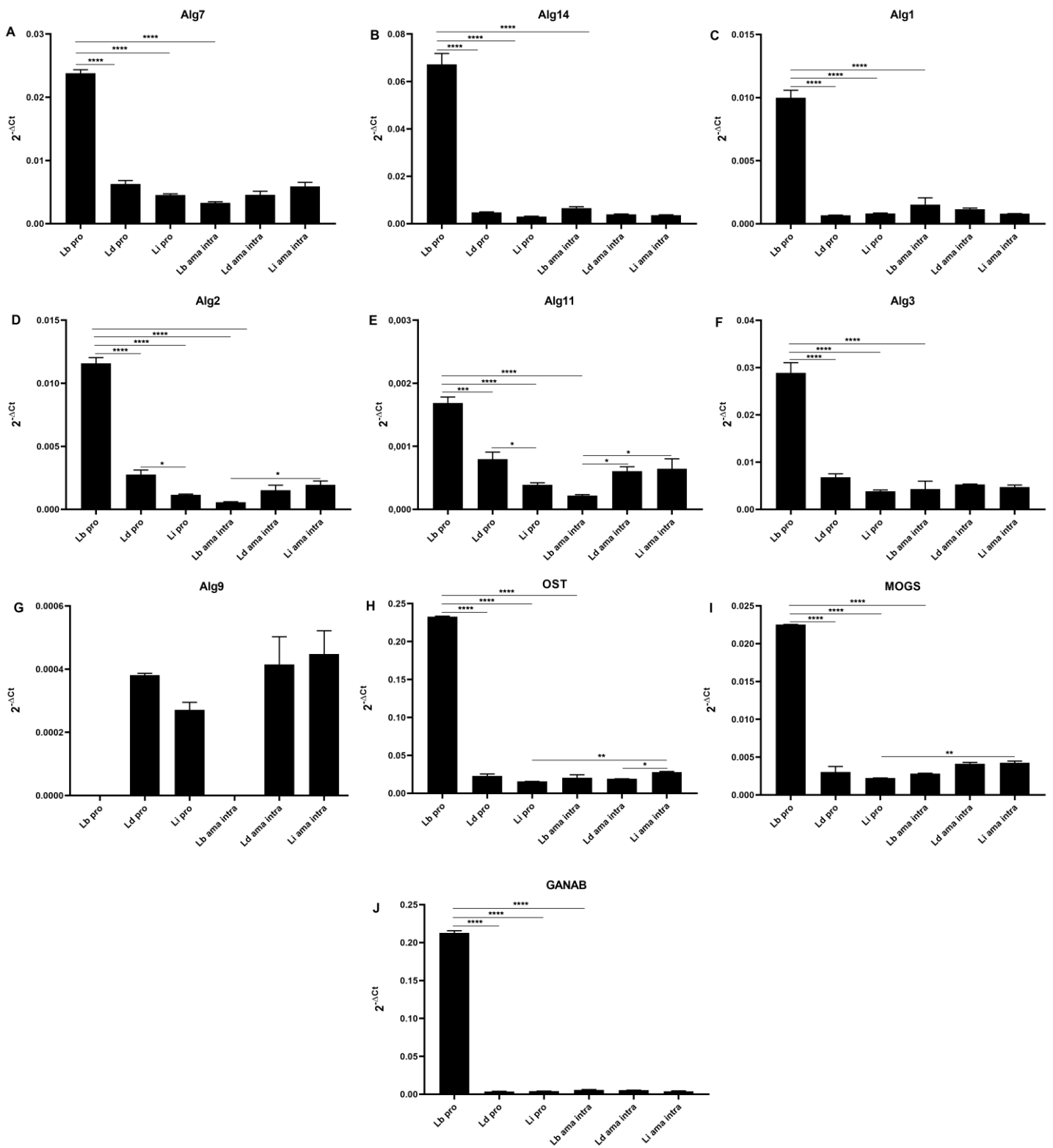


Figura 22: Análise da expressão dos genes relacionados à via de *N*-glicosilação em diferentes espécies de *Leishmania*. Os níveis de expressão dos mRNAs foram avaliados por RT-qPCR, utilizando o método de $2^{-\Delta Ct}$ e o gene *7SL Spliced leader* como

normalizador. **(A)** Formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. infantum*. **Lb:** *L. braziliensis*; **Ld:** *L. donovani*; **Li:** *L. infantum*. Formas promastigotas (**pro**) e amastigotas intracelulares (**ama intra**). Enzimas: **(A) Alg7:** UDP-*N*-acetilglucosamina-dolicil-fosfato *N*-acetilglucosamina fosfotransferase; **(B) Alg14:** UDP-*N*-acetilglucosamina transferase; **(C) Alg1:** β -1,4-mannosiltransferase; **(D) Alg2:** α -1,3/1,6-manosiltransferase; **(E) Alg11:** α -1,2-manosiltransferase; **(F) Alg3:** α -1,3-manosiltransferase; **(G) Alg9:** α -1,2-manosiltransferase; **(H) OST:** oligossacaril-transferase; **(I) MOGS:** manosil-oligossacarídeo glicosidase; **(J) GANAB:** alfa-glicosidase neutra AB. Os genes avaliados estão dispostos nos painéis na mesma ordem em que as respectivas enzimas atuam na via de *N*-glicosilação. Análises realizadas por One-way-ANOVA, seguidas do teste Tukey de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

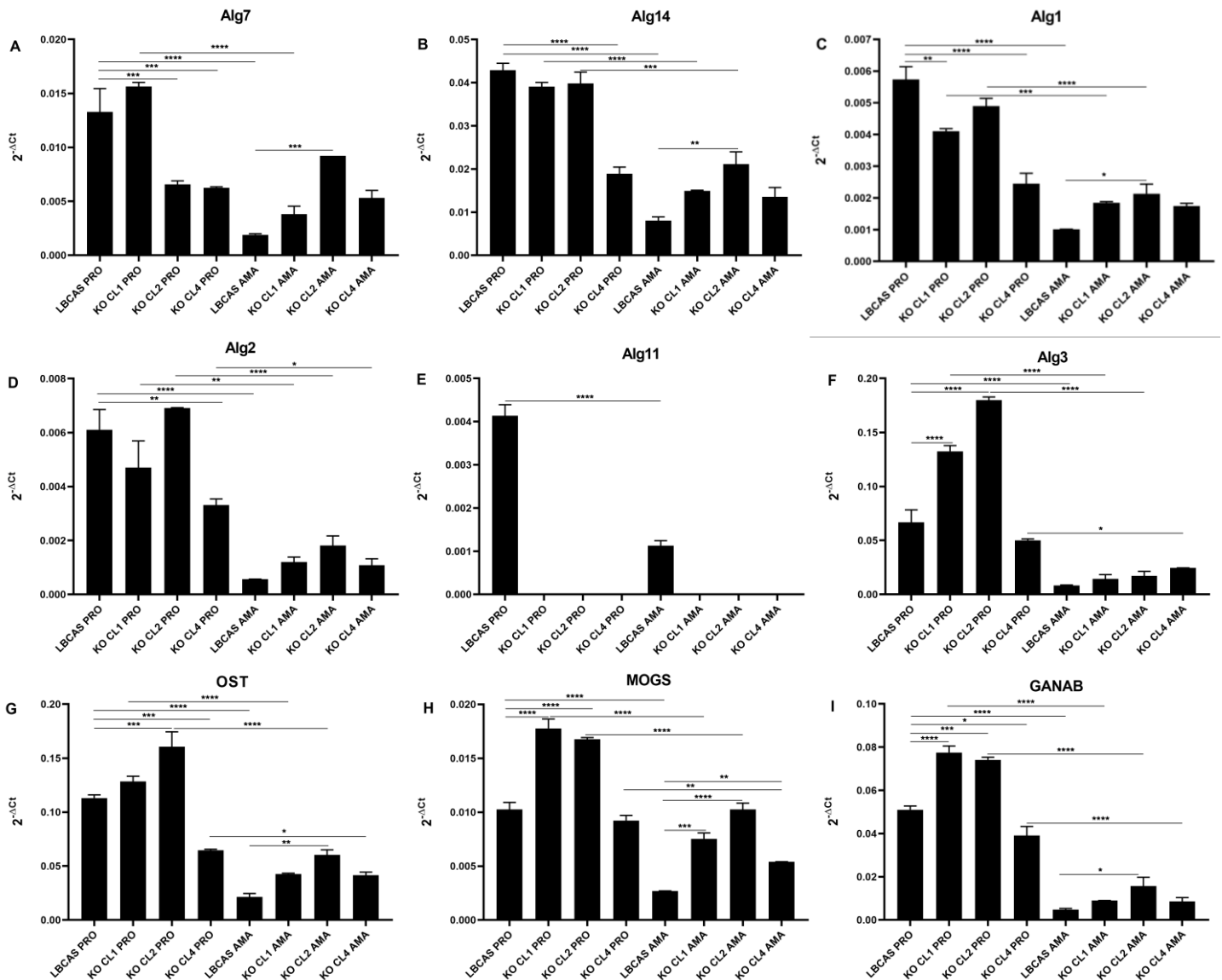


Figura 23: Análise da expressão dos genes relacionados à via de *N*-glicosilação em parasitos *knockouts* para o gene *LbrM2903_340062700* (Alg11) e *L. braziliensis* M2903 Cas9. Os níveis de expressão do mRNA foram avaliados por RT-qPCR, utilizando o método de $2^{-\Delta CT}$ e o gene *7SL Spliced leader* como normalizador. Formas promastigotas (PRO) e amastigotas intracelulares (AMA) de *L. braziliensis* M2903, parasitos mutantes e selvagens para o gene *LbrM2903_340062700* (Alg11). CAS: parasitos expressando Cas 9; KO: parasitos mutantes *knockout*; CL Clones 1, 2 e 4: deleção de todos os alelos do gene Alg11. Enzimas: (A) Alg7: UDP-*N*-acetilglucosamina-dolicil-fosfato *N*-acetilglucosamina fosfotransferase; (B) Alg14: UDP-*N*-acetilglucosamina transferase; (C) Alg1: β -1,4-manosiltransferase; (D) Alg2: α -1,3/1,6-manosiltransferase; (E) Alg11: α -1,2-manosiltransferase; (F) Alg3: α -1,3-

manosiltransferase; **(G) OST:** oligossacaril-transferase; **(H) MOGS:** manosil-oligossacarídeo glicosidase; **(I) GANAB:** alfa-glicosidase neutra AB. Os genes avaliados estão dispostos nos painéis na mesma ordem em que as respectivas enzimas atuam na via de *N*-glicosilação. Análises realizadas por One-way-ANOVA, seguidas do teste Tukey de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ *Alg9: α -1,2-manosiltransferase, dados não mostrados.

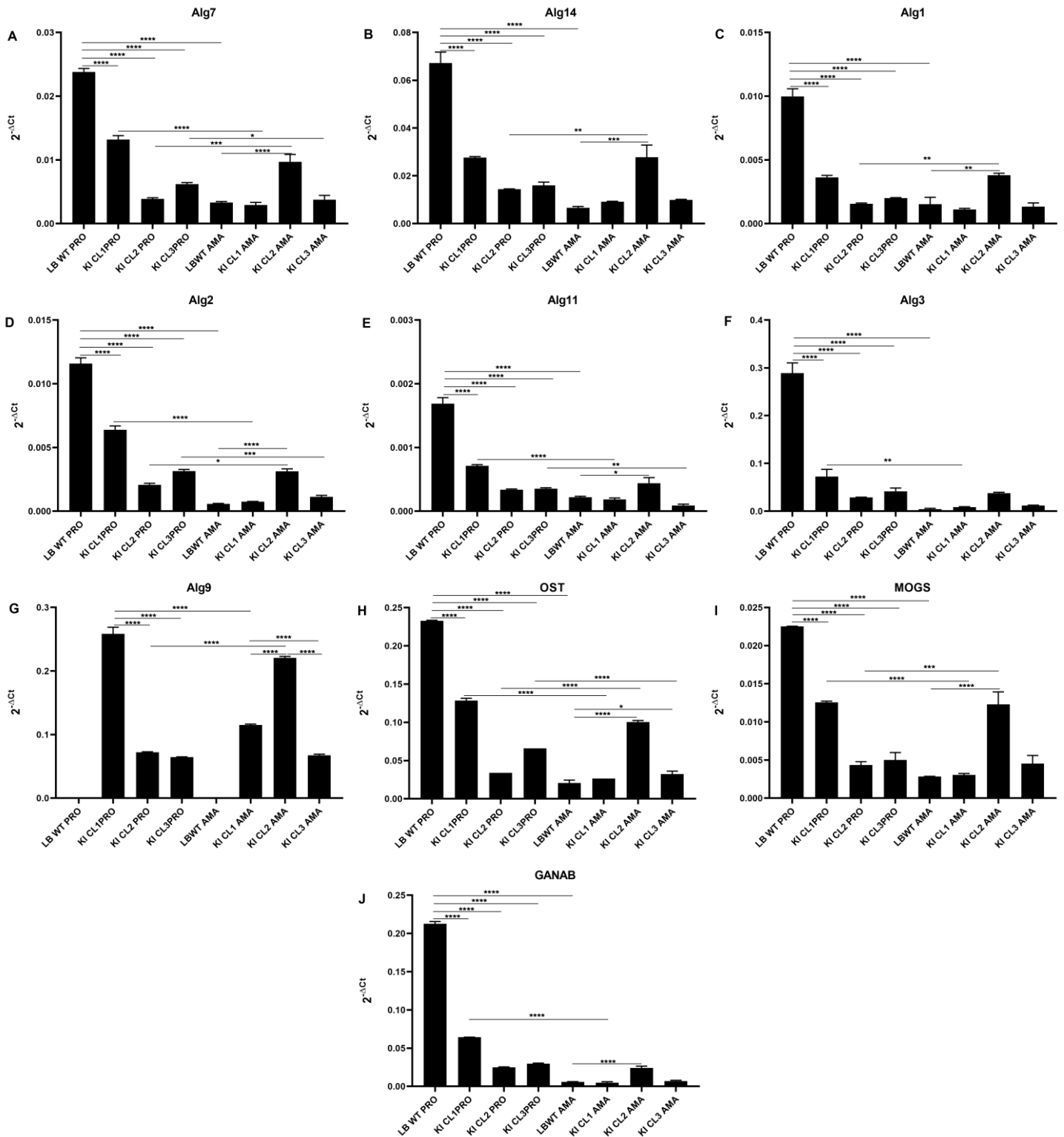


Figura 24: Análise da expressão dos genes relacionados à via de *N*-glicosilação em parasitos *knock-in* do gene LINF_120006700 (Alg9) e *L. braziliensis* M2903 wild type. Os níveis de expressão do mRNA foram avaliados por RT-qPCR, utilizando o método de $2^{-\Delta Ct}$ e o gene 7SL *Spliced leader* como normalizador. Formas promastigotas (PRO) e

amastigotas intracelulares (AMA). **LB WT**: *L. braziliensis* M2903 *wild type*; **KI**: parasitos mutantes *knock-in* do gene Alg9, integrado no *locus* SSU rDNA; **CL**: clones 1, 2 e 3. Enzimas: **(A) Alg7**: UDP-*N*-acetilglucosamina-dolicil-fosfato *N*-acetilglucosamina fosfotransferase; **(B) Alg14**: UDP-*N*-acetilglucosamina transferase; **(C) Alg1**: β -1,4-mannosiltransferase; **(D) Alg2**: α -1,3/1,6-manosiltransferase; **(E) Alg11**: α -1,2-manosiltransferase; **(F) Alg3**: α -1,3-manosiltransferase; **(G) Alg9**: α -1,2-manosiltransferase; **(H) OST**: oligossacaril-transferase; **(I) MOGS**: manosil-oligossacarídeo glicosidase; **(J) GANAB**: alfa-glicosidase neutra AB. Os genes avaliados estão dispostos nos painéis na mesma ordem em que as respectivas enzimas atuam na via de *N*-glicosilação. Análises realizadas por One-way-ANOVA, seguidas do teste Tukey de múltiplas comparações. Diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

6. Discussão

Os parasitos do gênero *Leishmania* desenvolveram mecanismos de sobrevivência durante a adaptação ao parasitismo em seus hospedeiros. No hospedeiro vertebrado, diversos fatores podem atuar nesse processo adaptativo favorecendo a invasão celular, subversão do sistema imune, inativação do complemento, sobrevivência e replicação no ambiente hidrolítico intracelular (BIFELD, CLOS, 2015; KUMARI, SINGH, 2022). Nesse contexto, os glicoconjugados possuem papel de destaque, sendo uma importante classe de moléculas que auxiliam em funções, como sobrevivência e virulência influenciando na infectividade e estabelecimento da doença (TURCO, DESCOTEAUX, 1992; DERMINE et al., 2000; GOMEZ et al., 2009; HALL et al., 2020; CABEZAS et al., 2015).

De fato, o processo de *N*-glicosilação tem sido fortemente relacionado à virulência do parasito, diversos estudos têm avaliado a estrutura e função desses gliconconjugados em *Leishmania* (KINK, CHANG, 1988; ILG et al., 1994; FERGUSON, 1997; GARAMI, ILG, 2001; NOVOZHILOVA, BOVIN, 2010; ASSIS et al., 2012). Em um trabalho anterior realizado em nosso grupo de pesquisa (MENDES, 2015), foram observadas alterações na ocorrência de genes envolvidos no metabolismo de glicanos em *L. braziliensis* e *L. tarentolae* comparado com outras espécies de *Leishmania* (**Figura 4G**). Dois genes que codificam as enzimas Alg9 e Alg11 relacionadas ao processo de *N*-glicosilação foram identificados como determinantes para a ocorrência de alterações no perfil de clusterização de genes do metabolismo de glicanos nessas duas espécies de *Leishmania* (**Figura 5**), o que foi confirmado através de ensaios de citometria de fluxo (**Figuras 6 e 7**) e da análise da expressão de mRNA desses genes (**Figura 9**). A análise destes dados mostrou diferenças estágio-específicas na expressão desses genes, sendo expressos em ambas as formas evolutivas, e estando ambos ausentes em *L. tarentolae*, espécie apatogênica para mamíferos (**Figura 7**). A expressão diferencial de gliconconjugados nas diversas espécies de *Leishmania* já foi descrita em alguns estudos (SCHNEIDER et al., 1992; PIMENTA et al., 1991; NADERER et al., 2004), tendo sido observado que essa expressão varia de acordo com o glicoconjugado e entre as formas evolutivas do parasito (MCCONVILLE, BLACKWELL., 1991; MCCONVILLE, FERGUSSON., 1993).

Sabe-se que a via de *N*-glicosilação ocorre no retículo endoplasmático, inicialmente no citoplasma e posteriormente no lúmen do RE e ainda que um

processamento adicional ocorre no complexo de Golgi (TROMBETTA et al., 1991; SOUSA et al., 1992; PARODI et al., 1992). Em alguns eucariotos, este processo já é bem descrito, como é o caso de *S. cerevisiae* (LEHRMAN, 1991; BICKEL et al., 2005; LARKIN, IMPERIALI, 2011). Mas em *Leishmania* ainda existem algumas lacunas a serem preenchidas e passos da via a serem elucidados, como por exemplo a identificação dos genes Alg6, Alg8 e Alg10 já descritos como ausentes em *T. cruzi* (PARODI, 1993; DUNCAN, FERGUSSON, 2022), e Alg12 identificado apenas em *T. brucei* (LEAL et al., 2004). Com base no banco de dados KEGG de *L. major*, compostos glicanos com estruturas de até $(\text{Glc})_{1-3}(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2$ foram reportados (MULE et al., 2020). No entanto, nenhuma evidência de glicanos bi e triglicosilados foram relatados na literatura até o momento (MULE et al., 2020). Os tripanossomatídeos são incapazes de formar dolicol-P-Glc (PARODI, 1993), o doador clássico das unidades de glicose para as enzimas Alg6, Alg8 e Alg10. No entanto, após o oligossacarídeo formado ser transferido do Dol-PP para a proteína aceptora, um resíduo de glicose pode ser adicionado ao glicano por uma via alternativa, pela ação da enzima UDP-Glc:glicoproteína glicosiltransferase e do UDP-Glc, como doador do açúcar (PARODI, 1993). Essa glicosilação protege o glicano da ação de α -manosídeses durante o trânsito no RE e, possivelmente, auxilia no correto dobramento das glicoproteínas no RE (PARODI, 1993; MULE et al., 2020). Estudos sugerem que esta molécula de glicose é transientemente removida após sua adição no RE (PARODI et al., 1984). No entanto, não se sabe se este padrão se repete para todas as espécies de *Leishmania*.

Após a verificação da ausência de dois genes da via de *N*-glicosilação, Alg9 e Alg11, em algumas espécies de *Leishmania* (**Figuras 4 e 5**) e alterações no padrão de glicosilação na superfície dos parasitos (**Figuras 6 e 7**), decidimos realizar análises *in silico* para avaliar a presença dos demais genes que compõem a via de *N*-glicosilação em diferentes espécies de *Leishmania* (**Figura 8**). Ao buscar por ortólogos destes genes, observamos que o gene Alg9, identificado anteriormente como ausente em *L. braziliensis* e *L. tarentolae*, também está ausente em *L. panamensis*, sugerindo um possível padrão para espécies do subgênero *Viannia*. Alguns trabalhos têm descrito variações na estrutura de glicoconjugados entre diferentes espécies de *Leishmania*, em vias de biossíntese, na relação com o desenvolvimento intravetorial e modulação do sistema imune (MCCONVILLE et al., 1990, 1991, 1993; SOARES et al., 2010; ASSIS et al., 2012; PARNAÍBA et al., 2015). De fato, o subgênero *Viannia* apresenta diferenças na expressão

de carboidratos e LPG, sendo este último menos expresso em espécies do subgênero *Viannia* quando comparado a espécies do subgênero *Leishmania* (MUSKUS et al.,1997; SOARES et al.,2005). Por outro lado, GIPLs são componentes abundantes da membrana celular de *L. panamensis*, e diferem estruturalmente dos GIPLs de outros tripanossomatídeos (ZAWADZKI et al.,1998), o que pode estar diretamente relacionado ao comportamento Peripilaria, e especificidade/permisividade vetorial (SOARES et al, 2010). Estas alterações no perfil de glicosilação entre espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania* estreitam a relação entre a expressão dessas moléculas, as distintas manifestações clínicas e padrões de desenvolvimento intravetorial. Reforçando a idéia da existência de um padrão específico na expressão de glicoconjugados que pode ter ocorrido durante o processo evolutivo das espécies do subgênero *Viannia*.

A ausência do gene Alg11 em *L. tarentolae* também foi confirmada nas análises *in silico* realizadas. Uma aparente deleção do gene MOGS também foi observada em *L. enrietti*. Diferenças no padrão de aglutinação entre tripanossomatídeos patogênicos e não patogênicos, foram observadas ao utilizar neoglicoproteínas (NGP) marcadas com fluorescência (KOCK et al., 1997). A diversidade de glicoconjugados e os diferentes padrões de aglutinação entre espécies patogênicas e apatogênicas somente reforçam a ideia de sua importância no processo de infecção, sobrevivência intracelular e virulência.

A partir da identificação dessas alterações do perfil metabólico e confirmação desses dados por citometria e RT-qPCR, além das análises *in silico*, decidimos então investigar melhor o papel desses genes, deletando o gene Alg11 (**Figura 10**) e realizando o *knock-in* do gene Alg9 (**Figura 11**) em *L. braziliensis*. Utilizando a metodologia desenvolvida por Beneke e colaboradores (2017), obtivemos sucesso no *knockout* do gene Alg11, o que foi confirmado através da ausência desse gene no genoma (**Figura 10B**) e a ausência de expressão desse mRNA (**Figura 12A**). Diversos autores têm utilizado com sucesso essa metodologia, o que demonstra sua eficiência em gerar *knockouts* completos em tripanossomatídeos para *screening* e estudos de função (GREWAL et al., 2019; ADAUI et al., 2020; DAMASCENO, REIS-CUNHA., 2020; DAMIANOU et al., 2020; TURRA et al., 2021; ESPADA et al., 2021).

O *knock-in* do gene Alg9 de *L. infantum* também foi realizado com sucesso em *L. braziliensis*, utilizando o vetor pSSU de Misslitz e colaboradores (2000). Ao verificar a expressão de mRNA do gene Alg9, observamos a expressão desse gene tanto em formas promastigotas quanto em formas amastigotas intracelulares nos clones avaliados (**Figura**

12B). Isso pode ser explicado devido a presença da região intergênica do gene cisteína proteinase B (CPB IR) de *L. mexicana* no plasmídeo pSSU, que fornece um forte sinal para poliadenilação necessário para um alto nível de expressão (MISSLITZ et al., 2000). Este vetor tem sido utilizado com diferentes propósitos, por exemplo, para realizar *addback* em *L. donovani* (ROBERTS et al., 2022), expressar GFP em *L. major* (KLEINHOLZ et al., 2021) e para superexpressar Casein kinase 1 (CK1) em *L. donovani* (DAN-GOOR et al., 2013).

Para caracterizar os mutantes de *L. braziliensis* para os genes Alg11 e Alg9, analisamos o perfil de crescimento dos mutantes em relação aos controles (**Figuras 13 e 14**). Os clones *knockout* para o gene Alg11 apresentaram variações significativas no perfil de crescimento, enquanto o clone 1 do *knockout* apresentou um crescimento mais lento, o clone 4, por outro lado, apresentou maior densidade de parasitos em relação ao controle. Nesse mesmo contexto, análises do padrão de crescimento de parasitos *knockout* para o gene GDPMP (GDP-manose pirofosforilase) em *L. mexicana*, mostram que na ausência desse gene os parasitos continuam viáveis apresentando apenas uma ligeira diminuição no crescimento quando comparado a parasitos selvagens (GARAMI, ILG., 2001). Entre os clones *knock-in* do gene Alg9 notamos algo semelhante, o clone 3 atingiu o pico de crescimento um dia antes dos demais e o clone 2 apresentou maior densidade de células quando comparado ao controle. De um modo semelhante, a superexpressão de CK1 em *L. donovani*, levou ao aumento do crescimento dos parasitos superexpressores em relação aos parasitos selvagens (DAN-GOOR et al., 2013). Por outro lado, a superexpressão do gene miniexon em *L. braziliensis* não revelou diferenças significativas no crescimento em relação ao controle (DE TOLEDO et al., 2009). Outros estudos têm mostrado diferentes perfis de crescimento ao avaliar função gênica em *Leishmania*, apresentando ou não diferenças significativas dos mutantes em relação ao controle (TRAN et al., 2015; FENG et al., 2018; JESUS-SANTOS et al., 2020; ESPADA et al., 2021; POLANCO et al., 2022).

Para investigar o impacto da deleção do gene Alg11 e *knock-in* do gene Alg9 em *L. braziliensis*, realizamos ensaios de infecção *in vitro* utilizando células THP-1 (**Figuras 15 e 17**). Os dados obtidos mostram que os clones *knockout* para o gene Alg11 apresentaram um aumento significativo na relação amastigota/célula e no percentual de células infectadas com 4 horas para todos os clones avaliados, e com 24 horas apenas para o clone 4 (**Figura 16**). Por sua vez, com 48 horas de infecção, foi observada uma redução

na infectividade em ambas as variáveis analisadas (**Figura 16**). Esses resultados sugerem que o *knockout* do gene Alg11 pode estar afetando a capacidade do parasito invadir células. Ao avaliar a infectividade *in vitro* dos clones *knock-in* do gene Alg9, é possível notar um aumento expressivo tanto na relação amastigota/célula quanto no percentual de células infectadas em dois dos clones avaliados, quando comparado ao controle (**Figura 18**), esse padrão foi observado em todos os tempos avaliados. Esses dados sugerem que o gene Alg9 pode ter um papel na invasão e sobrevivência dos parasitos dentro da célula. Diversos estudos funcionais envolvendo parasitos mutantes para genes envolvidos em vias de glicosilação reforçam a importância dos glicoconjugados na infecção e processos de evasão do sistema imune (WILSON, HARDIN, 1988; TURCO, DESCOTEAUX, 1992; DERMINE et al., 2000; GOMEZ et al., 2009; GAUR et al., 2009; SVÁROVSKÁ et al., 2010; CABEZAS et al., 2015; LÁZARO-SOUZA et al., 2018; JESUS-SANTOS et al., 2020; QUINTELA-CARVALHO et al., 2022). GDPMP (GDP-manose pirofosforilase), gene envolvido na ativação da manose, também tem importante papel neste processo, sua ausência leva a uma total perda de virulência, pois os parasitos mutantes são incapazes de infectar células (GARAMI, ILG., 2001). Em outro estudo, envolvendo parasitos *knockout* para o gene GPI12 (*N*-acetilglucosamina fosfatidilinositol de-*N*-acetilase), enzima da via de síntese GPI, em *L. major*, mostrou que o *knockout* deste gene também leva a incapacidade de provocar infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ALMANI et al., 2016).

Em seguida, foi investigado o perfil de carboidratos que compõe os glicoconjugados presentes na superfície dos parasitos *knockout* para o gene Alg11. Utilizando concanavalina A, que se liga a resíduos de α -D-manose e α -D-glicose, observamos um aumento desses carboidratos na superfície dos parasitos *knockout* (**Figuras 19 e 20**), principalmente, após 12 e 24 h de amastigogênese. Padrão semelhante foi observado através da purificação dos GIPLs presentes nesses parasitos mutantes, que foram submetidos a eletroforese de carboidratos (**Figura 21**), os parasitos *knockouts* apresentaram maior quantidade de resíduos de manose. Estes dados juntamente com os dados de infecção *in vitro* dos clones *knockout* para o gene Alg11 refutam a hipótese proposta anteriormente.

Análises da via de *N*-glicosilação em *L. braziliensis* (**Figura 8**), mostram que o gene Alg11 atua adicionando dois resíduos de manose ao oligossacarídeo que está sendo sintetizado, ainda no lado citosólico, antes do início do processo no lúmen do retículo

endoplasmático. A deleção desse gene poderia então impedir a continuidade da via de biossíntese do glicano que seria transferido para proteínas de superfície do parasito. No entanto, a maior quantidade de resíduos de manose identificados na superfície desses parasitos mutantes para o gene Alg11, observada nos experimentos de citometria de fluxo com lectinas e na eletroforese de carboidratos, sugere que houve uma compensação da ausência desse gene no processo de biossíntese do glicano nessa via de *N*-glicosilação de proteínas.

Existem vários relatos da ocorrência de mecanismos compensatórios após o *knockout* de genes em *Leishmania* (MCGWIRE et al., 1996; SPATH et al., 2004; TUPPERWAR et al., 2019; POLANCO et al., 2022), que envolve desde alterações na expressão de outros genes até a existência de modos alternativos de transporte de proteínas. LPG é uma molécula que tem sido extensivamente relacionada a virulência, e na maioria dos casos seu *knockout* leva a perda de virulência (ELHAY et al., 1990; LÁZARO-SOUZA et al., 2018; JESUS-SANTOS et al., 2020; QUINTELA-CARVALHO et al., 2022). Entretanto, Spath e colaboradores (2004) em seu estudo, observaram que parasitos mutantes para LPG foram capazes de provocar doença em animais na ausência desse glicoconjugado e não foi evidenciada recuperação da capacidade de sintetizar LPG, evidenciando a existência de mecanismos de sobrevivência intracelular independentes de LPG (SPATH et al., 2004).

Somado a esse cenário, diversas alterações podem ocorrer ao deletar um gene, McGwire e colaboradores (1996) observaram que a indução de mutações em sítios específicos da metaloprotease - gp63 (H²⁶⁴EXXH), locais potenciais de *N*-glicosilação e adição de glicosil fosfatidilinositol, alteram a ancoragem da protease, a estabilidade e sua atividade catalítica, mas não afetam o transporte. Estes autores mostraram, que na ausência destes sítios de ancoragem a metaloprotease fica livre, podendo ser transportada por outras vias, ou por vesículas (MCGWIRE et al., 1996).

Ainda foi observado que a deleção de LeishIF4E1, um fator de iniciação da tradução, em *L. mexicana*, resulta em alterações morfológicas, incapacidade de infectar células, diminuição do crescimento em cultura, além de alterações no perfil de expressão de diversas proteínas. Dessas proteínas, algumas que tiveram sua expressão diminuída, são componentes da haste paraflagelar e citoesqueleto, proteínas com função mitocondrial, proteínas relacionadas ao metabolismo de RNA, além de proteínas relacionadas a virulência como gp63, gp46 e PSA. Outras que tiveram sua expressão

aumentada, são proteínas relacionadas a gliconeogênese e metabolismo de ácidos graxos (TUPPERWAR et al., 2019). Mostrando mais uma vez que a deleção de um gene pode gerar diversas alterações, impactando uma série de funções biológicas.

A deleção de LPG e fucosiltransferase em *L. major* pode levar ainda a alterações na expressão de genes em diferentes vias, o que foi evidenciado pela alteração na expressão de 249 genes, incluindo proteínas mitocondriais, o que gerou um forte impacto na função mitocondrial (POLANCO et al., 2022). *Spliced leader*, um gene que atua na maturação do mRNA, ao ser superexpresso em *L. major*, leva a expressão diferencial de 39 genes, alguns diretamente relacionados a degradação de RNA e proteínas, outros associados a diferenças nas respostas ao estresse, sugerindo uma relação entre o excesso de SL RNA e o aumento da atividade translacional (TOLEDO et al., 2010).

Sabe-se que diversos mecanismos biológicos estão interligados, sendo assim ao deletar um gene, outro pode cumprir sua função no processo de infecção, sobrevivência e ou metabolismo (GARAMI, ILG., 2001). Essa capacidade pode estar relacionada à enorme plasticidade gênica e adaptativa dos parasitos do gênero *Leishmania* (CRUZ et al., 1993; ROGERS et al., 2011; STERKERS et al., 2012; LACHAUD et al., 2014). Devido a essa enorme plasticidade genética, supomos então que a ausência do gene Alg11 estaria sendo compensada por outro gene, o que permitiria a continuidade do processo e explicaria ainda no aumento da presença de carboidratos (resíduos de α -D-manose e/ou α -D-glicose) na superfície dos parasitos *knockout* quando comparado ao controle. Para investigar quais genes estariam envolvidos nesse possível mecanismo de compensação, a expressão dos genes relacionados a via de *N*-glicosilação em *Leishmania* foram avaliadas por RT-qPCR.

Assim, ao avaliar a expressão de mRNA de 10 genes descritos como enzimas que atuam na via de *N*-glicosilação em *Leishmania*, observamos que a expressão desses genes é estágio-específica o que pode estar estritamente relacionado a sua função. A expressão dos genes da via de *N*-glicosilação nos parasitos *knockout* para o gene Alg11 (α -1,2-manosiltransferase) mostrou um aumento na expressão dos transcritos das enzimas Alg3 (α -1,3-manosiltransferase), OST (oligossacaril-transferase), MOGS (manosil-oligossacarídeo glicosidase) e GANAB (alfa-glicosidase neutra AB) para os clones 1 e 2. Estas alterações podem explicar o aumento na detecção de resíduos de manose nos parasitos mutantes, pois a enzima Alg3 atua imediatamente após Alg11 na via de *N*-glicosilação, adicionando uma molécula de manose ao glicano, e a enzima OST atua na

transferência do oligossacarídeo de Dol-PP para a cadeia lateral de asparagina. Os dados de expressão de mRNA dos mutantes *knock-in* do gene Alg9 (α -1,2-manosiltransferase) mostram que, dos genes relacionados a *N*-glicosilação, apenas Alg9 não é expresso em *L. braziliensis wild type*, corroborando mais uma vez os dados obtidos das análises *in silico*. Além da expressão do gene Alg9, observamos uma aparente regulação na expressão de genes que eram mais expressos nos parasitos selvagens, como Alg3 e OST, o que nos mostra mais uma vez a capacidade desses parasitos em regular a expressão de genes negativamente ou positivamente. A avaliação da expressão de mRNA de enzimas da via de *N*-glicosilação em *Leishmania* por RTq-PCR é algo inédito e, até o momento, os dados eram obtidos através de estudos de proteômica (VERAS et al., 2016; CAPELLI-PEIXOTO et al., 2019), ou do perfil de aglutinação, utilizando lectinas como a Concanavalina A (DWYER, 1974; GARDINER et al., 1983; PARODI et al., 1984; SACKS et al., 1985; DA SILVA, SACKS., 1987; MUSKUS et al., 1997; KOCK et al., 1997; LEAL et al., 2004).

De um modo semelhante, o *knockout* de três genes clusterizados, os transportadores de glicose GT1, GT2, GT3 em *L. mexicana*, tornou os parasitos deficientes na adição de glicose, frutose, manose e galactose. Estes mutantes mostraram diversas alterações fenotípicas em ambas as formas evolutivas, como impactos no crescimento, na sobrevivência intracelular, alterações na ploidia de cromossomos, e ainda a amplificação de um gene transportador de hexose (FENG et al., 2009). De modo semelhante ao presente estudo, o *knockout* de transportadores de glicose também levou a um aumento na expressão de mRNA e proteína em diversos genes (FENG et al., 2011).

Estas alterações fenotípicas em diferentes genes podem representar mecanismos de adaptação ao estresse causado pela perda de um determinado gene. A amplificação gênica é um fenômeno bem estabelecido em *Leishmania*, ocorrendo com mais frequência no contexto de resistência a drogas, no entanto, também têm sido relatada em condições semelhantes ao que observamos neste estudo (BEVERLEY, 1991; FENG et al., 2011). Os parasitos do gênero *Leishmania* estão expostos a diversos desafios durante o seu ciclo de vida, incluindo mudanças na disponibilidade de nutrientes centrais, como glicose e manose, de modo que a adaptação a tais mudanças é fundamental para a sobrevivência entre os diferentes estágios evolutivos e hospedeiros (FENG et al., 2011). Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no processo de *N*-glicosilação nas diferentes espécies de *Leishmania*, avaliar os impactos da perda desses

genes e seu possível papel na adaptação ao parasitismo intracelular. A perda de alguns destes genes em espécies apatogênicas para mamíferos pode ser a chave para elucidar mecanismos fundamentais no estabelecimento da infecção e desenvolvimento de fármacos e vacinas.

7. Conclusão

A realização deste estudo nos permitiu ampliar os conhecimentos acerca do perfil de *N*-glicosilação em *Leishmania* e os mecanismos que o parasito utiliza para manter funções biológicas essenciais.

Foi possível observar que os genes relacionados a *N*-glicosilação são de extrema importância para a biologia do parasito, pois são conservados entre as espécies, no entanto, os níveis de expressão são variáveis entre as diferentes formas evolutivas e espécies.

Com a obtenção dos mutantes *knockout* para o gene Alg11 e *knock-in* do gene Alg9, não foi evidenciado um impacto no crescimento dos parasitos mutantes, no entanto, estes genes podem estar relacionados a capacidade desses parasitos em invadir as células.

Como observado neste estudo, na ausência de um desses genes, Alg11, o parasito possivelmente desenvolve mecanismos compensatórios que permitem continuidade do processo, aumentando a expressão de outras enzimas da via.

Por outro lado, ao realizar o *knock-in* do gene , Alg9 em *L. braziliensis*, o parasito é capaz de regular negativamente outros genes da via, o que pode favorecer a homeostase do processo de glicosilação.

Assim, este estudo ilustra mais uma vez a plasticidade genotípica e fenotípica dos parasitos do gênero *Leishmania*, em especial em se tratando de mecanismos essenciais para a sobrevivência e infectividade do parasito relacionados ao processo de *N*-glicosilação.

8. Perspectivas

- Sintetizar peptídeos derivados das proteínas Alg11 e Alg9 para produção de anticorpos policlonais. Estes anticorpos serão utilizados em ensaios de *western blot* e imunofluorescência para avaliação adicional da expressão e *knockout* dos genes selecionados, além de realizar imunolocalização das proteínas alvo deste estudo;
- Realizar infecções *in vivo* com os clones *knockout* para o gene LbrM2903_340062700 e *knock-in* do gene LINF_120006700 para avaliar se há modificações no perfil de infecção com os parasitos mutantes;
- Realizar novamente a inserção do gene LbrM_2903_340062700 (*add back*) nos clones nos quais o mesmo foi deletado a fim de verificar o reestabelecimento do fenótipo original;
- Realizar estudos comparativos de transcriptômica entre *L. braziliensis* selvagem e os mutantes obtidos neste trabalho.

9. Referências Bibliográficas

ADAUI, V.; KRÖBER-BONCARDI, C.; BRINKER, C.; ZIRPEL, H.; SELLAU, J.; ARÉVALO, J.; DUJARDIN, J.C.; CLOS, J. Application of CRISPR/Cas9-Based Reverse Genetics in *Leishmania braziliensis*: Conserved Roles for HSP100 and HSP23. *Genes (Basel)*. 2020 Sep 30;11(10):1159.

AGREN, R.; LIU, L.; SHOAIE, S.; VONGSANGNAK, W. et al. The RAVEN toolbox and its use for generating a genome-scale metabolic model for *Penicillium chrysogenum*. *PLoS Comput Biol*, 9, n. 3, p. e1002980, 2013.

AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, n. 3, p. e0004349, Mar 2016.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*, 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALMANI, P.G; SHARIFI, I; KAZEMI, B; BABAEI, Z; BANDEHPOUR, M; SALARI, S; DEZAKI, E.S; TOHIDI, F; MOHAMMADI, M.A. The role of GlcNAc-PI-de-N-acetylase gene by gene knockout through homologous recombination and its consequences on survival, growth and infectivity of *Leishmania major* in in vitro and in vivo conditions. *Acta Trop*. 2016 Feb;154:63-72.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol*, 35, n. 7, p. 699-705, Oct 2010.

ASSIS, R.R.; IBRAIM, I.C.; NORONHA, F.S.; TURCO, S.J.; SOARES, R.P. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1543.

ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; BRESTELLI, J. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res*, 38, n. Database issue, p. D457-462, Jan 2010.

ATAPOUR, A.; GHALAMFARSA, F.; NADERI, S.; HATAM, G. Designing of a Novel Fusion Protein Vaccine Candidate Against Human Visceral Leishmaniasis (VL) Using Immunoinformatics and Structural Approaches. *Int J Pept Res Ther*. 2021.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. CANINE leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 24, 324–330, 2008.

BARAK, E.; AMIN-SPECTOR, S.; GERLIAK, E.; GOYARD, S.; HOLLAND, N.; ZILBERSTEIN, D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 May;141(1):99-108.

BARTHOLOMEU, D.C.; TEIXEIRA, S.M.R.; CRUZ, A.K. Genomics and functional genomics in *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*: statuses, challenges and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021 Mar 29;116:e200634.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, 64, p. 1-109, 2007.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D.A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.

BARRANGOU, R.; BIRMINGHAM, A.; WIEMANN, S.; BEIJERSBERGEN, R.L.; HORNUNG, V.; SMITH, A.V. Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):3407-19.

BATES, P.A.; DWYER, D.M. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem.Parasitol*. 1987, 26, 289–296.

BERHE, S.; GEROLD, P.; KEDEES, M.H.; HOLDER, A.A.; SCHWARZ, R.T. *Plasmodium falciparum*: merozoite surface proteins 1 and 2 are not posttranslationally modified by classical N- or O-glycans. *Exp Parasitol*. 2000; 94:194–197.

BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol*, 28, n. 4, p. 1389-1400, Apr 1998.

BENEKE, T.; GLUENZ, E. LeishGEdit: A Method for Rapid Gene Knockout and Tagging Using CRISPR-Cas9. *Methods Mol Biol*.2019;1971:189-210.

BENEKE, T.; MADDEN, R.; MAKIN, L.; VALLI, J. et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci*, 4, n. 5, p. 170095, May 2017.

BENSON, D. A.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J. et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*, 43, n. Database issue, p. D30-35, Jan 2015.

BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol*, 6, n. 1, p. 35-40, Jan 1998.

BEVERLEY, S.M. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*. 1991;45:417-44. doi: 10.1146/annurev.mi.45.100191.002221.

BEVERLEY, S.M. Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nat Rev Genet*. 2003 Jan;4(1):11-9.

BICKEL, T.; LEHLE, L.; SCHWARZ, M.; AEBI, M.; JAKOB, C.A. Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in *Saccharomyces cerevisiae*: Alg13p and Alg14p form a complex required for the formation of GlcNAc2-PP-Dolichol. *J Biol Chem*. 2005.

BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *leishmania* virulence, *Med. Microbiol. Immunol*. 204 .2015, 619–634.

BIFELD, E.; LORENZEN, S.; BARTSCH, K.; VASQUEZ, J.-J.; SIEGEL, T.N.; CLOS, J. Ribosome profiling reveals HSP90 inhibitor effects on stage-specific protein synthesis in *Leishmania donovani*. *Msystems* 2018, 3, e00214.

BLACKWELL, J.M.; EZEKOWITZ, R.A.; ROBERTS, M.B.; CHANNON, J.Y.; SIM, R.B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J Exp Med*. 1985 Jul 1;162(1):324-31.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; FUMAROLA, L.; LEOGRANDE, D. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia*. 2000 Dec;42(3-4):183-90.

BURDA, P.; AEBI, M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jan 6;1426(2):239-57. doi: 10.1016/s0304-4165(98)00127-5. PMID: 9878760.

BRASIL, 2017. Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>, Acesso em: 25 setembro, 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2 ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRAZIL, R.P.; RODRIGUES, A.A.F.; FILHO, J.D.A. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas—A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol*. 2015; 4:144.

BONDY-DENOMY, J.; DAVIDSON, A. R. "To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR–Cas systems." *Trends Microbiol* 2014 22(4): 218-225.

BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; BAUER, F.S.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; MORGADO, A.A.; SOARES, I.S.; BATISTA, L.M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*. 2008 Sep 15;26(39):4991-7.

BOSCH, M.; TROMBETTA, S.; ENGSTROM, U.; PARODI, A.J. Characterization of dolichol diphosphate oligosaccharide: protein oligosaccharyltransferase and glycoprotein-processing glucosidases occurring in trypanosomatid protozoa. *J Biol Chem*. 1988 Nov 25;263(33):17360-5.

BOUVIER, J.; ETGES, R.; BORDIER, C. Identification of the promastigote surface protease in seven species of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987 May;24(1):73-9.

BURLE-CALDAS, G.; E. A.; GRAZIELLE-SILVA, V.; LAIBIDA, L. A.; DAROCHA, W. D. et al. Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 203, n. 1-2, p. 25-33, 2015 Sep-Oct 2015.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, n. 4, p. 611-622, Apr 2009.

BUXBAUM, L.U. *Leishmania mexicana* infection induces IgG to parasite surface glycoinositol phospholipids that can induce IL-10 in mice and humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 9;7(5):e2224.

CABEZAS, Y.; LEGENTIL, L.; ROBERT-GANGNEUX, F.; DALIGAULT, F.; BELAZ S; NUGIER-CHAUVIN, C.; TRANCHIMAND, S.; TELLIER, C.; GANGNEUX, J.P.; FERRIÈRES, V. *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Org Biomol Chem*. 2015 Aug 21;13(31):8393-404.

CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R. X.; MARCO, J. D.; UEZATO, H. et al. *Leishmania* isoenzyme polymorphisms in Ecuador: relationships with geographic distribution and clinical presentation. *BMC Infect Dis*, 6, p. 139, Sep 2006.

CARDOSO, C.A.; ARAUJO, G.V.; SANDOVAL, C.M.; NOGUEIRA, P.M.; ZÚNIGA, C.; SOSA-OCHOA, W.H.; LAURENTI, M.D.; SOARES, R.P. Lipophosphoglycans from dermatropic *Leishmania infantum* are more pro-inflammatory than those from viscerotropic strains. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 2020, 115, 115.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W.D, Jr. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis*. 1992

QUINTELA-CARVALHO, G.; GOICOCHEA, A.M.C.; MANÇUR-SANTOS, V.; VIANA, S.M.; LUZ, Y.D.S.; DIAS, B.R.S.; LÁZARO-SOUZA, M.; SUAREZ, M.; DE OLIVEIRA, C.I.; SARAIVA, E.M.; BRODSKYN, C.I.; VERAS, P.T.; DE MENEZES,

J.P.B.; ANDRADE, B.B.; LIMA, J.B.; DESCOTEAUX, A.; BORGES, V.M. *Leishmania infantum* Defective in Lipophosphoglycan Biosynthesis Interferes With Activation of Human Neutrophils. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Apr 6;12:788196.

CARRIÓN, J.; FOLGUEIRA, C.; SOTO, M.; FRESNO, M.; REQUENA, J.M. *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation. *Parasit Vectors.* 2011 Jul 27;4:150.

CAVALCANTE-COSTA, V.S.; COSTA-REGINALDO, M.; QUEIROZ-OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, A.C.S.; COUTO, N.F.; DOS ANJOS, D.O, et al. *Leishmania amazonensis* Hijacks Host Cell Lysosomes Involved in Plasma Membrane Repair to Induce Invasion in Fibroblasts. *J Cell Sci* (2019) 132(6).

CAPELLI-PEIXOTO J.; MULE, S.N.; TANO, F.T.; PALMISANO, G; STOLF, B.S. Proteomics and Leishmaniasis: Potential Clinical Applications. *Proteomics Clin Appl.* 2019 Nov;13(6):e1800136. doi: 10.1002/prca.201800136. Epub 2019 Aug 26.

CIPOLLO, J.F.; TRIMBLE, R.B.; CHI, J.H.; DEAN, N. The yeast ALG11 gene specifies addition of the terminal α 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol N-glycosylation intermediate formed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2001; 276:21828–21840.

CHANG, K. P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol*, 44, p. 499-529, 1990.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*, 193, n. 4254, p. 678-680, Aug 1976.

CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol.* 1994 May;14(5):2975-84.

CHAREST, H.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem.* 1996 Jul 19;271(29):17081-90.

CHEN, D. Q.; KOLLI, B. K.; YADAVA, N.; LU, H. G. et al. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect Immun*, 68, n. 1, p. 80-86, Jan 2000.

CLAYTON, C. E. Control of gene expression in trypanosomes. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 43, 37–66 (1992).

CLAYTON, C. E. Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today*, 15, n. 9, p. 372-378, Sep 1999.

CLEGG, R. M.; LOONTIENS, F. G.; VAN LANDSCHOOT, A.; JOVIN, T. M. Binding kinetics of methyl alpha-D-mannopyranoside to concanavalin A: temperature-jump relaxation study with 4-methylumbelliferyl alpha-D-mannopyranoside as a fluorescence indicator ligand. *Biochemistry*, 20, n. 16, p. 4687-4692, Aug 1981.

COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; CARVALHO, F. A.; CHAVES, K. F. et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun*, 71, n. 7, p. 3988-3994, Jul 2003.

CONTRERAS, I.; GÓMEZ, M.A.; NGUYEN, O.; SHIO, M.T.; MCMASTER, R.W.; OLIVIER, M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog.* 2010 Oct 14;6(10):e1001148.

COUGHLIN, B.C.; TEIXEIRA, S.M.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *J Biol Chem.* 2000 Apr 21;275(16):12051-60.

COUTO, J.R.; HUFFAKER, T.C.; ROBBINS, P.W. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a yeast mannosyltransferase from the asparagine-linked glycosylation pathway. *J Biol Chem.* 1984; 259:378–382.

COELHO-FINAMORE, J.M.; FREITAS, V.C.; ASSIS, R.R.; MELO, M.N.; NOVOZHILOVA, N.; SECUNDINO, N.F et al. *Leishmania infantum*:

Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *International journal for parasitology*. 2011 Mar;41(3-4):333-42.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 19, n. 1, p. 111-126, Jan 2006.

CRUZ, A.K.; BEVERLEY, S.M. Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature*. 1990 Nov 8;348(6297):171-3.

CRUZ, A. K.; TITUS, R.; BEVERLEY, S. M. Plasticity in Chromosome Number and Testing of Essential Genes in *Leishmania* by Targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*1993. 90 (4), 1599–1603. doi: 10.1073/pnas.90.4.1599

CUMMINGS, R.D.; PIERCE, J.M. The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol*. 2014 Jan 16;21(1):1-15. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.12.010.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol*, 72, n. 2, p. 132-141, Apr 2002.

CUI, Y.; YU, L. Application of the CRISPR/Cas9 gene editing technique to research on functional genomes of parasites. *Parasitol Int*. 2016 Dec;65:641-644.

DACHER, M.; MORALES, M.A.; PESCHER, P.; LECLERCQ, O.; RACHIDI, N.; PRINA, E.; CAYLA, M.; DESCOTEAUX, A.; SPÄTH, G.F. Probing druggability and biological function of essential proteins in *Leishmania* combining facilitated null mutant and plasmid shuffle analyses. *Mol Microbiol*. 2014 Jul;93(1):146-66.

DAN-GOOR, M.; NASEREDDIN, A.; JABER, H.; JAFFE, C.L. Identification of a secreted casein kinase 1 in *Leishmania donovani*: effect of protein over expression on parasite growth and virulence. *PLoS One*. 2013 Nov 15;8(11):e79287.

DAMASCENO, J. D.; REIS-CUNHA, J. Conditional Knockout of RAD51-Related Genes in *Leishmania Major* Reveals a Critical Role for Homologous Recombination During Genome Replication. *PloS Genet*.2020.

DAMIANOU, A.; BURGE, R. J.; CATTAPRETA, C. M. C.; GEOGHEGAN, V.; NIEVAS, Y. R.; NEWLING, K., et al. Essential Roles for Deubiquitination in *Leishmania* Life Cycle Progression. *PloS Pathog*.2020.

DA, SILVA, R.; SACKS, D.L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun.* 1987 Nov;55(11):2802-6.

DAVID, M.; GABDANK, I.; BEN-DAVID, M.; ZILKA, A.; ORR, I.; BARASH, D.; SHAPIRA, M. Preferential translation of Hsp83 in *Leishmania* requires a thermosensitive polypyrimidine-rich element in the 3' UTR and involves scanning of the 5' UTR. *RNA* 2010, 16, 364–374.

DE MACEDO, C.S.; SHAMS-ELDIN, H.; SMITH, T.K.; SCHWARZ, R.T.; AZZOUZ, N. Inhibitors of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis. *Biochimie*, 2003, 85(3-4), 465-472.

DE PAIVA, R. M.; GRAZIELLE-SILVA, V.; CARDOSO, M. S.; NAKAGAKI, B. N. et al. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. *PLoS Pathog*, 11, n. 12, p. e1005296, Dec 2015.

DE, TOLEDO, J.S.; JUNQUEIRA, DOS, SANTOS, A.F.; RODRIGUES, DE, MOURA, T.; ANTONIAZI, S.A.; BRODSKYN, C.; INDIANI, DE, OLIVEIRA, C.; BARRAL, A.; CRUZ, A.K. *Leishmania (Viannia) braziliensis* transfectants overexpressing the miniexon gene lose virulence in vivo. *Parasitol Int.* 2009 Mar;58(1):45-50.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta*, 1455, n. 2-3, p. 341-352, Oct 1999.

DELGADO-DOMÍNGUEZ, J.; GONZÁLEZ-AGUILAR, H.; AGUIRRE-GARCÍA, M.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L.; BERZUNZA-CRUZ, M.; RUIZ-REMIGIO, A.; ROBLES-FLORES, M.; BECKER, I. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunol.* 2010 Jun;32(6):440-9.

DEMPSKI, ROBERT, E, J.R.; IMPERIALI, B. Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6:844–850.

DERMINE, J.F.; SCIANIMANICO, S.; PRIVÉ, C.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively

modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* 2000.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*, 5, p. 276, Dec 2012.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, n. 6213, p. 1258096, Nov 2014.

DUNCAN, S.M.; JONES, N.G.; MOTTRAM, J.C. Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. *Mol Biochem Parasitol.* 2017 Sep; 216:30-38.

DUNCAN, S.M.; FERGUSON, M.A.J. Common and unique features of glycosylation and glycosyltransferases in African trypanosomes. *Biochem J.* 2022 Sep 16;479(17):1743-1758.

DWYER, D.M. Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan. *Science.* 1974 Apr 26;184(4135):471-3.

ELHAY, M.; KELLEHER, M.; BACIC, A.; MCCONVILLE, M. J. et al. Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, 40, n. 2, p. 255-267, May 1990.

ELMAHALLAWY, E.K.; ALKHALDI, A.A.M.; SALEH, A.A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jul;139:111671.

ESPADA, C.R.; QUILLES, J.C, JR.; ALBUQUERQUE-WENDT A.; CRUZ, M.C.; BENEKE, T.; LORENZON, L.B.; GLUENZ, E.; CRUZ, A.K.; ULIANA, S.R.B. Effective Genome Editing in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Stably Expressing Cas9 and T7 RNA Polymerase. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Nov 10;11:772311.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev. Physiol.* 1999, 61, 243–282.

FELSENSTEIN, J. Mathematics vs. Evolution: Mathematical Evolutionary Theory. *Science*, 246, n. 4932, p. 941-942, Nov 1989.

FENG, X.; RODRIGUEZ-CONTRERAS, D.; BUFFALO, C.; BOUWER, H.G.; KRUVAND, E.; BEVERLEY, S.M.; LANDFEAR, S.M. Amplification of an alternate transporter gene suppresses the avirulent phenotype of glucose transporter null mutants in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol.* 2009 Jan;71(2):369-81.

FENG, X.; FEISTEL, T.; BUFFALO, C.; MCCORMACK, A.; KRUVAND, E.; RODRIGUEZ-CONTRERAS, D.; AKOPYANTS, N.S.; UMASANKAR, P.K.; DAVID, L.; JARDIM, A.; BEVERLEY, S.M.; LANDFEAR, S.M. Remodeling of protein and mRNA expression in *Leishmania mexicana* induced by deletion of glucose transporter genes. *Mol Biochem Parasitol.* 2011 Jan;175(1):39-48.

FENG, X.; TRAN, K.D.; SANCHEZ, M.A.; AL, MEZEWGHI, H.; LANDFEAR, S.M. Glucose Transporters and Virulence in *Leishmania mexicana*. *mSphere.* 2018 Aug 1;3(4):e00349-18. doi: 10.1128/mSphere.00349-18.

FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*, 112 (Pt 17), p. 2799-2809, Sep 1999.

FERGUSON, M.A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997 Sep 29;352(1359):1295-302.

FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A.; MACHADO-COELHO, G.L.; GRIMALDI, G. JR.; GAZZINELLI, R.T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr Opin Microbiol.* 2012 Aug;15(4):476-85.

FORESTIER, C.L.; GAO, Q.; BOONS, G.J. *Leishmania* lipophosphoglycan: How to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014, 4, 193.

FRANK, C.G.; AEBI, M. ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. *Glycobiology.* 2005; 15:1156–1163.

GARAMI, A.; ILG, T. Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana*: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability. EMBO J. 2001 Jul 16;20(14):3657-66.

GARDINER, P.R.; DWYER, D.M. Radioiodination and identification of externally disposed membrane components of *Leishmania tropica*. Mol Biochem Parasitol. 1983 Aug;8(4):283-95.

GAUR, U.; SHOWALTER, M.; HICKERSON, S.; DALVI, R.; TURCO, S.J.; WILSON, M.E.; BEVERLEY, S.M. *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. Exp Parasitol. 2009 Jul;122(3):182-91.

GAVGANI, A. S.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. Lancet, 360, n. 9330, p. 374-379, Aug 2002.

GAZANION, É.; FERNÁNDEZ-PRADA, C.; PAPADOPOULOU, B.; LEPROHON, P.; OUELLETTE, M. Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite *Leishmania*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 May 24;113(21):E3012-21.

GHEDIN, E.; ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S. et al. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol, 4, n. 5, p. 530-535, Sep 1997.

GHORBAL, M.; GORMAN, M.; MACPHERSON, C. R.; MARTINS, R. M. et al. Genome editing in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* using the CRISPR-Cas9 system. Nat Biotechnol, 32, n. 8, p. 819-821, Aug 2014.

GHOSH, A.; LABRECQUE, S.; MATLASHEWSKI, G. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. Vaccine, 19, n. 23-24, p. 3169-3178, Apr 2001.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. Vaccine, 20, n. 1-2, p. 59-66, Oct 2001.

GIRAUD, E.; SVOBODOVÁ, M.; MÜLLER, I.; VOLF, P.; ROGERS, M.E. Promastigote secretory gel from natural and unnatural sand fly vectors exacerbate *Leishmania major* and *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis in mice. *Parasitology*. 2019 Dec;146(14):1796-1802. Epub 2019 Aug 29.

GLEW, R.H.; SAHA, A.K.; DAS, S.; REMALEY, A.T. Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiol. Rev.* 1988, 52, 412–432.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; SINCLAIR, D.; FIROOZ, A. et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*, n. 8, p. CD008736, Aug 2015.

GOMEZ, M.A.; CONTRERAS, I.; HALLÉ, M.; TREMBLAY, M.L.; MCMASTER, R.W.; OLIVIER, M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal*. 2009;2: ra58 10.1126/scisignal.2000213

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 3(1):23–35.

GOSLINE, S.J.; NASCIMENTO, M.; MCCALL, L.I.; ZILBERSTEIN, D.; THOMAS, D.Y.; MATLASHEWSKI, G.; HALLETT, M. Intracellular eukaryotic parasites have a distinct unfolded protein response. *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e19118.

GREWAL, J. S.; CATTAPRETA, C. M. C.; BROWN, E.; ANAND, J.; MOTTRAM, J. C. Evaluation of Clan CD C11 Peptidase PNT1 and Other *Leishmania mexicana* Cysteine Peptidases as Potential Drug Targets. *Biochimie*. 2019; 166, 150–160.

GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, AK. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol*. 2001 Mar;17(3):150-3.

GUHA-NIYOGI, A.; SULLIVAN, D.R.; TURCO, S.J. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*. 2001; 11:45R–59R.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun*, 61, n. 4, p. 1553-1558, Apr 1993.

HALL, A.R.; BLAKEMAN, J.T.; EISSA, A.M.; CHAPMAN, P.; MORALES-GARCÍA, A.L.; STENNETT, L.; MARTIN, O.; GIRAUD, E.; DOCKRELL, D.H.; CAMERON, N.R.; WIESE, M.; YAKOB, L.; ROGERS, M.; GEOGHEGAN, M. Glycan–glycan

interactions determine *Leishmania* attachment to the midgut of permissive sand fly vectors. *Chem Sci.* 2020;11(40):10973–83.

HANDMAN, E.; GREENBLATT, C. L.; GODING, J. W. An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. *EMBO J*, 3, n. 10, p. 2301-2306, Oct 1984.

HAYNES, P.A. Phosphoglycosylation: A new structural class of glycosylation?, *Glycobiology*, Volume 8, Issue 1, January 1998, Pages 1–5.

HERSCOVICS, A. Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Dec 6;1473(1):96-107.

HOMBACH, A.; CLOS, J.; TATU, U. No stress—Hsp90 and signal transduction in *Leishmania*. *Parasitology* 2014, 141, 1156–1166.

ILG, T.; STIERHOF, Y.D.; ETGES, R.; ADRIAN, M.; HARBECKE, D.; OVERATH, P. Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: A filamentous phosphoglycoprotein polymer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 8774–8778.

ILG, T.; OVERATH, P.; FERGUSON, M.A.; RUTHERFORD, T.; CAMPBELL, D.G.; MCCONVILLE, M.J. O- and N-glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted acid phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *J Biol Chem.* 1994 Sep 30;269(39):24073-81.

ILG, T.; STIERHOF, Y.D.; MCCONVILLE, M.J.; OVERATH, P. Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Cell Biol.* 1995 Feb;66(2):205-15.

ILG, T.; STIERHOF, Y.D.; CRAIK, D.; SIMPSON, R.; HANDMAN, E.; BACIC, A. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J Biol Chem.* 1996 Aug 30;271(35):21583-96. doi: 10.1074/jbc.271.35.21583.

ILG, T.; HANDMAN, E.; STIERHOF, Y.D. Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Biochem Soc Trans.* 1999 Aug;27(4):518-25.

ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. Parasitol Today, 16, n. 11, p. 489-497, Nov 2000.

ISNARD, A.; SHIO, M.T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. Front Cell Infect Microbiol. 2012 May 16;2:72.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J Bacteriol. 1987 Dec;169(12):5429-33.

IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WORTHEY, E.A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M.A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S.M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C.V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R.M.; CRONIN, A.; CRUZ, A.K.; DAVIES, R.M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D.E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A.C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZFOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J.C.; MÜLLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T.M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J.C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHÄFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D.C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D.F.; BLACKWELL, J.M.; STUART, K.D.; BARRELL, B.; MYLER, P.J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science. 2005 Jul 15;309(5733):436-42.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. Mol Biol Evol, 27, n. 1, p. 33-45, Jan 2010.

JANSEN, R.; VAN EMBDEN, J.D.; GAASTRA, W.; SCHOULS, L.M. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS*. 2002;6(1):23-33.

JARDIM, A.; TOLSON, D. L.; TURCO, S. J.; PEARSON, T. W. et al. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan T lymphocyte-reactive component is a tightly associated protein complex. *J Immunol*, 147, n. 10, p. 3538-3544, Nov 1991.

JARDIM, A.; FUNK, V.; CAPRIOLI, R.M.; OLAFSON, R.W. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem. J.* 1995, 305 Pt 1, 307–313.

JESUS-SANTOS, F.H.; LOBO-SILVA, J.; RAMOS, P.I.P.; DESCOTEAUX, A.; LIMA, J.B.; BORGES, V.M.; FARIAS, L.P. LPG2 Gene Duplication in *Leishmania infantum*: A Case for CRISPR-Cas9 Gene Editing. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Aug 13;10:408.

JOHNSON, L. V.; HAGEMAN, G. S. Enzymatic characterization of peanut agglutinin-binding components in the retinal interphotoreceptor matrix. *Exp Eye Res*, 44, n. 4, p. 553-565, Apr 1987.

JONES, M.B.; ROSENBERG, J.N.; BETENBAUGH, M.J.; KRAG, S.S. Structure and synthesis of polyisoprenoids used in N-glycosylation across the three domains of life. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790:485–494.

JOSHI, S.; RAWAT, K.; YADAV, NK.; KUMAR, V.; SIDDIQI, M.I.; DUBE, A. Visceral Leishmaniasis: Advancements in Vaccine Development via Classical and Molecular Approaches. *Front Immunol.* 2014 Aug 22;5:380. KANEHISA, M. The KEGG database. *Novartis Found Symp*, 247, p. 91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152, 2002.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9, n. 8, p. 604-615, Jul 2011.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology*, p. 1-19, Jul 2014.

KELLEHER, D.J.; GILMORE, R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology.* 2006; 16:47R–62R.

KIERNAN, J. A. Localization of alpha-D-glucosyl and alpha-D-mannosyl groups of mucosubstances with concanavalin A and horseradish peroxidase. **Histochemistry**, v. 44, p. 39–45, 1975.

KINK, J.A.; CHANG, K.P. N-glycosylation as a biochemical basis for virulence in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988 Jan 15;27(2-3):181-90.

KLEINHOLZ, C.L.; RIEK-BURCHARDT, M.; SEIB, E.A.; AMORE, J.; GINTSCHEL, P.; PHILIPSEN, L.; BOUSSO, P.; RELJA, B.; SCHRAVEN, B.; HANDSCHUH, J.; MOHR, J.; MÜLLER, A.J. Ly6G deficiency alters the dynamics of neutrophil recruitment and pathogen capture during *Leishmania* major skin infection. *Sci Rep*. 2021 Jul 23;11(1):15071.

KOCK, N.P.; GABIUS, H.J.; SCHMITZ, J.; SCHOTTELIUS, J. Receptors for carbohydrate ligands including heparin on the cell surface of *Leishmania* and other trypanosomatids. *Trop Med Int Health*. 1997 Sep;2(9):863-74.

KOLEV, N. G.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryot Cell*, 10, n. 9, p. 1156-1163, Sep 2011.

KROBITSCH, S.; CLOS, J. A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 1999,4, 191.

KRÖBER-BONCARDO, C.; GRÜNEBAST, J.; CLOS, J. Heat Shock Proteins in *Leishmania* Parasites; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2020;pp. 1–20.

KUKURUZINSKA, M.A.; LENNON, K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):415-48.

KUMARI, D.; SINGH, K. Exploring the paradox of defense between host and *leishmania* parasite, *Int. Immunopharmacol*. 102 (2022), 108400.

LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; KUK, N.; MORELLE, C.; CROBU, L.; MERLIN, G.; BASTIEN, P.; PAGÈS, M.; STERKERS, Y. Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus. *Microbes Infect*. 2014 Jan;16(1):61-6. doi: 10.1016/j.micinf.2013.09.005. Epub 2013 Oct 8.

- LANDER, N.; CHIURILLO, M. A.; DOCAMPO, R. Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. *J Eukaryot Microbiol*, 63, n. 5, p. 679-690, 09 2016.
- LANDER, N.; LI, Z. H.; NIYOGI, S.; DOCAMPO, R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *mBio*, 6, n. 4, p. e01012, Jul 2015.
- LAINSON, R.; READY, P.D.; SHAW, J.J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian “uta”, as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc London*. ; 206: 307–318, 1979.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R editors. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Academic Press, London, p. 1–120, 1987.
- LARKIN, A.; IMPERIALI, B. The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation. *Biochemistry*. 31;50(21):4411-26. doi: 10.1021/bi200346n. Epub 2011.
- LÁZARO-SOUZA, M.; MATTE, C.; LIMA, J.B.; ARANGO, DUQUE, G.; QUINTELA-CARVALHO, G.; DE CARVALHO, VIVARINI, Á.; MOURA-PONTES, S.; FIGUEIRA, C.P.; JESUS-SANTOS, F.H.; GAZOS LOPES, U.; FARIAS, L.P.; ARAÚJO-SANTOS, T.; DESCOTEAUX, A.; BORGES, V.M. *Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay. *Front Microbiol*. 2018 Apr 5;9:626.
- LEAL, S.; ACOSTA-SERRANO, A.; MORRIS, J.; CROSS, G.A. Transposon mutagenesis of *Trypanosoma brucei* identifies glycosylation mutants resistant to concanavalin A. *J Biol Chem*. 2004 Jul 9;279(28):28979-88.
- LEBOWITZ, J. H.; SMITH, H. Q.; RUSCHE, L.; BEVERLEY, S. M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev*, 7, n. 6, p. 996-1007, Jun 1993.
- LEHRMAN, M.A. Biosynthesis of N-acetylglucosamine-P-P-dolichol, the committed step of asparagine-linked oligosaccharide assembly. *Glycobiology*; 1:553–562.

Leishmaniasis fact sheet. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, acesso em Maio 2020).

LIEKE, T.; NYLEN, S.; EIDSMO, L.; MCMASTER, W.; MOHAMMADI, A.M.; KHAMESIPOUR, A.; BERG, L.; AKUFFO, H. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 2008, 153, 221–230.

LIN, B.; QING, X.; LIAO, J.; ZHUO, K. Role of Protein Glycosylation in Host-Pathogen Interaction. *Cells.* 2020 Apr 20;9(4):1022. doi: 10.3390/cells9041022.

LIU D, UZONNA J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Jun 12;2:83.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. *Cell Microbiol.* 2005, 7, 1647–1658.

LÖW, P.; DALLNER, G.; MAYOR, S.; COHEN, S.; CHAIT, B.T.; MENON, A.K. The mevalonate pathway in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Identification of dolichols containing 11 and 12 isoprene residues. *J Biol Chem.* 1991 Oct 15;266(29):19250-7.

LUK, F.C; JOHNSON, T.M; BECKERS, C.J. N-linked glycosylation of proteins in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008 Feb;157(2):169-78.

LYE, L.F.; OWENS, K.; SHI, H.; MURTA, S.M.; VIEIRA, A.C.; TURCO, S.J.; TSCHUDI, C; ULLU, E.; BEVERLEY, S.M. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog.* 2010 Oct 28;6(10): e1001161.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota técnica n.38**, de 11 de novembro de 2014. Dispõe sobre a suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune® - vacina contra leishmaniose visceral canina.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*, 27, n. 2, p. 123-147, Jun 2013.

MARRAFFINI, L.A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):55-61.

MATOS, D.C.; FACCIOLI, L.A.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LUCA, P.M.; CORTE-REAL, S.; ARMÔA, G.R.; LEMES, E.M.; DECOTE-RICARDO, D.; MENDONÇA, S.C. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 May;105(3):341-7. MCCALL, L.I.; MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. *Mol Microbiol*. 2010 Jul;77(2):518-30.

MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. *Exp Parasitol*, 132, n. 2, p. 109-115, Oct 2012.

MCCONVILLE, M. J.; BLACKWELL, J. M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem*, 266, n. 23, p. 15170-15179, Aug 1991.

MCCONVILLE, M. J.; HOMANS, S. W.; THOMAS-OATES, J. E.; DELL, A. et al. Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *J Biol Chem*, 265, n. 13, p. 7385-7394, May 1990.

MCCONVILLE, M.J.; FERGUSON, M.A.J. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.*, 1993, 294(Pt 2), 305-324.

MCCONVILLE, M.J.; COLLIDGE, T.A.; FERGUSON, M.A.; SCHNEIDER, P. The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem*. 1993 Jul 25;268(21):15595-604.

MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P. Posttranslational regulation of a *Leishmania* HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of site-specific mutagenesis of catalytic, zinc binding, N-glycosylation, and glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage, intracellular stability, and extracellular exit. *J Biol Chem.* 1996 Apr 5;271(14):7903-9.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*, 107, n. 1, p. 7-14, Jan 2014.

MCNEELY, T. B.; TURCO, S. J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol*, 144, n. 7, p. 2745-2750, Apr 1990a.

MCNEELY, T.B.; TURCO, S.J. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Oct 29;148(2):6537.

MENDES, T.A.O. Genômica evolutiva e o estudo de mecanismos de adaptação do metabolismo de *Leishmania* ao parasitismo intracelular. Tese (Doutorado em Bioinformática) . Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizont. 2015

MENDONCA-PREVIATO, L.; TODESCHINI, A.R.; HEISE, N.; AGRELLOS, O.A.; DIAS, W.B.; PREVIATO, J.O. Chemical structure of major glycoconjugates from parasites. *Curr. Org. Chem.*, 2008, 12(11), 926-939.

MENGELING, B.J.; BEVERLEY, S.M.; TURCO, S.J. Designing glycoconjugate biosynthesis for an insidious intent: phosphoglycan assembly in *Leishmania* parasites. *Glycobiology.* 1997 Oct;7(7):873-80.

MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol.* 2011 Apr;6(4):459-74.

Ministério da Saúde, Brazil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. p. 189.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G. et al. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*, 24, n. 8, p. 371-377, Aug 2008.

MISSLITZ, A.; MOTTRAM, J.C.; OVERATH, P.; AEBISCHER, T. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high-level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Apr 15;107(2):251-61.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol*, 4, n. 1, p. 4-9, Jan 2014.

MOODY, S.F. Molecular variation in *Leishmania*. *Acta Trop.* 1993, 53, 185–204.

MORALES, M.A.; WATANABE, R.; DACHER, M.; CHAFEY, P.; FORTÉA, J.O.; SCOTT, D.A.; BEVERLEY, S.M.; OMMEN, G.; CLOS, J.; HEM, S. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 8381–8386.

MOTTRAM, J. C.; ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H.; BARRY, J. D. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol*, 6, n. 14, p. 1925-1932, Jul 1992.

MOUGNEAU, E.; ALTARE, F.; WAKIL, A.E.; ZHENG, S.; COPPOLA, T.; WANG, Z.E.; WALDMANN, R.; LOCKSLEY, R.M.; GLAICHENHAUS, N. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science.* 1995 Apr 28;268(5210):563-6.

MUKHERJEE, A.; BOISVERT, S.; MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C. et al. Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol*, 88, n. 1, p. 189-202, Apr 2013.

MULE, S.N.; SAAD, J.S.; FERNANDES, L.R.; STOLF, B.; CORTEZ, M; PALMISANO, G. Protein glycosylation in *Leishmania* spp. *Mol Omics.* 2020 Oct 12;16(5):407-424.

MÜLLER, I.; PEDRAZZINI, T.; FARRELL, J.P.; LOUIS, J. T-cell responses and immunity to experimental infection with *leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 1989

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005 Oct 29-Nov 4 2005.

MUSKUS, C.; SEGURA, I.; ODDONE, R.; TURCO, S.J.; LEIBY, D.A.; TORO, L.; ROBLEDO, S.; SARAIVA, N.G. Carbohydrate and LPG expression in *Leishmania viannia* subgenus. *J Parasitol.* 1997 Aug;83(4):671-8.

MYLER, P. J.; SISK, E.; MCDONAGH, P. D.; MARTINEZ-CALVILLO, S. et al. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans*, 28, n. 5, p. 527-531, Oct 2000.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; MCCONVILLE, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med*, 4, n. 6, p. 649-665, Sep 2004.

NOGUEIRA, P.M.; ASSIS, R.R.; TORRECILHAS, A.C.; SARAIVA, E.M.; PESSOA, N.L.; CAMPOS, M.A.; MARIALVA, E.F.; RÍOS-VELASQUEZ, C.M.; PESSOA, F.A.; SECUNDINO, N.F. Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* strains display immunomodulatory properties via TLR4 and do not affect sand fly infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016, 10, e0004848.

NOVOZHILOVA, N.M.; BOVIN, N.V. Structure, functions, and biosynthesis of glycoconjugates of *Leishmania* spp. Cell surface. *Biochemistry (Mosc.)*, 2010, 75(6), 686-694.

NORTH, S.J.; HITCHEN, P.G.; HASLAM, S.M.; DELL, A. Mass spectrometry in the analysis of N-linked and Olinked glycans. *Curr Opin Struct Biol.* 2009; 19:498–506.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol Res.* 2008

OLIVIER, M.; ATAYDE, V.D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M.T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 2012 Dec;14(15):1377-89.

ORLANDI, P.A. Jr.; TURCO, S.J. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *The Journal of biological chemistry.* 1987 Jul 25;262(21):10384-91.

Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. Washington, D.C.: PAHO; 2019. Available at: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>

PAPADOPOULOU, B.; ROY, G.; OUELLETTE, M. Autonomous replication of bacterial DNA plasmid oligomers in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 65, n. 1, p. 39-49, May 1994.

PATNAIK, P. K.; AXELROD, N.; VAN DER PLOEG, L. H.; CROSS, G. A. Artificial linear mini-chromosomes for *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*, 24, n. 4, p. 668-675, Feb 1996.

PATRICK, K.L.; SHI, H.; KOLEV, N.G.; ERSFELD, K.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17933-8.

PARANAÍBA, L.F.; DE ASSIS, R.R.; NOGUEIRA, P.M.; TORRECILHAS, A.C.; CAMPOS, J.H.; SILVEIRA, A.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; PESSOA, N.L.; CAMPOS, M.A.; PARREIRAS, P.M.; MELO, M.N.; GONTIJO, N.D.E, F.; SOARES, R.P. *Leishmania enriettii*: biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. *Parasit Vectors*. 2015 Jan 17;8:31. doi: 10.1186/s13071-015-0633-8.

PARODI, A.J.; MARTIN-BARRIENTOS, J.; ENGEL, J.C. Glycoprotein assembly in *Leishmania mexicana*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Jan 13;118(1):1-7.

PARODI, A.J.; POLLEVICK, G.D.; MAUTNER, M.; BUSCHIAZZO, A.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1705-10.

PARODI, A.J. N-Glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*. 1993; 3:193–199.

PFEIFFER, Y.; TAL, E.; SULMAN, F.G. Heat-induced migraine and its treatment. *Harefuah* 1978, 95, 158–161.

PEACOCK, C.S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J.C.; QUAIL, M.A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M.A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S.L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D.P.; OYOLA, S.O.; HILLEY, J.D.; BRITO, L.O.; TOSI, L.R.; BARRELL, B.; CRUZ, A.K.; MOTTRAM, J.C.; SMITH, D.F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007 Jul;39(7):839-47.

PENG, D.; KURUP, S. P.; YAO, P. Y.; MINNING, T. A. et al. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio*, 6, n. 1, p. e02097-02014, Dec 2014.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y. D.; FUCHS, M. et al. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci*, 108 (Pt 12), p. 3715-3724, Dec 1995.

PETERS, C.; KAWAKAMI, M.; KAUL, M.; ILG, T.; OVERATH, P.; AEBISCHER, T. Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. *Eur J Immunol.* 1997 Oct;27(10):2666-72.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008 Dec 12;322(5908):1634. PIANI, A.; ILG, T.; ELEFANTY, A.G.; CURTIS, J.; HANDMAN, E. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect.* 1999, 1, 589–599.

PIMENTA, P.F.; SARAIVA, E.M.; SACKS, D.L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp. Parasitol.* 1991, 72, 191–204.

POLANCO, G.; SCOTT, N.E.; LYE, L.F.; BEVERLEY, S.M. Expanded Proteomic Survey of the Human Parasite *Leishmania major* Focusing on Changes in Null Mutants of the Golgi GDP-Mannose/Fucose/Arabinopyranose Transporter LPG2 and of the Mitochondrial Fucosyltransferase FUT1. *Microbiol Spectr.* 2022 Nov 17:e0305222.

PUENTES, S. M.; DA SILVA, R. P.; SACKS, D. L.; HAMMER, C. H. et al. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*, 145, n. 12, p. 4311-4316, Dec 1990.

RAFATI, S.; GHOLAMI, E.; HASSANI, N.; GHAEMIMANESH, F.; TASLIMI, Y.; TAHERI, T.; SOONG, L. *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine.* 2007 May 22;25(21):4159-69.

RAFATI, S.; HASSANI, N.; TASLIMI, Y.; MOVASSAGH, H.; ROCHETTE, A; PAPADOPOULOU, B. Amastin peptide-binding antibodies as biomarkers of active human visceral leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Oct;13(10):1104-10.

RAMÍREZ, J. R.; BERBERICH, C.; JARAMILLO, A.; ALONSO, C. et al. Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93, n. 2, p. 247-254, 1998 Mar-Apr 1998.

RATH, D.; AMLINGER, L.; RATH, A.; LUNDGREN, M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie.* 2015 Oct;117:119-28.

REGINA-SILVA, S.; FERES, A.M.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DIAS, E.S.; MICHALSKY, É.M.; DE ANDRADE, H.M.; COELHO, E.A.; RIBEIRO, G.M.; FERNANDES, A.P.; MACHADO-COELHO, G.L. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine.* 2016 Apr 27;34(19):2233-9.

REINER, N. E.; NG, W.; WILSON, C. B.; MCMASTER, W. R. et al. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest*, 85, n. 6, p. 1914-1924, Jun 1990.

REMALEY, A.T.; GLEW, R.H.; KUHNS, D.B.; BASFORD, R.E.; WAGGONER, A.S.; ERNST, L.A.; POPE, M. *Leishmania donovani*: Surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production. *Exp. Parasitol.* 1985, 60, 331–341.

RICO, A.I.; DEL REAL, G.; SOTO, M.; QUIJADA, L.; MARTINEZ, A.C.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. *Infect. Immun.* 1998, 66, 347–352.

ROBERTS, A.; NAGAR, R.; BRANDT, C.; HARCOURT, K.; CLARE, S.; FERGUSON, M.A.J.; WRIGHT, G.J. The *Leishmania donovani* Ortholog of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthesis Cofactor PBN1 Is Essential for Host Infection. *mBio.* 2022 Jun 28;13(3):e0043322.

ROBINSON, K.A.; BEVERLEY, S.M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 128:217–228.

ROCHETTE, A.; MCNICOLL, F.; GIRARD, J.; BRETON, M. et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol*, 140, n. 2, p. 205-220, Apr 2005.

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A.; Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430, 463–467. [1038/nature02675](https://doi.org/10.1038/nature02675). 2004

ROGERS, M.; KROPF, P.; CHOI, B.S.; DILLON, R.; PODINOVSKAIA, M.; BATES, P.; MÜLLER, I. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* 2009 Aug;5(8):e1000555.

ROGERS, M.B.; HILLEY, J.D.; DICKENS, N.J.; WILKES, J.; BATES, P.A.; DEPLEDGE, D.P.; HARRIS, D.; HER, Y.; HERZYK, P.; IMAMURA, H.; OTTO, T.D.; SANDERS, M.; SEEGER, K.; DUJARDIN, J.C.; BERRIMAN, M.; SMITH, D.F.; HERTZ-FOWLER, C.; MOTTRAM, J.C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* 2011 Dec;21(12):2129-42.

ROSEN, G.; PÅHLSSON, P.; LONDNER, M. V.; WESTERMAN, M. E. et al. Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol antigens of *Leishmania major*. J Biol Chem, 264, n. 18, p. 10457-10463, Jun 1989.

ROTH, J. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. Chem Rev. 2002 Feb;102(2):285-303.

RUSSELL, D. G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. Immunol Today, 10, n. 10, p. 328-333, Oct 1989.

RUSSELL, D. G.; WRIGHT, S. D. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. J Exp Med, 168, n. 1, p. 279-292, Jul 1988.

RUSSELL, D.G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. J Immunol. 1986 Apr 1;136(7):2613-20.

RUSSO, D. M.; TURCO, S. J.; BURNS, J. M.; REED, S. G. Stimulation of human T lymphocytes by *Leishmania* lipophosphoglycan-associated proteins. J Immunol, 148, n. 1, p. 202-207, Jan 1992.

SAAR, Y.; RANSFORD, A.; WALDMAN, E.; MAZAREB, S. et al. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol, 95, n. 1, p. 9-20, Sep 1998.

SACKS, D.L.; HIENY, S.; SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. J Immunol. 1985 Jul;135(1):564-9.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol, 69, n. 1, p. 100-103, Jul 1989.

SACKS, D.L.; PIMENTA, P.; MCCONVILLE, M.J.; SCHNEIDER, P.; TURCO, S.J. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 1995, 181,685–697.

SACKS, D. L.; MODI, G.; ROWTON, E.; SPÄTH, G. et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. Proc Natl Acad Sci U S A, 97, n. 1, p. 406-411, Jan 2000.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. Am J Trop Med Hyg, 34, n. 3, p. 456-459, May 1985.

SAHA, A.K.; DAS, S.; GLEW, R.H.; GOTTLIEB, M. Resistance of leishmanial phosphatases to inactivation by oxygen metabolites. J. Clin.Microbiol. 1985, 22, 329–332.

SAMUELSON, J.; BANERJEE, S.; MAGNELLI, P.; CUI, J.; KELLEHER, D.J.; GILMORE, R.; ROBBINS, P.W. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102:1548–1553. SARAVIA, N. G.; WEIGLE, K.; NAVAS, C.; SEGURA, I. et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. Am J Trop Med Hyg, 66, n. 6, p. 738-744, Jun 2002

SCHNEIDER, P.; ROSAT, J.P.; BOUVIER, J.; LOUIS, J.; BORDIER, C. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. Exp Parasitol. 1992 Sep;75(2):196-206.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis, 21, n. 5, p. 483-488, Oct 2008.

SECCOMBE, A.; READY, P.; HUDDLESTON, L. A catalogue of old world phlebotomine sandflies (diptera: Psychodidae, phlebotominae). 1 st ed. Andover, Hampshire: Intercept; 1993.

SERAFIM, T.D; COUTINHO-ABREU, I.V; OLIVEIRA, F; MENESES, C; KAMHAWI, S; VALENZUELA, J.G. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. Nat Microbiol. 2018 May;3(5):548-555. Epub 2018 Mar 19.

SERNEE, M. F.; RALTON, J. E.; DINEV, Z.; KHAIRALLAH, G. N. et al. *Leishmania* beta-1,2-mannan is assembled on a mannose-cyclic phosphate primer. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, n. 25, p. 9458-9463, Jun 2006.

STERKERS, Y.; LACHAUD, L.; BOURGEOIS, N.; CROBU, L.; BASTIEN, P.; PAGÈS, M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. Mol Microbiol. 2012 Oct;86(1):15-23.

SEVLEVER, D.; PÅHLSSON, P.; ROSEN, G.; NILSSON, B. et al. Structural analysis of a glycosylphosphatidylinositol glycolipid of *Leishmania donovani*. Glycoconj J, 8, n. 4, p. 321-329, Aug 1991.

SHAO, S.; SUN, X.; CHEN, Y.; ZHAN, B.; ZHU, X. Complement Evasion: An Effective Strategy That Parasites Utilize to Survive in the Host. Front Microbiol. 2019 Mar 20;10:532.

SHI, H.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. RNA. 2006; 12:2063–2072.

SHIO, M.T.; HASSANI, K.; ISNARD, A.; RALPH, B.; CONTRERAS, I.; GOMEZ, M.A.; ABU-DAYYEH, I.; OLIVIER, M. Host cell signalling and *leishmania* mechanisms of evasion. J. Trop. Med. 2012, 2012, 819512.

SIDIK, S. M.; HUET, D.; GANESAN, S. M.; HUYNH, M. H. et al. A Genome-wide CRISPR Screen in *Toxoplasma* Identifies Essential Apicomplexan Genes. Cell, 166, n. 6, p. 1423-1435.e1412, Sep 2016.

SILVA-ALMEIDA, M.; PEREIRA, B.A.; RIBEIRO-GUIMARAES, M.L.; ALVES, C.R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp.infection in mammals. Parasit Vectors 2012, 5, 160.

SILVA-ALMEIDA, M.; PEREIRA, B.A.; RIBEIRO-GUIMARÃES, M.L.; ALVES, C.R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. Parasit Vectors. 2012 Aug 7;5:160.

SINGH, V.; BRADDICK, D.; DHAR, P.K. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. Gene. 2017 Jan 30;599:1-18.

SINGLA, N.; KHULLER, G.K.; VINAYAK, V.K. Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: A marker of virulence. FEMS Microbiol. Lett. 1992, 73, 221–225.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 99, n. 3, p. 239-251, May 2004.

SKEIKY, Y.A.; BENSON, D.R.; GUDERIAN, J.A.; WHITTLE, J.A.; BACELAR, O.; CARVALHO, E.M.; REED, S.G. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. Infect. Immun. 1995, 63, 4105–4114.

SOARES, M. B.; TITUS, R. G.; SHOEMAKER, C. B.; DAVID, J. R. et al. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. J Immunol, 160, n. 4, p. 1811-1816, Feb 1998.

SOARES, R.P.; MACEDO, M.E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N.F.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T et al. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. Molecular and biochemical parasitology. 2002 May;121(2):213-24.

SOARES, R.P.; CARDOSO, T.L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M.S.; PIMENTA, P.F.; TURCO, S.J. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. Int J Parasitol. 2005 Mar;35(3):245-53.

SOARES, R.P.; BARRON, T.; MCCOY-SIMANDLE, K.; SVOBODOVA, M.; WARBURG, A.; TURCO, S.J. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different Phlebotomus species. Exp Parasitol. 2004 May-Jun;107(1-2):105-14.

SOLLELIS, L.; GHORBAL, M.; MACPHERSON, C. R.; MARTINS, R. M. et al. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. Cell Microbiol, 17, n. 10, p. 1405-1412, Oct 2015.

SOREK, R.; LAWRENCE, C.M.; WIEDENHEFT, B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. Annu Rev Biochem. 2013;82:237-66.

SOUSA, M.C.; FERRERO-GARCIA, M.A.; PARODI, A.J. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry*. 1992 Jan 14;31(1):97-105.

SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol*, 99, n. 2, p. 97-103, Oct 2001.

SPÄTH, G.F.; LYE, L.F.; SEGAWA, H.; SACKS, D.L.; TURCO, S.J.; BEVERLEY, S.M. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. *Science*. 2003 Aug 29;301(5637):1241-3.

SPÄTH, G.F.; LYE, L.F.; SEGAWA, H.; TURCO, S.J.; BEVERLEY, S.M. Identification of a compensatory mutant (lpg2-REV) of *Leishmania major* able to survive as amastigotes within macrophages without LPG2-dependent glycoconjugates and its significance to virulence and immunization strategies. *Infect Immun*. 2004 Jun;72(6):3622-7.

SPÄTH, G.F.; CLOS, J. Joining forces: first application of a rapamycin-induced dimerizable Cre system for conditional null mutant analysis in *Leishmania*. *Mol Microbiol*. 2016 Jun;100(6):923-7.

STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit. Rev. Microbiol*. 2002, 28, 187–248.

STEBECK, C. E.; BEECROFT, R. P.; SINGH, B. N.; JARDIM, A. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 71, n. 1, p. 1-13, Apr 1995.

STERKERS, Y.; CROBU, L.; LACHAUD, L.; PAGÈS, M.; BASTIEN, P. Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics. *Trends Parasitol*. 2014 Sep;30(9):429-35.

STIERHOF, Y.D.; WIESE, M.; ILG, T.; OVERATH, P.; HANER, M.; AEBI, U. Structure of a filamentous phosphoglycoprotein polymer: The secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. *J. Mol. Biol*. 1998, 282, 137–148.

STIERHOF, Y.D.; BATES, P.A.; JACOBSON, R.L.; ROGERS, M.E.; SCHLEIN, Y.; HANDMAN, E.; ILG, T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol.* 1999 Oct;78(10):675-89.

STOBER, C.B.; LANGE, U.G.; ROBERTS, M.T.; GILMARTIN, B.; FRANCIS, R.; ALMEIDA, R.; PEACOCK, C.S.; MCCANN, S.; BLACKWELL, J.M. From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. *Vaccine.* 2006 Mar 24;24(14):2602-16.

SCHUMANN BURKARD, G.; JUTZI, P.; RODITI, I. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Mol Biochem Parasitol.* 2011 Jan;175(1):91-4. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.09.002. Epub 2010 Sep 22.

SUNDAR, S.; RAI, M. Treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother,* 6, n. 16, p. 2821-2829, Dec 2005.

SVÁROVSKÁ, A.; ANT, T.H.; SEBLOVÁ, V.; JECNÁ, L.; BEVERLEY, S.M.; VOLF, P. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Jan 12;4(1):e580.

TAMAR, S.; PAPADOPOULOU, B. A telomere-mediated chromosome fragmentation approach to assess mitotic stability and ploidy alterations of *Leishmania* chromosomes. *J Biol Chem,* 276, n. 15, p. 11662-11673, Apr 2001.

TANABE, M.; KANEHISA, M. Using the KEGG database resource. *Curr Protoc Bioinformatics,* Chapter 1, p. Unit1.12, Jun 2012.

TEIXEIRA, S. M.; RUSSELL, D. G.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J Biol Chem,* 269, n. 32, p. 20509-20516, Aug 1994.

TERNS, R.M.; TERNS, M.P. CRISPR-based technologies: prokaryotic defense weapons repurposed. *Trends Genet.* 2014 Mar;30(3):111-8.

THAYSEN-ANDERSEN, M.; PACKER, N.H.; SCHULZ, B.L. Maturing Glycoproteomics Technologies Provide Unique Structural Insights into the N-

glycoproteome and Its Regulation in Health and Disease. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Jun;15(6):1773-90.

TOLEDO, J.S.; FERREIRA, T.R.; DEFINA, T.P.; DOSSIN, F.D.E, M.; BEATTIE, K.A.; LAMONT, D.J.; CLOUTIER, S.; PAPADOPOULOU, B.; SCHENKMAN, S.; CRUZ, A.K. Cell homeostasis in a *Leishmania major* mutant overexpressing the spliced leader RNA is maintained by an increased proteolytic activity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Oct;42(10):1661-71.

TUPPERWAR, N.; SHRIVASTAVA, R.; SHAPIRA, M. LeishIF4E1 Deletion Affects the Promastigote Proteome, Morphology, and Infectivity. *mSphere*. 2019 Nov 13;4(6):e00625-19.

TRAN, K.D.; VIEIRA, D.P.; SANCHEZ, M.A.; VALLI, J.; GLUENZ, E.; LANDFEAR, S.M. Kharon1 null mutants of *Leishmania mexicana* are avirulent in mice and exhibit a cytokinesis defect within macrophages. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0134432.

TROMBETTA, S.E.; GAÑAN, S.A.; PARODI, A.J. The UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase is a soluble protein of the endoplasmic reticulum. *Glycobiology*. 1991 Mar;1(2):155-61.

TSAI, Y.H.; LIU, X.; SEEBERGER, P.H. Chemical biology of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Angew. Chem. Int.Ed. Engl.*, 2012, 51(46), 11438-11456.

TSOKANA, C. N. et al. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis, *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. 2014.

TURCO, S. J. The leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule. *Exp Parasitol*, 70, n. 2, p. 241-245, Feb 1990.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*, 46, p. 65-94, 1992.

TURRA, G.L.; SCHNEIDER, L.; LIEDGENS, L.; DEPONTE, M. Testing the CRISPR-Cas9 and glmS ribozyme systems in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol*. 2021 Jan;241:111336.

ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* 2004; 6:509–519.

UZONNA, J.E.; SPÄTH, G.F.; BEVERLEY, S.M.; SCOTT, P. Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol.* 2004 Mar 15;172(6):3793-7.

VAN DEN STEEN, P.; RUDD, P.M.; DWEK, R.A.; OPDENAKKER, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1998;33(3):151-208.

VAKILI, B.; ESLAMI, M.; HATAM, GR.; ZARE, B.; ERFANI, N.; NEZAFAT, N.; GHASEMI, Y. Immunoinformatics-aided design of a potential multi-epitope peptide vaccine against *Leishmania infantum*. *Int J Biol Macromol.* 2018.

VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J.D.; FREEZE, H.H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C.R.; HART, G.W.; ETZLER, M.E, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

VELEZ, R.; DOMENECH, E.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; BARRIOS, D; TEBAR, S.; FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A.; AGUILAR, R.; DOBAÑO, C; ALBEROLA, J.; CAIRÓ, J.; GÁLLEGO, M. Evaluation of canine leishmaniosis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area-A randomized controlled trial. *Acta Trop.* 2020 May; 205:105387.

VERAS, P.S., BEZERRA, DE MENEZES J.P. Using Proteomics to Understand How *Leishmania* Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. *Int J Mol Sci.* 2016 Aug 19;17(8):1270.

VINAYAK, S.; PAWLOWIC, M. C.; SATERIALE, A.; BROOKS, C. F. et al. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Nature*, 523, n. 7561, p. 477-480, Jul 2015.

VOLF, P ; MYSKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*, 23, n. 3, p. 91-92, Mar 2007.

WHO. Control of the leishmaniases. Geneva: World Health Organization, 2010.

World Health Organization. Leishmaniasis. 2018. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Accessed 10 Sep 2018.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell* 2001, 12, 3307–3316.

WILSON, ME.; HARDIN, K.K. The major concanavalin A-binding surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes is involved in attachment to human macrophages. *J Immunol.* 1988 Jul 1;141(1):265-72.

WILSON, M. E.; HARDIN, K. K.; DONELSON, J. E. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* in virulent and attenuated promastigotes. *J Immunol*, 143, n. 2, p. 678-684, Jul 1989.

WYLLIE, S.; ROBERTS, A.J.; NORVAL, S.; PATTERSON, S.; FOTH, B.J.; BERRIMAN, M.; READ, K.D.; FAIRLAMB, A.H. Activation of Bicyclic Nitro-drugs by a Novel Nitroreductase (NTR2) in *Leishmania*. *PLoS Pathog.* 2016 Nov 3;12(11): e1005971.

WU, Y.; EL FAKHRY, Y.; SERENO, D.; TAMAR, S. et al. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 110, n. 2, p. 345-357, Oct 2000.

YAMAKAZI, H.; SHIRAIISHI, N.; TAKAUCHI, K.; OHNISHI, Y.; HORINOUCHE, S. Characterization of ALG2 encoding a mannosyltransferase in the zygomycete fungus *Rhizomucor pusillus*. *Gene.* 1998; 221:179–184.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Inst Entomol* 54, Associate Publishers, Gainesville, 1994; 881 pp.

YURCHENKO, V.; BUTENKO, A.; KOSTYGOV, A.Y. Genomics of Trypanosomatidae: Where We Stand and What Needs to Be Done? *Pathogens.* 2021 Sep 2;10(9):1124.

ZAMZE, S. Glycosylation in parasitic protozoa of the trypanosomatidae family. *Glycoconj J*, 8, n. 6, p. 443-447, Dec 1991.

ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; GHEDIN, E.; MATLASHEWSKI, G. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Jun;78(1-2):79-90.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, n. 16, p. 8807-8811, Aug 1997.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol*, 39, n. 4, p. 935-948, Feb 2001.

ZHANG, W. W.; MENDEZ, S.; GHOSH, A.; MYLER, P. et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *J Biol Chem*, 278, n. 37, p. 35508-35515, Sep 2003.

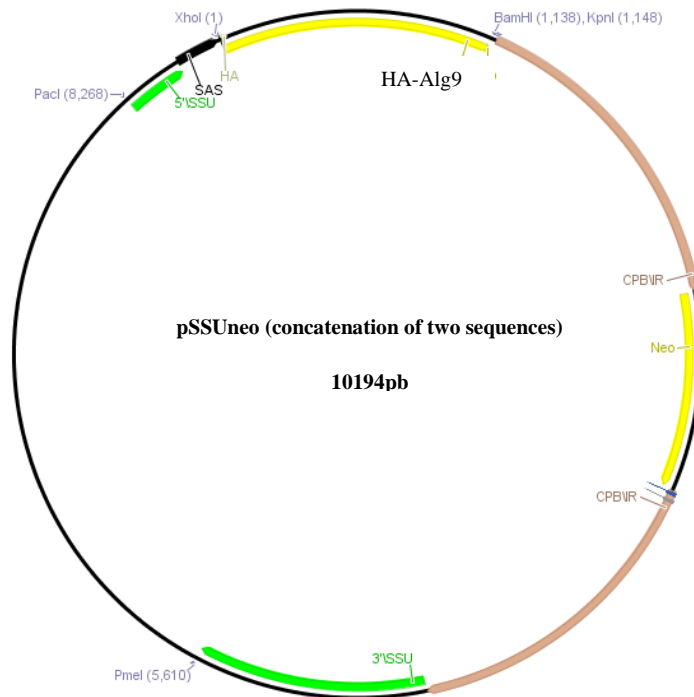
ZHANG, C.; XIAO, B.; JIANG, Y.; ZHAO, Y. et al. Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system. *mBio*, 5, n. 4, p. e01414-01414, Jul 2014.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania donovani*. *mBio*, 6, n. 4, p. e00861, Jul 2015.

ZHANG, W. W.; LYPACZEWSKI, P.; MATLASHEWSKI, G. Optimized CRISPR-Cas9 Genome Editing for. *mSphere*, 2, n. 1, 2017 Jan-Feb 2017.

ZAWADZKI, J.; SCHOLZ, C.; CURRIE, G.; COOMBS, G.H.; MCCONVILLE, M.J. The glycoinositolphospholipids from *Leishmania panamensis* contain unusual glycan and lipid moieties. *Journal of Molecular Biology.* 1998;282(2):287-299.

Anexo 2: Mapa do plasmídeo utilizado para a expressão do gene Alg9 em *L. braziliensis* M2903



Anexo 3: Artigo 1: Evaluation of medullary cytokine expression and clinical and laboratory aspects in severe human visceral leishmaniasis

Received: 5 May 2021 | Revised: 9 September 2021 | Accepted: 20 September 2021

DOI: 10.1111/pim.12880

ORIGINAL ARTICLE



WILEY

Evaluation of medullary cytokine expression and clinical and laboratory aspects in severe human visceral leishmaniasis

Leandro de Freitas Teles¹ | Agostinho Gonçalves Viana² | Mariana Santos Cardoso² |
 Guilherme Rafael Gomide Pinheiro³ | Gabriele Ariadine Bento² |
 Jamille Fernandes Lula¹ | Tânia de Cássia Moreira Soares¹ |
 Ricardo Toshio Fujiwara² | Silvio Fernando Guimarães de Carvalho¹

¹Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Hospital, Universitário Clemente de Faria, Universidade Estadual de Montes Claros-MG, Brazil

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais-MG, Brazil

³Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais-MG, Brazil

Correspondence

Leandro de Freitas Teles, Centro de Pesquisa em Doenças Infecciosas, Hospital Universitário Clemente de Faria, Universidade Estadual de Montes Claros-MG, Brazil.
 E-mail: ldefreitasteles@gmail.com

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil; Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil

Abstract

Background: Visceral leishmaniasis (VL) is a serious public health problem. The factors that can determine whether VL develops and progresses to severe form have not been fully identified, but a specific cellular immune response appears to play a key role. Therefore, understanding immunopathogenesis can be useful in preventing a serious clinical outcome.

Materials and Methods: Bone marrow samples were collected from patients with severe VL (SVL) or non-severe VL (NSVL). Cytokine levels and parasitic load were analysed by RT-qPCR. There is a statistically significant difference in the leukocyte parameter in patients with SVL and NSVL compared with the control patients ($p = .006$ and $p = .014$, respectively).

Results: Urea, alanine transaminase and albumin parameters had a significant difference $p = .036$, $p = .039$ and $p = .017$, respectively, between SVL and NSVL. Although high levels of IFN- γ , IL-10, IL-6 and TNF- α were present in all groups of individuals with VL, they were not statistically associated with severity. In patients with active VL, IFN- γ and IL-10 were associated, respectively, with a reduction and increase in the parasite load, strong and significant positive association between IFN- γ and IL-10 ($\rho = .627$ and $p = .003$).

Conclusion: This study demonstrates that VL stimulates a non-dichotomized inflammatory response between Th1/Th2 and that bone marrow is an important tissue for immune regulation.

KEYWORDS

bone marrow, cytokines, parasitic load, Visceral leishmaniasis

1 | INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL), also known as kala azar, is a neglected tropical disease that, if left untreated, it is fatal in more than 95% of cases.¹ It is caused by the intracellular protozoan *Leishmania*

donovani in the Old World and *L. infantum* (= *L. chagasi*) in the New World, including Brazil. This disease is characterized by irregular attacks of fever, hepatosplenomegaly and anaemia.^{2,3} It is estimated that 200,000 to 400,000 new cases of VL with an incidence of 20,000–40,000 deaths occur each year, but these numbers are

Anexo 4: Artigo 2: Draft Genome Sequence of the Protozoan Parasite *Leishmania braziliensis* Strain BA788, Isolated from a Clinical Case in Bahia State, Brazil



GENOME SEQUENCES



Draft Genome Sequence of the Protozoan Parasite *Leishmania braziliensis* Strain BA788, Isolated from a Clinical Case in Bahia State, Brazil

Anderson Coqueiro-dos-Santos,^a Gabrielle Ariadine Bento,^a Aldina Barral,^b Camila I. de Oliveira,^{b,c}  Daniella C. Bartholomeu^a

^aUniversidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^bInstituto Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador, Bahia, Brazil

^cInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Salvador, Bahia, Brazil

Camila I. de Oliveira and Daniella C. Bartholomeu contributed equally to this work.

ABSTRACT The draft genome of the parasite *Leishmania braziliensis* strain BA788, which was isolated from a patient from Bahia state, Brazil, was sequenced using Illumina paired-end technology. The assembled genome is 33.5 Mb long and contains 7,603 genes. This genome will contribute to studies aimed at understanding the pathogenesis caused by this parasite strain.

Leishmaniasis is a complex of diseases transmitted to humans and other mammals by the bite of sand flies from the *Phlebotomus* and *Lutzomyia* genera. These diseases are endemic in 90 countries and pose a risk to 350 million people, with an estimated 1 million cases per year (1). Leishmaniasis encompasses a broad range of clinical manifestations, from localized cutaneous disease to the visceral form with potentially fatal outcomes. Distinct clinical features depend on the *Leishmania* species involved and the host immune response. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most important etiological agent of tegumentary leishmaniasis in the Americas, with predominantly rural and peridomestic transmission (2).

L. braziliensis strain MHOM/BR/01/BA788 was isolated from a 16-year-old male patient from Jequié, Bahia state, northeastern Brazil, who presented with a single ulcerated lesion on the lower limb (3). The Montenegro skin test supported the diagnosis as localized cutaneous leishmaniasis. Lymph nodes close to the lesion site were aspirated, and samples were cultured in Schneider medium (Sigma Chemical Co.) supplemented with 100 U/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin, 10% heat-inactivated fetal calf serum (Life Technologies), and 2% sterile human urine. The research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. The patient underwent conventional treatment with antimonials, and the lesion was completely reepithelized after a single round of treatment. MHOM/BR/01/BA788 was registered at SisGen (<https://sisgen.gov.br/paginas/pubpesqatividade.aspx>) under the accession number A7A6463.

Promastigote parasites were maintained in Schneider medium (Sigma Chemical Co.) supplemented with 100 U/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin, and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Life Technologies). Promastigotes were grown in airtight flasks (T25 [nonvented]), incubated upright in a 25°C incubator, and passaged every 3 days (4). Genomic DNA was extracted using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega) following the manufacturer's instructions. The DNA sample was then checked for *Mycoplasma* contamination by PCR amplification (5) and genotyped by PCR using *L. braziliensis*-specific primers (6), and its quality and integrity were assessed with ethidium bromide-stained agarose gels. A sequencing library was constructed using the Illumina TruSeq library preparation method. Paired-end sequencing (151 bp from

Editor Catherine Putonti, Loyola University Chicago

Copyright © 2022 Coqueiro-dos-Santos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Daniella C. Bartholomeu, daniellaufmg@gmail.com.

The authors declare no conflict of interest.

Received 3 August 2022

Accepted 15 October 2022